

**UNIVERSITATEA “POLITEHNICA” DIN BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ INGINERIE CHIMICĂ ȘI BIOTEHNOLOGII**

TEZĂ DE DOCTORAT PhD THESIS

**METODE MODERNE DE DETECȚIE A CANCERULUI
GASTRIC**

**MODERN METHODS FOR DETECTION OF GASTRIC
CANCER**

Autor/Author: Doctorand Iuliana Mihaela Bogea

Conducător de doctorat/Scientific Coordinator:

Prof. Dr. habil Raluca-Ioana van Staden

**BUCUREȘTI
2022**



**UNIVERSITATEA “POLITEHNICA” DIN BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ INGINERIE CHIMICĂ ȘI BIOTEHNOLOGII**

TEZĂ DE DOCTORAT PhD THESIS

**METODE MODERNE DE DETECȚIE A CANCERULUI
GASTRIC**

**MODERN METHODS FOR DETECTION OF GASTRIC
CANCER**

Autor/Author: Doctorand Iuliana Mihaela Boga

Conducător de doctorat/Scientific Coordinator:

Prof. Dr. habil Raluca-Ioana van Staden

BUCUREȘTI

Cuprins

Recunoaștere	5
Abstract.....	6
Introducere	7
Capitolul 1: Senzori Stocastici	9
1.1 Introducere	9
1.2 Mecanismul de răspuns al senzorilor stocastici	9
1.3 Designul senzorilor stocastici	10
1.4 Sensibilitatea și selectivitatea senzorilor stocastici	11
1.5 Aplicații ale senzorilor stocastici în analiza biomedicală	11
Capitolul 2: Biomarkeri Utilizați în Diagnosticul Cancerului Gastric.....	12
2.1 Introducere	12
Capitolul 3: Enantioanaliza acidului aspartic utilizând senzori stocastici 3D	12
3.3 Rezultate și Discuții	12
3.3.1 Caracteristicile de Răspuns ale Senzorilor Stocastici 3D	12
3.3.2 Selectivitatea Senzorilor Stocastici 3D	13
3.3.3 Stabilitatea Senzorilor Stocastici 3D	13
3.4 Enantioanaliză a Acidului Aspartic în Probe de Sânge Integral	14
Capitolul 4: Grafenul decorat cu N, S modificat cu 2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfină Mangan (III) pe bază de clorură de mangan (III) pe bază de senzori stocastici 3D de tip ac pentru enantioanaliza argininei – un factor cheie în metabolomica și detectarea precoce a cancerului gastric.....	17
4.2.6 Designul Senzorilor Stocastici 3D Enantioselectivi de Tip Ac	17
4.2.7 Modul Stocastic	18
4.3 Rezultate și Discuții	22
4.3.1 Caracteristicile de Răspuns ale Senzorilor Stocastici 3D Enantioselectivi de Tip Ac.....	22
4.3.2 Selectivitatea Senzorilor Stocastici 3D Enantioselectivi de Tip Ac.....	22
4.3.3 Măsurători de Stabilitate și Reproducibilitate.....	23
4.4 Enantioanaliză a Argininei în Sângele Integral și în Probe de Țesut Tumoral Gastric	23
Capitolul 5: Sensor stocastic 2D enantioselectiv de unică folosință pentru enantioanaliza rapidă în timp real a glutaminei în probe biologice	28
5.3.1 Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic 2D enantioselectiv	28
5.3.2 Selectivitatea și enantioanaliza senzorului stocastic 2D.....	29
5.4 Enantioanaliza glutaminei în sânge integral și în probe de țesut tumoral.....	30

Capitolul 6: Senzori stocastici utilizați în recunoașterea modelelor și cuantificarea Maspin în probe biologice	34
6.2.1.6 Probe biologice	36
6.2.2 Rezultate și discuții	36
6.2.2.1 Caracterizarea morfologică și structurală a probei NSGR.....	36
6.2.2.2 Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici.....	37
6.2.2.3 Selectivitatea	39
6.2.3 Recunoașterea modelelor și determinarea maspinului în probele biologice.....	39
6.3 Senzori stocastici pentru recunoașterea modelelor și cuantificarea Maspinului	41
6.3.1 Experimental	41
6.3.1.4 Metoda stocastică	43
6.3.1.5 Probe biologice	44
6.3.2 Rezultate și discuții	44
6.3.2.1 Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici de unică folosință.....	44
6.3.2.2 Selectivitatea	46
6.3.3 Recunoașterea moleculară și cuantificarea Maspin în probele biologice	47
Capitolul 7: Determinarea p53 din probe de sânge integral folosind un senzor electrochimic bazat pe grafenul decorat cu N și S.....	51
7.1 Introducere	51
7.2.3 Designul Sensorului Electrochimic.....	51
7.2.4 Procedură recomandată	52
7.2.5 Probe biologice	52
7.2.6 Studii de selectivitate	52
7.3 Rezultate și discuții	52
7.3.1 Răspunsul caracteristic al senzorului electrochimic propus	52
7.3.2 Selectivitatea senzorului electrochimic	54
7.4 Determinarea p53 în probele de sânge integral.....	54
7.5 Concluzii	56
Concluzii și activități viitoare	57
Referințe Selectate	59
Anexa 1	60
Anexa 2	61

Recunoaștere

Doresc să-mi exprim mulțumirile și recunoștința profundă față de coordonatorul de doctorat Prof. Dr. habil. Raluca-Ioana van Staden pentru coordonarea extraordinară, recomandările și sfaturile utile primite pe parcursul studiilor mele de doctorat, precum și în timpul elaborării tezei de doctorat.

Doresc să adresez sincere mulțumiri membrilor comisiei de îndrumare: Prof. Dr. Ing. Ana Maria Josceanu, Prof. Dr. Ing. Gabriel Lucian Radu, Prof. Dr. Cristina Nechifor, care m-au sprijinit și îndrumat pe parcursul rapoartelor școlii doctorale.

Doresc să mulțumesc echipei de cercetători de la "Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare", Cluj-Napoca, pentru sinteza materialelor pe bază de grafene și domnului Marius Bădulescu de la "Institutul Național pentru Fizica Laserilor, Plasmei și Radiației", Laboratorul de Plasme la Temperaturi Joase, pentru sinteza nanofilmelor pe bază de argint și carbon și caracterizarea acestora cu ajutorul aparatelor SEM și AFM.

Mulțumesc călduros colegilor mei din Laboratorul de Electrochimie și PATLAB, în special Ruxandra-Maria Mihai și Damaris-Cristina Gheorghe, pentru răbdare, ajutor și sprijin, precum și pentru frumoasa colaborare.

Adaug mulțumirile mele pentru sprijinul financiar acordat prin UEFISCDI, proiect PN-III-P4-ID-PCCF-2016.

Abstract

Cancerul gastric este un tip de cancer silențios care are nevoie de instrumente fiabile și de teste de screening pentru depistarea sa timpurie, pentru a crește rata de supraviețuire. Prin urmare, în această teză de doctorat au fost dezvoltați senzori stocastici și voltametrici ca instrumente de screening pentru cancerul gastric. Acoperind intervale largi de concentrații liniare cu limite de detecție foarte scăzute, fiind singurii senzori care pot face o analiză calitativă fiabilă a probei, senzorii stocastici au fost utilizați pentru recunoașterea moleculară și cuantificarea p53, maspin, precum și pentru enantioanaliza acidului aspartic și a argininei în diferite probe biologice: sânge integral, țesuturi tumorale, urină și salivă. Metodele de screening au fost validate și sunt utilizate în studii clinice pentru a fi standardizate și aprobate pentru detectarea precoce a cancerului gastric.

Introducere

Cancerul gastric este un tip de cancer tăcut. De obicei, acesta este detectat în stadii avansate, când șansele de supraviețuire sunt foarte mici. Cancerul gastric, ocupă locul al patrulea în lume, fiind printre cele mai frecvente tipuri de cancer și a doua cea mai frecventă cauză de deces la nivel mondial, în special în țările asiatice, cum ar fi China.

Prin urmare, este necesar să se dezvolte teste de screening pentru depistarea precoce a cancerului gastric. Au fost dezvoltate diferite terapii pentru cancerul gastric [1-7]; agenții chimioterapeutici au fost dezvoltați pentru a opri multiplicarea și răspândirea rapidă a celulelor canceroase. O metodă eficientă în detectarea rapidă și corectă a cancerului gastric este reprezentată de analiza biomarkerilor specifici, care indică stadiul cancerului gastric.

Cele mai utilizate tipuri de biomarkeri sunt: acizii nucleici, carbohidrații, proteinele, lipidele, metabolizii mici, parametrii citogenetici și citocinetici și celulele tumorale din fluidele biologice care controlează procesele fiziologice și farmacologice [8]. Un rol semnificativ în metastazele tumorale este jucat de antigenul carcinoembrionar și poate fi asociat parțial cu detectarea cancerului gastric. Studiile privind markerii serici pentru cancerul gastric au constatat o creștere a nivelului CEA la pacienții cu cancer gastric [11]. Un alt biomarker este proteina p53, o fosfoproteină tetramerică care mediază transducția semnalului de la ADN deteriorat la genele implicate în organizarea ciclului celular și apoptoză. În cancerul uman, gena supresoare de tumori p53 suferă diferite tipuri de mutații care determină acumularea de proteine nefuncționale [12]. La pacienții sănătoși, proteina p53 este prezentă în cantități mici în fluidele biologice. Proteinele acumulate pot fi detectate în țesuturi, sânge și alte fluide din corpul uman [15]. Mutațiile în gena p53 sunt corelate în mod semnificativ cu supraexprimarea proteinei p53 și contribuie la predispoziția genetică la pacienții cu cancer gastric [13 - 14]. În urma cercetărilor efectuate de-a lungul timpului, s-a ajuns la concluzia că un marker tumoral specific este exprimat numai în celulele tumorale. Majoritatea antigenelor tumorale, cum ar fi antigenele embrionare (alfa fetoproteina și antigenul carcinoembrionar) sunt unice (specifice) pentru tumora individuală, fiind exprimate în timpul dezvoltării embrionare și în celulele canceroase. Antigenul carcinoembrionar

(CEA) este exprimat în toate tipurile de cancer gastrointestinal, pancreatic și mamar [15, 16]. Proteina supresoare de tumori p53 joacă un rol important în creșterea și evoluția cancerului și în răspunsul acestuia la chimioterapie [17 - 27]. Diferite studii indică asocierea supraexprimării proteinei supresoare tumorale p53 în legătură cu cancerul gastric, ceea ce duce la un timp scurt de supraviețuire a tumorii [28 - 30]. Maspin este un biomarker relativ nou care poate fi utilizat în testele de screening pentru detectarea precoce a cancerului gastric.

Senzorii electrochimici au devenit o bună alternativă la metodele standard utilizate în laboratoarele clinice (de exemplu, ELISA, chemiluminescență), datorită determinării direct din proba pacienților a compușilor de interes și a selectivității și sensibilității remarcabile [31], aceștia având succes și în analiza mediului [32], biotehnologie [33] și controlul proceselor [34, 35].

În timp ce CEA, p53, maspin indică, de asemenea, prezența sau alte boli în organism, oamenii de știință au ajuns la concluzia că enantioanaliza aminoacizilor poate oferi o indicație mai bună pentru prezența cancerului gastric. Studiile au arătat că triptofanul este metabolitul cu cele mai repetate modificări în mai multe tipuri de boli riscante. Pacienții cu cancer esofagian au scăzut măsurătorile plasmatice a 14 aminoacizi separați, inclusiv tirozina, fenilalanina și triptofanul [36,37].

Această teză abordează metodele moderne de analiză electrochimică, bazate pe senzori stocastici și voltammetrici, ca instrumente de screening pentru detectarea precoce a cancerului gastric. Senzorii stocastici au multe avantaje față de senzorii electrochimici convenționali, sunt sensibili și selectivi, având capacitatea de a determina simultan mai mulți compuși de interes în cantități foarte mici de probă analizată, acoperind intervale largi de concentrații liniare cu limite de detecție foarte scăzute și sunt singurii senzori care pot face o analiză calitativă fiabilă a probei. Recunoașterea moleculară și cuantificarea p53, maspin, precum și enantioanaliza acidului aspartic și a argininei au fost realizate în diferite probe biologice. Metodele de screening au fost validate și sunt utilizate în studii clinice pentru a fi standardizate și aprobate pentru detectarea precoce a cancerului gastric.

Capitolul 1: Senzori Stocastici

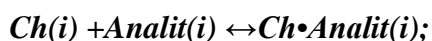
1.1 Introducere

Senzorii stocastici sunt dispozitive utilizate într-o gamă foarte largă pentru a determina diferiți analiți. Aceștia sunt necesari în multe domenii, având o aplicabilitate largă în diferite domenii; de exemplu, în mediul înconjurător sunt utilizați pentru a determina diferiți poluanți, minerale și alte forme chimice care pot afecta calitatea aerului și, prin urmare, calitatea vieții; de asemenea, pot fi utilizați în industria germană pentru a determina diferiți compuși. De asemenea, în caz de război, senzorii stocastici sunt utilizați pentru a determina gazele toxice folosite ca arme chimice, explozibili folosiți în cazul atacurilor teroriste sau prezența minelor neexploatate [38, 43]. În medicină, senzorii au cunoscut o evoluție favorabilă, fiind folosiți ca instrumente de screening pentru diverse patologii, prin determinarea diversilor biomarkeri specifici pentru anumite boli. Aceștia sunt foarte utili în determinarea nivelurilor de agenți terapeutici care trebuie monitorizați, de exemplu: microorganisme, toxine prezente în fluidele organismului [38].

1.2 Mecanismul de răspuns al senzorilor stocastici

Metoda utilizată de senzorii stocastici se bazează pe conductivitatea canalului. În metoda stocastică, potențialul de lucru optim este ales pentru a obține cea mai bună sensibilitate pentru măsurători. Determinarea biomarkerilor are loc în două etape [38, 39]:

- 1) etapa de recunoaștere moleculară: analitul de interes este extras din soluție la interfața membrană-soluție, intră în canal și îl blochează până când este complet plasat înăuntru; prin urmare, intensitatea curentului a devenit zero până când analitul complet trece prin gaura din interiorul canalului; perioada de timp necesară pentru a intra în canal este cunoscută sub numele de semnătura analitului (marcată ca t_{off}). Această etapă este, de asemenea, cunoscută ca etapă de analiză calitativă a biomarkerilor/analitelor;
- 2) etapa de legare și electroanaliză: Această etapă are loc atunci când analitul interacționează cu peretele canalului și au loc procese redox. Ecuația de legare a analitului este:



unde Ch=canal de pori, i=interfața la care are loc reacția.

Timpu necesar pentru această etapă este cunoscut sub numele de parametru cantitativ, notat cu t_{on} . Acest parametru este utilizat pentru a determina concentrația analitului/biomarkerilor din probe. Etapa este cunoscută și sub denumirea de etapă de analiză cantitativă.

1.3 Designul senzorilor stocastici

Proiectarea senzorilor stocastici (Fig. 1) este foarte importantă în analiza probelor, este simplă, ieftină, folosind în majoritatea cazurilor matrici pe bază de carbon. Pentru a pregăti senzorul stocastic, se alege o pulbere (pe bază de grafit, grafenă, diamant etc.) la care se adaugă o anumită cantitate de ulei de parafină pentru a asigura o omogenizare perfectă. La această pastă se adaugă materialul capabil să formeze canale/pori (pe bază, de exemplu, de porfirine, ciclodextrine, lichide ionice etc.) care permit analiza stocastică. Pasta astfel formată se introduce într-un tub de plastic în interiorul căruia se introduce un fir de argint pentru a asigura contactul electric. Înainte de fiecare utilizare, senzorul stocastic se spală bine cu apă deionizată pentru a nu contamina celelalte probe utilizate pentru analiză, după care se usucă cu mare grijă, fiind astfel pregătit pentru o nouă măsurare a unei noi probe [38,43].

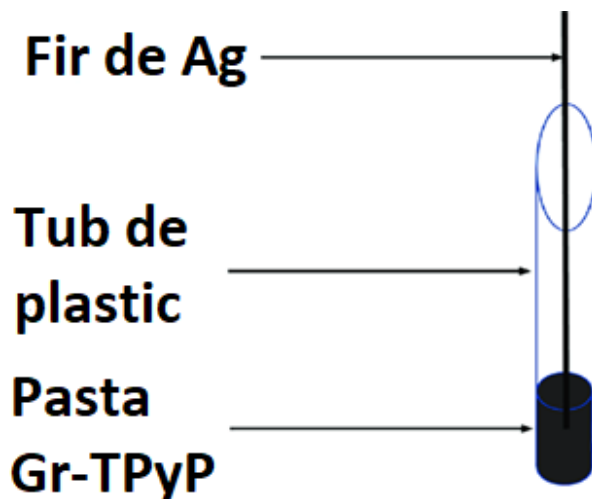


Fig.1. Designul senzorilor stocastici

1.4 Sensibilitatea și selectivitatea senzorilor stocastici

Sensibilitatea înregistrată în modul stocastic este mult mai mare decât cea înregistrată pentru alți senzori electrochimici. Sensibilitatea este dată de panta graficului de calibrare a senzorului stocastic.

Selectivitatea senzorilor stocastici este legată de prima etapă a mecanismului de răspuns al senzorilor stocastici - etapa de recunoaștere moleculară. Selectivitatea este dată de semnătura analitului (analiților) și a speciilor interferente (parametrul t_{off}), care are o valoare unică în funcție de mărimea, geometria, lungimea, capacitatea de desfășurare și viteza analitului (analiților) și a speciilor interferente. Diferența dintre semnături dă selectivitatea. Senzorii stocastici s-au dovedit a avea o selectivitate ridicată și, prin urmare, pot fi utilizați pentru testarea simultană a mai mult de 10 biomarkeri în fluidele biologice.

1.5 Aplicații ale senzorilor stocastici în analiza biomedicală

Senzorii stocastici au fost aplicați intensiv în domeniul medical, atât ca metodă de diagnosticare și screening, cât și pentru a determina stadiile de dezvoltare a diferitelor patologii. Aceștia au fost utilizați pentru a analiza biomarkerii pentru diabet, pentru diferite tipuri de cancer, pentru obezitate, pentru pubertate precoce, pentru boli inflamatorii etc. Metodele de screening bazate pe senzori stocastici în comparație cu testele comerciale precum ELISA, RIA etc. prezintă multiple avantaje: timp de analiză scurt, limite de detecție și de determinare foarte scăzute (care permit analiza pentru concentrații extrem de mici, necesitând o cantitate mică de probă pentru a fi analizată), selectivitate ridicată (senzorii fiind selectivi pentru fiecare analit în parte), un cost redus. Senzorii stocastici permit o aplicabilitate limitată (determinarea unui singur analit de interes) sau foarte largă, a unui panel de biomarkeri (determinarea simultană a mai multor analiți), fiind utilizați atât pentru probe de sânge integral, cât și pentru aer, salivă, urină și alte fluide ale organismului (de exemplu, lichidul cefalorahidian). Pentru diabet, senzorii stocastici au fost utilizați pentru a determina glucoza, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17; leptina, PAI-1 (inhibitor al activatorului de plasminogen1), CRP, adiponectina, zincul, etc.

Capitolul 2: Biomarkeri Utilizați în Diagnosticul Cancerului Gastric

2.1 Introducere

Biomarkerii se formează imediat ce tumora se formează în organism. Analiza biomarkerilor se poate face pentru diagnosticarea cancerului, precum și pentru stabilirea eficienței tratamentelor [44-49]. Diagnosticarea în stadii incipiente este rară, în special în cazul cancerului gastric [50-52]. O metodă eficientă în detectarea rapidă și corectă a cancerului este reprezentată de analiza biomarkerilor specifici, care pot indica și stadiul cancerului gastric. Cele mai utilizate tipuri de biomarkeri sunt: acizii nucleici, carbohidrații, proteinele, lipidele, metaboliții mici, parametrii citogenetici și citocinetici și celulele tumorale din fluidele biologice care controlează procesele fiziologice și farmacologice [53].

Capitolul 3: Enantioanaliza acidului aspartic utilizând senzori stocastici 3D

3.3 Rezultate și Discuții

3.3.1 Caracteristicile de Răspuns ale Senzorilor Stocastici 3D

Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici 3D propuși au fost prezentate în tabelul 3.1. Semnăturile diferite (valorile t_{off}) ale enantiomerilor determinați atunci când a fost utilizat același senzor stocastic 3D au dovedit că enantiomerii pot fi recunoscuți și determinați simultan în probe și că senzorii stocastici 3D au fost enantioselectivi. (Tabelul 3.1) Pentru dozarea L-Asp, intervalul de concentrație liniară mai larg (între 1×10^{-15} și $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) și cea mai mare sensibilitate ($1.51 \times 10^{11} \text{ s}^{-1} / \text{mol L}^{-1}$) au fost înregistrate pentru senzorul stocastic 3D bazat pe SEGr-1; rezultatul poate fi corelat cu conținutul de sulf din grafenă - cu cât conținutul este mai mare, cu atât sensibilitatea este mai bună. De asemenea, în cazul testării D-Asp, pentru senzorul stocastic 3D bazat pe SEGr-1 s-a înregistrat cel mai larg interval liniar de concentrație (între 1×10^{-12} și $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) și cea mai mare sensibilitate ($5.46 \times 10^8 \text{ s}^{-1} / \text{mol L}^{-1}$). În consecință, senzorul stocastic 3D de ales este cel bazat pe SEGr-1.

Tabelul 3.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici 3D utilizați pentru enantioanaliza acidului aspartic.

Senzori stocastici 3D pe bază de	Ecuția de calibrare* și coeficientul de corelație (r)	Domeniul liniar de concentrație (mol L ⁻¹)	t _{off} (s)	Sensibilitate (s ⁻¹ /mol L ⁻¹)	Limită de cuantificare (mol L ⁻¹)
L-Asp					
PIX/SEGr-1	1/t _{on} =0.04+1.51x10 ¹¹ xC r=0.9993	10 ⁻¹⁵ -10 ⁻²	1.3	1.51x10 ¹¹	10 ⁻¹⁵
PIX/SEGr-2	1/t _{on} =0.02+3.91x10 ⁷ xC r=0.9985	10 ⁻¹¹ -10 ⁻²	1.3	3.91x10 ⁷	10 ⁻¹¹
D-Asp					
PIX/SEGr-1	1/t _{on} =0.04+5.46x10 ⁸ xC r=0.9998	10 ⁻¹² -10 ⁻³	1.7	5.46x10 ⁸	10 ⁻¹²
PIX/SEGr-2	1/t _{on} =0.02+3.30x10 ⁷ xC r=0.9989	10 ⁻¹¹ -10 ⁻³	1.7	3.30x10 ⁷	10 ⁻¹¹

*<1/t_{on}> = s⁻¹, <C> = mol L⁻¹

3.3.2 Selectivitatea Senzorilor Stocastici 3D

Selectivitatea senzorilor stocastici este dată de semnătura diferiților biomarkeri/analize obținută cu ajutorul aceluiași senzori. Semnături diferite (valori t_{off}) ale analiților presupuși de interferență au indicat selectivitatea. În primul rând, enantioselectivitatea a fost verificată prin semnăturile enantiomerilor de L și D-Asp (tabelul 3.1); pentru fiecare dintre senzorii stocastici 3D, semnăturile enantiomerilor au fost diferite, dovedind enantioselectivitatea senzorilor. Au fost verificați și alți aminoacizi, cum ar fi leucina, triptofanul, glutamina, ca posibile interferențe. Toți aceștia au avut semnături diferite față de L- și D-Asp, dovedind că senzorii stocastici 3D propuși sunt selectivi.

3.3.3 Stabilitatea Senzorilor Stocastici 3D

Senzorii propuși au fost testați pentru o perioadă de 6 luni, când sensibilitatea lor a variat cu 0,85% pentru senzorul stocastic 3D bazat pe SEGr-1 și cu 0,95% pentru senzorul stocastic 3D bazat pe SEGr-2. Aceste rezultate au dovedit o stabilitate foarte bună a senzorilor stocastici 3D propuși.

3.4 Enantioanaliză a Acidului Aspartic în Probe de Sânge Integral

Senzorii stocastici 3D au fost utilizați ca instrumente pentru testele de screening ale probelor de sânge integral. Sângele întreg a fost introdus în celula electrochimică, iar semnăturile L- și D- Asp au fost determinate în diagramele obținute (figura 3.1). Pe baza măsurătorilor valorilor t_{on} pentru fiecare enantiomer identificat (pe baza semnăturii sale, tabelul 3.1) în diagramă, s-a determinat concentrația cu ajutorul metodei stocastice descrise mai sus.

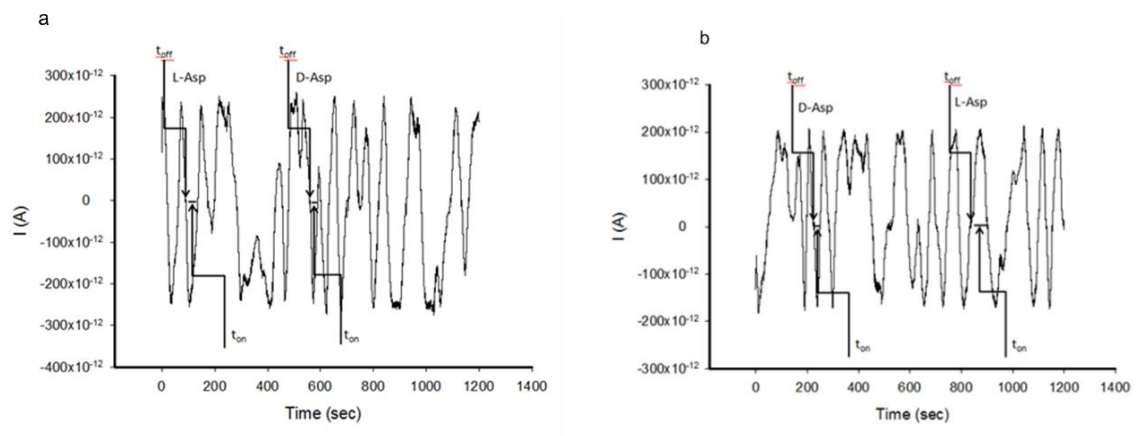


Figura 3.1 Diagrame înregistrate pentru enantioanaliza Asp în probe de sânge integral utilizând senzorii stocastici 3D pe bază de: (a) PIX/SEGr-1, și (b) PIX/SEGr-2.

În primul rând, pentru validarea senzorilor stocastici 3D și a metodei de screening, probele de sânge integral de la pacienți sănătoși au fost îmbogățite cu L- și D-Asp. În aceste probe s-a găsit numai L-Asp - înainte de adăugarea unor cantități bine cunoscute de L- și D-Asp, în diferite proporții. După adăugarea enantiomerilor, cantitățile de L- și D-Asp au fost determinate în mod corespunzător cu metoda stocastică; rezultatele obținute în tabelul 3.1 au arătat recuperări ridicate în probele de sânge integral de L- în prezența D-Asp și de D-Asp în prezența L-Asp.

Tabelul 3. 1. Teste de recuperare a unui enantiomer în prezența celuiilalt enantiomer (N=10).

Senzori stocastici 3D pe bază de	Enantiomer	Regăsire (%)			
	D:L	2:1	1:1	1:2	1:10
PIX/SEGr-1	L-Asp	99.21 ±0.08	99.95±0.07	99.90±0.07	99.15±0.05
PIX/SEGr-2	L-Asp	98.23 ±0.12	98.75±0.10	98.87±0.08	99.07±0.07
	L:D	2:1	1:1	1:2	1:10
PIX/SEGr-1	D-Asp	99.12±0.05	99.65±0.05	99.97±0.08	99.12±0.08
PIX/SEGr-2	D-Asp	99.15±0.03	98.98±0.04	98.12±0.07	98.90±0.07

Pentru validarea testului de screening au fost folosite probe de sânge integral recoltate de la persoane sănătoase, precum și probe de sânge integral recoltate de la pacienți la care s-a confirmat cancerul gastric. Tabelul 3.2 prezintă rezultatele obținute pentru sângele integral recoltat de la donatori sănătoși; doar L-Asp a fost găsit în probele de sânge integral recoltate de la persoanele sănătoase. Tabelul 4 prezintă rezultatele obținute în urma testului de screening pentru sângele integral recoltat de la pacienți cu cancer gastric; atât L- cât și D-Asp au fost găsite în sângele integral al pacienților confirmați cu cancer gastric. Testele t perechi au fost, de asemenea, utilizate pentru validarea senzorilor stocastici 3D utilizați ca instrumente în testele de screening ale sângelui integral. Testele t perechi au fost efectuate la un nivel de încredere de 99,00%. Toate valorile calculate pentru testul t pereche la un nivel de încredere de 99,00% au fost mai mici decât valoarea teoretică tabulată: 4,032 (tabelele 3.2, și 3.3).

Tabelul 3.2. Enantioanaliză a Asp în probele de sânge integral ale pacienților confirmați cu cancer gastric.

Proba nr.	Enantiomer al acidului aspartic*	Senzor Stocastic 3D Bazat pe	
		PIX/SEGr-1	PIX/SEGr-2
1	L	16.57±0.03	16.59±0.08
	D	19.55±0.03	18.90±0.08
2	L	70.05±0.04	70.11±0.07
	D	11.70±0.05	11.69±0.07
3	L	42.23±0.05	43.54±0.07
	D	24.91±0.03	24.80±0.06
4	L	14.43±0.02	15.67±0.07
	D	17.73±0.02	17.41±0.08
5	L	16.63±0.05	16.02±0.08
	D	17.88±0.04	16.35±0.08
6	L	25.39±0.05	26.99±0.06
	D	24.91±0.04	24.22±0.05
7	L	69.38±0.03	68.89±0.05
	D	42.60±0.05	40.40±0.08
8	L	11.33±0.05	11.50±0.08
	D	28.36±0.03	26.13±0.08
9	L	14.43±0.02	15.62±0.09
	D	22.43±0.02	22.09±0.09
10	L	19.49±0.04	18.85±0.07
	D	17.73±0.03	17.12±0.07
t-test			2.76

* Toate rezultatele sunt exprimate în $\mu\text{mol L}^{-1}$ (N=10).

Tabelul 3.3. Enantioanaliză a Asp în probe de sânge integral de la pacienți sănătoși.

Proba nr.	Enantiomer al acidului aspartic*	Senzor Stocastic 3D Bazat pe	
		PIX/SEGr-1	PIX/SEGr-2
1	L	641.18±0.02	641.24±0.06
2	L	194.86±0.02	199.26±0.07
3	L	469.53±0.03	472.73±0.07
4	L	178.98±0.04	179.60±0.08
5	L	194.85±0.05	197.16±0.05
6	L	403.76±0.02	408.80±0.07
7	L	118.98±0.02	131.40±0.07
8	L	880.75±0.03	879.64±0.06
9	L	118.98±0.04	119.90±0.07
10	L	855.02±0.02	854.05±0.07
t-test			2.25

* Toate rezultatele sunt exprimate în $\mu\text{mol L}^{-1}$ (N=10).

În consecință, nu există nicio diferență semnificativă din punct de vedere statistic între rezultatele obținute pentru testele de depistare cu ajutorul senzorilor stocastici 3D, la un nivel de încredere de 99,00%, pentru enantioanaliza Asp în probe de sânge integral. În consecință, metoda de screening și senzorii stocastici 3D pot fi validați pentru enantioanaliza Asp în probe de sânge integral. Avantajele utilizării unei astfel de metode în comparație cu cele propuse anterior [140,141] sunt: proiectarea senzorilor este rapidă și ușor de realizat într-un timp foarte scurt (nu este nevoie de echipamente speciale); fiabilitatea (sensibilitatea, selectivitatea, testele de recuperare) este mai mare; se poate realiza cu încredere o analiză calitativă și cantitativă a enantiomerilor acidului aspartic.

Capitolul 4: Grafenul decorat cu N, S modificat cu 2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfină Mangan (III) pe bază de clorură de mangan (III) pe bază de senzori stocastici 3D de tip ac pentru enantioanaliza argininei – un factor cheie în metabolomica și detectarea precoce a cancerului gastric

4.2.6 Designul Senzorilor Stocastici 3D Enantioselectivi de Tip Ac

Pastele de grafenă au fost preparate prin amestecarea uleiului de parafină cu fiecare dintre pulberile de grafen codopat cu N, S (NS-Gr-1 și NS-Gr-2) (figura 4.2). Modificatorul, complexul de porfirină (0.001 mol L^{-1} preparat în THF), a fost adăugat la pasta de grafenă într-un raport de 1:1 (v:w, mL:mg). Tuburi de plastic neconductive cu diametrul interior de 3.00 mm au fost umplute cu pasta modificată. Un fir de argint a fost utilizat ca contact între pastă și circuitul extern (figura 4.3). Înainte și după fiecare măsurare, microsenzorii au fost curățați cu apă deionizată și, atunci când nu au fost utilizați, au fost depozitați la temperatura camerei.

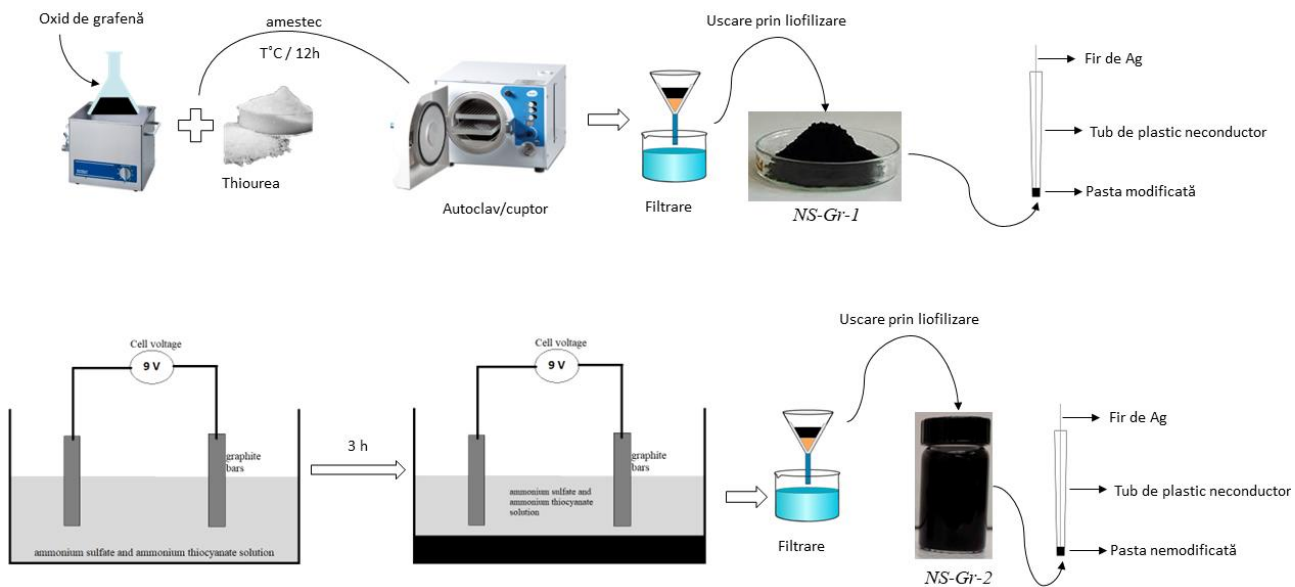


Figura 4.2. Pregătirea pulberilor de grafenă și designul senzorilor stocastici.

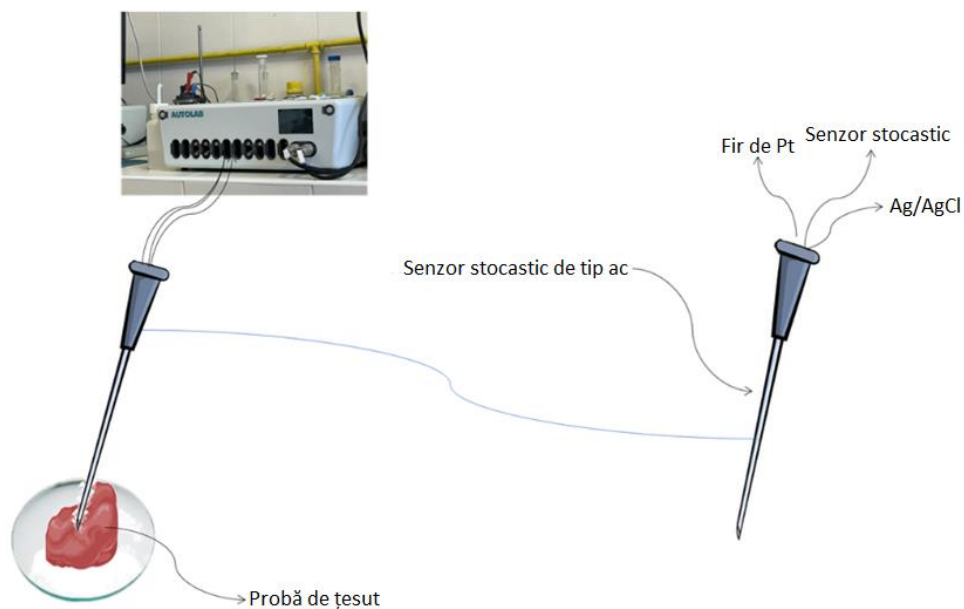


Figura 4.3. Configurația experimentală utilizată în enantioanaliza argininei.

4.2.7 Modul Stocastic

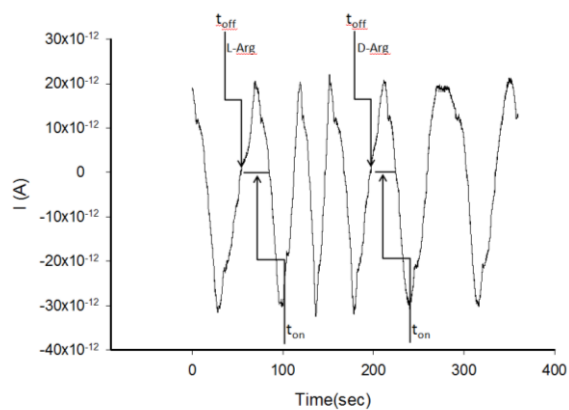
Metoda cronoamperometrică a fost utilizată pentru analiza calitativă și cantitativă a L- și D-argininei pe baza semnăturii acestora (valoarea t_{off}). Cuantificarea analiților a fost realizată utilizând valorile t_{on} (figurile 4.4-4.5 și tabelul 4.2). Pentru determinarea L- și D-argininei s-a

aplicat un potențial constant de 125 mV. Senzorii stocastici 3D de tip ac, enantioselectivi, proiectați au fost introduși într-o celulă care conținea soluții de analit de diferite concentrații. S-au obținut relații de calibrare pentru ambii senzori stocastici 3D de tip ac, enantioselectivi. Ecuatiile de calibrare au fost determinate prin metoda regresiei liniare.

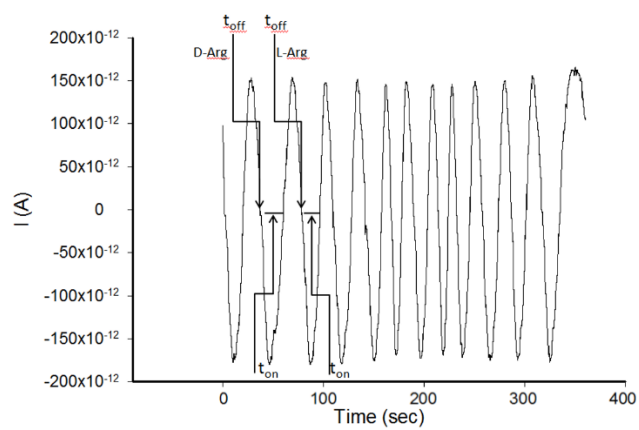
Tabelul 4.2. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici 3D de tip ac, enantioselectivi, utilizați pentru enantioanaliza argininei.

Senzori Stocastici 3D Enantioselectivi de Tip Ac pe Bază de MnPorph și Grafene Codopate cu NS	Ecuatia de calibrare* și coeficientul de corelație (r)	Domeniul liniar de concentrație (mol L⁻¹)	t_{off} (s)	Sensibilitate (s⁻¹/mol L⁻¹)	Limită de cuantificare (mol L⁻¹)	Limită de detecție (mol L⁻¹)
L-arginină						
NS-Gr-1	$1/t_{on}=0.02+2.27 \times 10^{11} \times C$ r=0.9999	$1.0 \times 10^{-15} - 1.0 \times 10^{-2}$	2.2	2.27×10^{11}	1.0×10^{-15}	2.5×10^{-16}
NS-Gr-2	$1/t_{on}=0.04+1.54 \times 10^{10} \times C$ r=0.9998	$1.0 \times 10^{-14} - 1.0 \times 10^{-3}$	1.4	1.54×10^{10}	1.0×10^{-14}	2.8×10^{-15}
D-arginină						
NS-Gr-1	$1/t_{on}=0.01+6.56 \times 10^{11} \times C$ r=0.9999	$1.0 \times 10^{-15} - 1.0 \times 10^{-3}$	4.4	6.56×10^{11}	1.0×10^{-15}	2.1×10^{-16}
NS-Gr-2	$1/t_{on}=0.01+4.18 \times 10^{10} \times C$ r=0.9999	$1.0 \times 10^{-14} - 1.0 \times 10^{-2}$	2.4	4.18×10^{10}	1.0×10^{-14}	2.2×10^{-15}

* $\langle 1/t_{on} \rangle = s^{-1}$; $\langle C \rangle = mol L^{-1}$

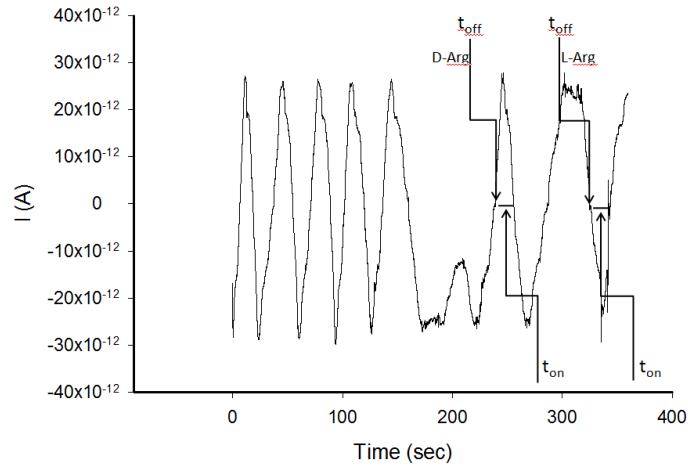


(a)

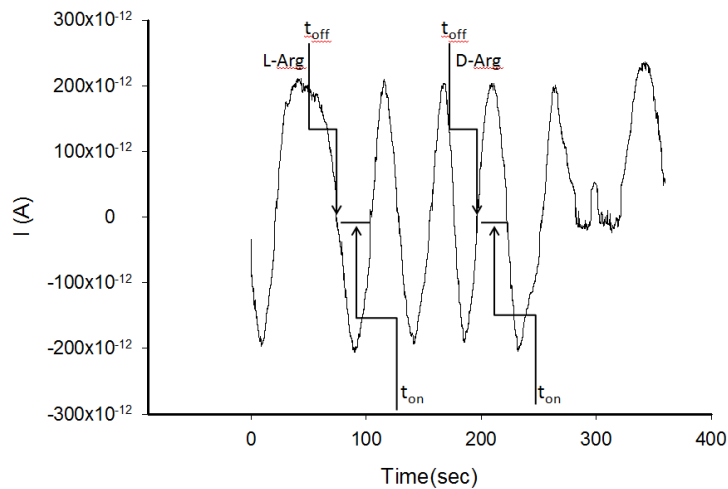


(b)

Figura 4.4. Enantioanaliză a argininei în probe de sânge integral, utilizând senzori stocastici 3D de tip ac, enantioselectivi, pe bază de MnPorph și: (a) NS-Gr-1 b) NS-Gr-2.



(a)



(b)

Figura 4.5. Enantioanaliză a argininei în probe de țesut utilizând senzori stocastici 3D de tip ac, enantioselectivi pe bază de MnPorph și: a) NS-Gr-1; b) NS-Gr-2.

Probele biologice, cum ar fi probele de sânge integral și de țesut (aprobarea comitetului de etică nr. 32647/2018 acordată de Spitalul Clinic Județean de Urgență din Târgu-Mureș) de la pacienți confirmați cu cancer gastric au fost utilizate pentru testele de screening pentru enantioanaliza argininei fără niciun tratament prealabil, imediat după ce au fost prelevate de la pacienți. Probele de sânge venos au fost prelevate de la pacienții cu CG și de la grupurile de control, în tuburi conținând acid etilendiaminotetraacetic (EDTA). Probele de țesut au fost analizate

imediat după ce au fost recoltate de la pacienți; senzorii au fost introduși în țesut (recoltat în timpul intervenției chirurgicale în tuburi sterile care conțin tampon fosfat) pentru măsurători. Consimțământul în cunoștință de cauză a fost obținut de la toți pacienții.

4.3 Rezultate și Discuții

4.3.1 Caracteristicile de Răspuns ale Senzorilor Stocastici 3D Enantioselectivi de Tip Ac

Toate caracteristicile de răspuns au fost determinate folosind cronoamperometria la un potențial constant de 125 mV vs Ag/AgCl, urmând modul stocastic descris mai sus. Caracteristicile de răspuns din tabelul 4.2 arată că senzorii propuși sunt enantioselectivi; au fost înregistrate semnături diferite (valori t_{off}) pentru enantiomerul L și D al argininei, atunci când a fost utilizat același senzor stocastic. Intervalele liniare de concentrație înregistrate pentru ambii senzori stocastici au fost foarte largi, acoperind niveluri găsite la pacienții sănătoși (niveluri superioare în intervalele de concentrație), dar și la pacienții confirmați cu cancer gastric (niveluri medii și inferioare în intervalele de concentrație) [155]. Limitele de cuantificare (cea mai mică concentrație din intervalul liniar de concentrație) sunt de 1 fmol L⁻¹ pentru L-arginină și de 10 fmol L⁻¹ pentru D-arginină. S-au înregistrat, de asemenea, limite de detecție foarte scăzute. S-au înregistrat sensibilități ridicate pentru ambii senzori stocastici atunci când au fost utilizați pentru enantioanaliza argininei; cele mai mari valori au fost înregistrate atunci când s-a utilizat NS-Gr-1 ca matrice: 2.27x10¹¹ mol L⁻¹ pentru analiza L-argininei și 6.56x10¹¹ mol L⁻¹ pentru analiza D-argininei.

4.3.2 Selectivitatea Senzorilor Stocastici 3D Enantioselectivi de Tip Ac

Selectivitatea senzorilor stocastici propuși este dată de semnăturile înregistrate pentru enantiomerii de arginină față de semnăturile altor compuși din probele biologice; diferența dintre semnături dă selectivitatea. Aminoacizi precum triptofanul (Try), glutamina (Glu), serina (Ser) și glutationul (GSH) au fost considerați ca posibile interferențe; semnăturile înregistrate, prezentate în tabelul 4.3, au dovedit că senzorii stocastici propuși sunt selectivi față de acești aminoacizi.

Tabelul 4.3. Selectivitatea senzorilor stocastici 3D enantioselectivi de tip ac utilizați pentru enantioanaliza argininei.

Senzori stocastici 3D Enantioselectivi de Tip Ac pe Bază de MnPorph și grafene co-dopat cu NS	Semnătură, valoare t_{off}						
	L-arg	D-arg	L-glu	D-glu	GSH	Try	Ser
NS-Gr-1	2.2	4.4	0.5	1.0	3.2	1.5	2.7
NS-Gr-2	1.4	2.4	0.7	1.8	3.5	2.8	3.2

4.3.3 Măsurători de Stabilitate și Reproducibilitate

Au fost proiectați 10 senzori stocastici 3D de tip ac, enantioselectivi, din fiecare dintre cele două tipuri (10 pe bază de NS-Gr-1 și 10 pe bază de NS-Gr-2); valorile sensibilităților înregistrate pentru cei 10 senzori de fiecare tip au demonstrat că nu există modificări semnificative ale sensibilității, variația acestora pentru fiecare tip fiind mai mică de 0,10%; acest lucru a dovedit reproducibilitatea proiectării fiecărui tip de senzor stocastic. După 30 de zile de măsurători, variația înregistrată a sensibilităților pentru senzorul stocastic bazat pe NS-Gr-1 a fost de 0,13 %, în timp ce pentru senzorul stocastic bazat pe NS-Gr-2 a fost de 0,22 %; acest lucru a dovedit că senzorii sunt stabili timp de cel puțin o lună, atunci când se efectuează măsurători zilnice.

4.4 Enantioanaliză a Argininei în Sângele Integral și în Probe de Țesut Tumoral Gastric

Sângele integral proaspăt și probele de țesut tumoral gastric de la pacienții la care s-a confirmat cancerul gastric au fost utilizate ca fiind prelevate de la pacienți; nu s-a aplicat nicio prelevare de probe la aceste probe. Măsurătorile în mod stocastic descrise mai sus au fost utilizate pentru a determina prezența enantiomerilor de arginină în aceste probe, precum și în probele recoltate de la voluntari sănătoși. Primul pas în citirea diagramelor obținute în urma screening-ului probelor reale a fost găsirea semnăturii (valoarea t_{off}) fiecărui enantiomer, urmată de citirea (între două valori t_{off} consecutive) a valorii t_{on} (figurile 4.4 și 4.5). Rezultatele obținute pentru screening-ul sângelui integral și al probelor de țesut tumoral gastric de la pacienții confirmați cu cancer gastric sunt prezentate în tabelul 4.4, în timp ce rezultatele obținute în urma screening-ului sângelui integral al voluntarilor sănătoși sunt prezentate în tabelul 4.5.

Tabelul 4.4. Enantioanaliză a argininei în sângele integral și în probele de țesut tumoral gastric recoltate de la pacienții confirmați cu cancer gastric.

Proba nr.	Senzori stocastici 3D Enantioselectivi de Tip Ac pe Bază de MnPorph și grafene co-dopați cu NS	L-arginină ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	D-arginină (pmol L^{-1})
Sânge Integral			
1	NS-Gr-2	72.16±0.04	4.00±0.02
	NS-Gr-1	71.64±0.03	3.99±0.03
2	NS-Gr-2	25.44±0.02	6.36±0.04
	NS-Gr-1	25.00±0.03	6.30±0.03
3	NS-Gr-2	20.74±0.03	3.46±0.02
	NS-Gr-1	21.13±0.04	3.40±0.02
4	NS-Gr-2	19.26±0.03	2.19±0.03
	NS-Gr-1	20.29±0.03	2.36±0.02
5	NS-Gr-2	30.03±0.04	7.24±0.03
	NS-Gr-1	29.42±0.02	7.62±0.04
6	NS-Gr-2	11.39±0.03	6.20±0.02
	NS-Gr-1	11.78±0.02	6.15±0.03
7	NS-Gr-2	17.12±0.01	15.19±0.02
	NS-Gr-1	18.03±0.04	15.18±0.03
8	NS-Gr-2	18.39±0.03	1.93±0.02
	NS-Gr-1	19.04±0.03	1.96±0.01
9	NS-Gr-2	37.47±0.02	6.49±0.01
	NS-Gr-1	39.06±0.03	6.72±0.02
10	NS-Gr-2	16.30±0.01	4.80±0.03
	NS-Gr-1	16.28±0.03	4.83±0.02
11	NS-Gr-2	40.04±0.02	13.78±0.02
	NS-Gr-1	39.06±0.04	13.14±0.04
12	NS-Gr-2	75.46±0.02	8.06±0.03
	NS-Gr-1	75.40±0.03	8.21±0.04
13	NS-Gr-2	9.50±0.02	11.38±0.03
	NS-Gr-1	9.54±0.02	11.44±0.02
14	NS-Gr-2	32.37±0.03	8.71±0.03
	NS-Gr-1	32.00±0.02	8.39±0.04
15	NS-Gr-2	3.50±0.03	2.90±0.03
	NS-Gr-1	3.41±0.04	2.92±0.02
16	NS-Gr-2	82.97±0.02	7.38±0.01
	NS-Gr-1	83.69±0.03	7.25±0.01
17	NS-Gr-2	16.05±0.02	25.90±0.03
	NS-Gr-1	16.00±0.02	25.84±0.02
18	NS-Gr-2	10.93±0.03	14.52±0.02
	NS-Gr-1	10.90±0.02	15.64±0.02
19	NS-Gr-2	12.93±0.03	8.11±0.01

	NS-Gr-1	12.92±0.02	7.49±0.02
Test Tumor Gastric			
1	NS-Gr-2	139.23±0.03	2.95±0.01
	NS-Gr-1	140.10±0.02	2.98±0.01
2	NS-Gr-2	127.98±0.02	2.62±0.03
	NS-Gr-1	124.04±0.02	2.64±0.02
3	NS-Gr-2	115.98±0.02	2.74±0.04
	NS-Gr-1	118.99±0.01	2.80±0.02
4	NS-Gr-2	116.03±0.01	10.39±0.03
	NS-Gr-1	116.47±0.01	9.28±0.02
5	NS-Gr-2	153.00±0.04	17.63±0.03
	NS-Gr-1	152.00±0.02	17.02±0.02
6	NS-Gr-2	143.07±0.01	3.40±0.01
	NS-Gr-1	142.96±0.04	3.49±0.02
7	NS-Gr-2	185.95±0.02	8.50±0.03
	NS-Gr-1	186.38±0.03	8.42±0.02
8	NS-Gr-2	159.14±0.01	7.05±0.02
	NS-Gr-1	160.04±0.02	6.16±0.03
9	NS-Gr-2	385.15±0.03	23.97±0.03
	NS-Gr-1	384.24±0.04	20.98±0.02
10	NS-Gr-2	146.93±0.02	12.83±0.01
	NS-Gr-1	147.88±0.03	12.80±0.02
11	NS-Gr-2	115.02±0.04	23.38±0.01
	NS-Gr-1	114.12±0.02	23.33±0.02
12	NS-Gr-2	132.74±0.04	5.42±0.01
	NS-Gr-1	133.93±0.03	5.27±0.02
13	NS-Gr-2	156.57±0.02	10.11±0.02
	NS-Gr-1	157.40±0.02	10.13±0.03

Tabelul 4.5. Enantioanaliză a argininei în probe de sânge integral recoltate de la voluntari sănătoși.

Proba nr.	Senzori stocastici 3D Enantioselectivi de Tip Ac pe Bază de MnPorph și grafene co-dopați cu NS	L-arginină (mol L⁻¹)
1	NS-Gr-2	13.29±0.02
	NS-Gr-1	13.30±0.03
2	NS-Gr-2	17.40±0.02
	NS-Gr-1	17.79±0.01
3	NS-Gr-2	15.50±0.03
	NS-Gr-1	15.48±0.02
4	NS-Gr-2	16.50±0.01
	NS-Gr-1	16.53±0.02
5	NS-Gr-2	59.95±0.02
	NS-Gr-1	60.03±0.01

S-au înregistrat corelații foarte bune pentru concentrația enantiomerilor de arginină determinată cu ajutorul senzorilor pe bază de NS-Gr-2 și NS-Gr-1. În plus, numai L-arginina a fost găsită în sângele integral al pacienților sănătoși, ceea ce demonstrează că D-arginina poate fi un biomarker pentru detectarea precoce a cancerului gastric, făcând o diferențiere între cancerul gastric și ulcerul gastric.

Pentru o validare suplimentară a senzorilor stocastici 3D de tip ac, enantioselectivi, propuși, au fost preparate soluții sintetice care conțin ambii enantiomeri de arginină și au fost determinate concentrațiile enantiomerilor. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4.6.

Tabelul 4.6. Recuperarea enantiomerilor de arginină atunci când sunt în diferite proporții.

Senzori stocastici 3D Enantioselectivi de Tip Ac pe Bază de MnPorph și grafene co-dopați cu NS	L:D (mol:mol)	%, Regăsire	
		L-arginină	D-arginină
NS-Gr-1	1:1	99.95±0.03	99.98±0.02
	1:2	99.99±0.01	99.97±0.02
	2:1	99.97±0.03	99.97±0.02
	1:10	99.95±0.02	99.99±0.03
	10:1	99.98±0.02	99.97±0.02
NS-Gr-2	1:1	99.93±0.03	99.95±0.04
	1:2	99.95±0.02	99.95±0.03
	2:1	99.97±0.01	99.96±0.03
	1:10	99.98±0.02	99.96±0.03
	10:1	99.98±0.01	99.95±0.03

Tabelul 4.6 arată recuperări foarte mari de L- și D-arginină, în ciuda raportului în care au fost amestecate, dovedind că acestea pot fi recuperate cu o fiabilitate ridicată din amestecuri și că metoda de screening propusă poate fi validată pentru enantioanaliza argininei.

În comparație cu alți senzori utilizați până în prezent pentru analiza argininei (tabelul 4.7), senzorul propus a prezentat limite de determinare mai mici decât cele raportate anterior și sunt capabili să discrimineze între enantiomerii L- și D ai argininei, în timp ce ceilalți nu sunt capabili să discrimineze între enantiomerii argininei.

Tabelul 4.7 Comparație între limitele de determinare ale senzorilor propuși până în prezent și senzorii utilizați în prezenta publicație pentru enantioanaliza argininei.

Senzor	Limită de cuantificare, (mol L ⁻¹)	Ref
Biosenzor potențiomtric	5.0 x 10 ⁻⁴	[162]
Biosenzor amperometric bazat pe urează	7.0 x 10 ⁻⁵	[163]
Biosenzor amperometric bazat pe celule de drojdie/ureză	1.5 x 10 ⁻⁴	[164]
Senzor enzimatic de arginină	5.0 x 10 ⁻⁴	[165]
Senzor stochastic 3D enantioselectiv de tip ac needle stochastic sensor bazat pe MnPorph și grafene dopate cu N,S 1	L-Arg: 1.0 x 10 ⁻¹⁵ D-Arg: 1.0 x 10 ⁻¹⁵	Această lucrare
Senzor stochastic 3D enantioselectiv de tip ac needle stochastic sensor bazat pe MnPorph și grafene dopate cu N,S 2	L-Arg: 1.0 x 10 ⁻¹⁴ D-Arg: 1.0 x 10 ⁻¹⁴	Această lucrare

Capitolul 5: Senzor stocastic 2D enantioselectiv de unică folosință pentru enantioanaliza rapidă în timp real a glutaminei în probe biologice

5.3.1 Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic 2D enantioselectiv

Pentru toate măsurătorile s-a utilizat cronoamperometria efectuată la un potențial constant de 174 mV vs Ag/AgCl. Când s-a aplicat potențialul, enantiomerii au fost extrași de la interfața electrodului și au intrat în canalul porului - în timp ce intrau în canalul porului, intensitatea curentului a devenit zero (timpul necesar pentru a intra în canalul porului, se numește semnătura enantiomerului și este marcat în diagrame ca t_{off}). În timp ce se află în canalul porului, enantiomerii trec prin procese de legare și de redox - timpul necesar pentru a finaliza procesele este marcat pe diagramă ca t_{on} , și se citește între două valori t_{off} .

Pentru determinarea L-glutaminei s-au obținut următoarele caracteristici de răspuns, atunci când calibrarea a fost efectuată în soluții tampon curate: semnătura L-glutaminei (valoare t_{off}) 1.4 ± 0.1 s, domeniul linear de concentrație: 1×10^{-13} - 1×10^{-3} mol L⁻¹, limita de cuantificare 1×10^{-13} mol L⁻¹, sensibilitate: 1.72×10^{10} s⁻¹ mol⁻¹ L, ecuația de calibrare: $\frac{1}{t_{on}} = 0.28 + 1.72 \times 10^{10} C$ ($\langle t_{on} \rangle = s$; $\langle C \rangle = \text{mol L}^{-1}$) cu $r=0.9996$. Atunci când calibrarea a fost repetată în sângele integral de la un voluntar sănătos, graficul de calibrare a fost: $\frac{1}{t_{on}} = 0.30 + 1.74 \times 10^{10} C$ ($\langle t_{on} \rangle = s$; $\langle C \rangle = \text{mol L}^{-1}$) cu $r=0.9999$ și o sensibilitate de 1.74×10^{10} s⁻¹ mol⁻¹ L; domeniul linear de concentrație și limita de cuantificare nu s-au modificat, atunci când s-a folosit sângele integral pentru calibrare.

Pentru analiza D-glutaminei s-au obținut următoarele caracteristici de răspuns atunci când calibrarea a fost efectuată în soluții tampon curate: semnătura D-glutaminei (valoare t_{off}) 0.3 ± 0.1 s, domeniul linear de concentrație: 1×10^{-15} - 1×10^{-3} mol L⁻¹, limita de cuantificare 1×10^{-15} mol L⁻¹, sensibilitate: 1.17×10^{13} s⁻¹ mol⁻¹ L, ecuația de calibrare: $\frac{1}{t_{on}} = 0.26 + 1.17 \times 10^{13} C$ ($\langle t_{on} \rangle = s$; $\langle C \rangle = \text{mol L}^{-1}$) cu $r=0.9998$. Atunci când calibrarea a fost repetată în sângele integral de la un voluntar sănătos, graficul de calibrare a fost: $\frac{1}{t_{on}} = 0.20 + 1.20 \times 10^{13} C$ ($\langle t_{on} \rangle = s$; $\langle C \rangle = \text{mol L}^{-1}$) cu $r=0.9999$ și o sensibilitate de 1.20×10^{13} s⁻¹ mol⁻¹ L; domeniul linear de concentrație și limita de cuantificare nu s-au modificat, atunci când s-a utilizat sângele integral pentru calibrare.

Diferențele dintre valorile semnăturilor au dovedit că senzorul este enantioselectiv, cei doi enantiomeri putând fi determinați simultan în probele biologice. S-au înregistrat valori ridicate ale sensibilității și limite de determinare scăzute, ceea ce a făcut posibilă testarea acestora la persoane sănătoase, dar și la pacienți cu cancer gastric în diferite stadii.

Studiile de reproductibilitate au fost efectuate după cum urmează: 10 senzori au fost fabricați în conformitate cu procedura prezentată în paragraful privind proiectarea senzorilor. Fiecare dintre senzori a fost evaluat în același mod, iar sensibilitățile au fost determinate și comparate atunci când au fost scufundați în soluții de L- și D-glutamină. Valorile RSD (%) înregistrate pentru sensibilități au fost: pentru testul L-glutaminei 0,10 %, iar pentru testul D-glutaminei 0,11 %. Valorile RSD (%) înregistrate pentru sensibilități au dovedit reproductibilitatea designului senzorilor.

Stabilitatea fiecărui senzor 2D (proiectat pentru o singură utilizare) a fost verificată după cum urmează: 10 senzori de fiecare tip au fost depozitați așa cum este descris în paragraful "Proiectarea senzorilor". În fiecare zi, un senzor diferit a fost luat din spațiul de depozitare și a fost scufundat în soluții care conțin L- și D-glutamină de diferite concentrații; sensibilitățile fiecărei măsurători au fost păstrate pentru comparație după ce întregul lot de senzori a fost consumat, în 30 de zile. Rezultatele înregistrate la sfârșitul perioadei au arătat stabilitatea ridicată a electrozilor în timp, deoarece variațiile sensibilităților în timp au fost mai mici de 0,50%.

5.3.2 Selectivitatea și enantioanaliza senzorului stocastic 2D

Selectivitatea și enantioselectivitatea sunt date de semnăturile enantiomerilor și analiților găsiți în probele reale; o diferență în valorile semnăturilor arată că senzorul propus este enantioselectiv și selectiv. Semnăturile analiților nu au depins de matricea din care sunt determinați analiții, ci depind de: stereochemia enantiomerilor; de lungimea și volumul moleculelor, de viteza de deplasare a acestora în interiorul canalului porului. În consecință, toți analiții dintr-o soluție pătrund în canalul porului într-o anumită secvență, ordonată în funcție de lungimea și stereochemia moleculelor. S-au înregistrat semnături diferite (valori t_{off}) pentru L- și D-glutamină folosind același senzor 2D (Tabelul 5.1); acest lucru a dovedit enantioselectivitatea senzorului. Pentru evaluarea selectivității, au fost selectați și alți aminoacizi, cum ar fi triptofanul (try), prolina (pro) și arginina (arg). S-au obținut semnături diferite pentru acești aminoacizi în comparație cu

semnăturile înregistrate pentru L- și D-glutamină, ceea ce dovedește că senzorii 2D sunt, de asemenea, selectivi (Tabelul 5.1).

Tabel 5.1. Selectivitatea senzorilor stocastici 2D de unică folosință (N=10).

Interferent	Semnătură, t_{off} (s)							
	L-gln	D-gln	L-try	D-try	L-pro	D-pro	L-arg	D-arg
-	0.7±0.1	1.9±0.1	2.2±0.1	1.2±0.1	2.0±0.1	2.5±0.2	3.1±0.1	3.5±0.1

Valorile înregistrate pentru semnături sunt fiabile, fiind dependente de dimensiunea și geometria aminoacidului testat.

5.4 Enantioanaliza glutaminei în sânge integral și în probe de țesut tumoral

Sângele integral și probele de țesut au fost prelevate de la pacienți confirmați cu cancer gastric. Probe de sânge integral au fost obținute de la pacienți sănătoși. Probele biologice au fost analizate așa cum au fost prelevate de la pacienți, în conformitate cu metoda stocastică descrisă mai sus.

Acuratețea testelor de screening cu ajutorul senzorilor stocastici 2D enantioselectivi a fost dovedită prin adăugarea unei soluții standard de L- și D-glutamină în probele biologice. Testele de regăsire a L- și D-glutaminei din probe au fost efectuate după cum urmează: L- și D-glutamina au fost inițial determinate din probe, după care s-au adăugat cantități cunoscute de L- și D-glutamină. Cantitățile regăsite de L- și D-glutamină au fost comparate cu cele adăugate în proba de sânge integral.

Tabelul 5.2 prezintă rezultatele obținute pentru 10 probe de sânge integral și 10 probe de țesut tumoral gastric. Probele au fost analizate în mod corespunzător cu metoda stocastică descrisă mai sus, utilizând senzorul stocastic 2D enantioselectiv. L- și D-glutamină au fost identificate în probe pe baza semnăturilor lor, valorile t_{off} (Figura 5.3). Concentrațiile enantiomerilor de glutamină au fost determinate utilizând ecuațiile de calibrare pentru fiecare enantiomer, după ce s-au măsurat în diagrame (Figura 5.3) valorile t_{on} (aceste valori sunt măsurate între două valori t_{off} consecutive - a se vedea Figura 5.3) pentru fiecare enantiomer. Rezultatele au arătat că atât L- cât și D-glutamina au fost găsite în sângele integral și în țesuturile tumorale gastrice ale pacienților confirmați cu cancer gastric (Tabelul 5.2).

Tabel 5.2. Enantioanaliză a glutaminei în sângele integral și în probele de țesut tumoral gastric ale pacienților confirmați cu cancer gastric.

Probă nr.	Enantiomerul glutaminei *	Glutamină, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Exces enantiomeric (%)
Sânge integral			
1	L	2.04±0.03	61.26
	D	0.49±0.02	
2	L	5.84±0.04	89.33
	D	3.29(±0.02) x10 ⁻¹	
3	L	2.13±0.02	58.07
	D	5.65(±0.03) x10 ⁻¹	
4	L	1.76±0.02	34.04
	D	8.66(±0.02) x10 ⁻¹	
5	L	2.35±0.03	99.73
	D	3.22(±0.01) x10 ⁻³	
6	L	2.26±0.03	62.01
	D	0.53±0.03	
7	L	1.06±0.01	92.17
	D	4.32(±0.03) x10 ⁻²	
8	L	4.37±0.04	90.79
	D	2.11(±0.02) x10 ⁻¹	
9	L	1.05±0.01	95.28
	D	2.54(±0.02) x10 ⁻²	
10	L	5.84±0.03	91.70
	D	2.53(±0.01) x10 ⁻¹	
Țesut tumoral gastric			
1	L	1.05±0.01	56.72
	D	0.29±0.02	
2	L	1.33±0.03	69.32
	D	2.41(±0.02) x10 ⁻¹	

3	L	1.66±0.02	86.83
	D	1.17(±0.03) x10 ⁻¹	
4	L	5.83±0.02	64.69
	D	1.25±0.03	
5	L	2.04±0.04	88.37
	D	1.26(±0.02) x10 ⁻¹	
6	L	1.06±0.02	3.64
	D	1.14±0.03	
7	L	1.33±0.02	59.47
	D	3.38(±0.03) x10 ⁻¹	
8	L	3.75±0.03	92.21
	D	1.52(±0.02) x10 ⁻¹	
9	L	1.06±0.03	3.41
	D	0.99±0.02	
10	L	7.51±0.02	95.62
	D	1.68(±0.03) x10 ⁻¹	

* Toate rezultatele reprezintă media a 5 măsurători.

Tabel 5.3. Enantioanaliză a glutaminei în probele de sânge integral ale voluntarilor sănătoși.

Probă nr.	Enantiomerul glutaminei *	L-glutamină, mmol L⁻¹
1	L	0.46±0.02
2	L	0.30±0.02
3	L	0.26±0.01
4	L	0.13±0.02
5	L	0.11±0.01

* Toate rezultatele reprezintă media a 5 măsurători.

S-au colectat probe de sânge integral de la pacienți sănătoși și au fost analizate cu ajutorul senzorilor stocastici; rezultatele enantioanalizei au arătat că la pacienții sănătoși s-a găsit doar

enantiomerul L al glutaminei, nefiind identificată D-glutamina în sângele integral al pacienților sănătoși (Tabelul 5.3). Mai mult, excesul enantiomeric poate fi o reprezentare pentru evoluția bolii.

În comparație cu rezultatele obținute de Meyerhoff et al. [187] utilizând un biosenzor pentru determinarea L-glutaminei ca detector în analiza prin injecție în flux, senzorul stocastic 2D enantioselectiv propus poate fi proiectat mai ușor decât biosenzorul, nu sunt necesare condiții speciale de depozitare pentru senzorul stocastic în comparație cu biosenzorul care trebuie păstrat la 4°C, biosenzorul a avut o stabilitate foarte scăzută în timp, domeniul linear de concentrație este mai larg pentru senzorul stocastic în comparație cu biosenzorul (1×10^{-4} - 1×10^{-2} mol L⁻¹), cu o limită de determinare mai mare pentru biosenzor în comparație cu senzorul stocastic. Biosenzorul poate determina doar L-glutamina, în timp ce senzorul stocastic poate determina în aceeași serie ambii enantiomeri ai glutaminei.

Capitolul 6: Senzori stocastici utilizați în recunoașterea modelelor și cuantificarea Maspin în probe biologice

6.2.1.4 Design-ul microsenzorilor stocastici

Pulberea de grafenă co-dopată cu NS (NSGR) a fost amestecată cu ulei de parafină: 100 mg de pulbere au fost amestecate cu 30 μL de ulei de parafină până la obținerea unei paste omogene. Pasta a fost împărțită în două cantități egale și la fiecare dintre ele s-a adăugat un modificator diferit: în prima pastă, s-au adăugat 50 μL de o soluție de α -ciclodextrină $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, în timp ce în cea de-a doua pastă s-a adăugat 50 μL de o soluție de maltodextrină $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Un fir de argint a servit drept contact între pastă și circuitul extern (Figura 6.1). Fiecare pastă modificată a fost plasată în tuburi de plastic neconductive cu diametrul interior de 150 μm și o lungime de 5 mm. Microsenzorii stocastici au fost spălați cu apă deionizată și uscați între măsurători. Atunci când nu sunt utilizați, aceștia sunt păstrați într-un loc uscat.

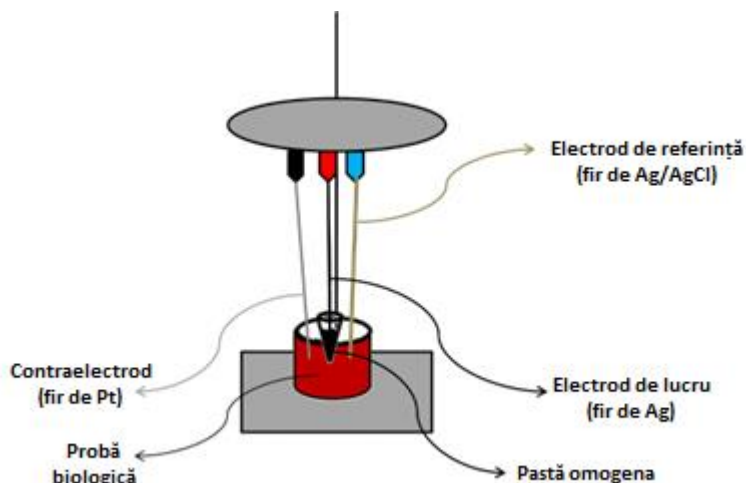


Figura 6.1. Diagrama montajului experimental al celulei electrochimice.

6.2.1.5 Proceduri recomandate: Metoda stocastică

Toate măsurătorile au fost efectuate la 25°C. Pentru măsurătorile t_{on} și t_{off} s-a utilizat o metodă cronoamperometrică la un potențial constant (125 mV față de Ag/AgCl). Pe baza valorii lui t_{off} , analitul a fost identificat în diagramele înregistrate cu microsenzorii stocastici și, în continuare, valoarea lui t_{on} a fost citită și utilizată pentru determinarea concentrației (Figurile 6.2-

6.5). Concentrațiile necunoscute de maspin au fost determinate pe baza graficelor de calibrare $I/t_{on} = a + b \times C_{maspin}$ înregistrate cu fiecare dintre senzorii pentru maspin.

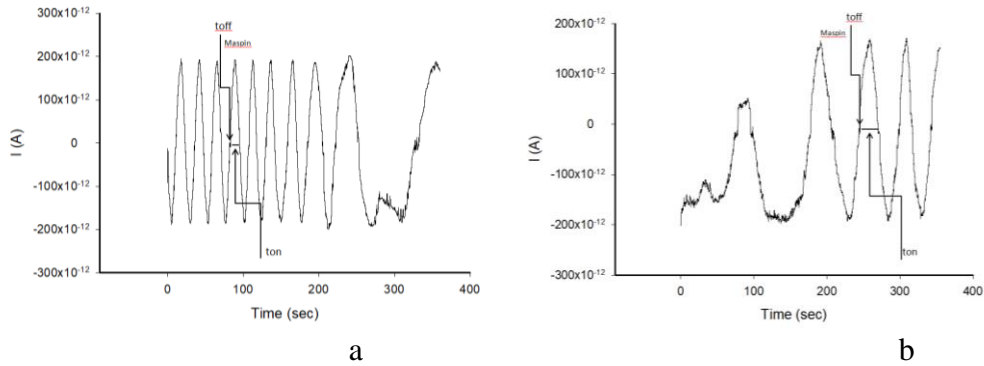


Figura 6.2. Recunoașterea moleculară a maspinului în probe de sânge integral, utilizând microsenzori stocastici pe bază de NSGR și a) α -ciclodextrină și b) maltodextrină.

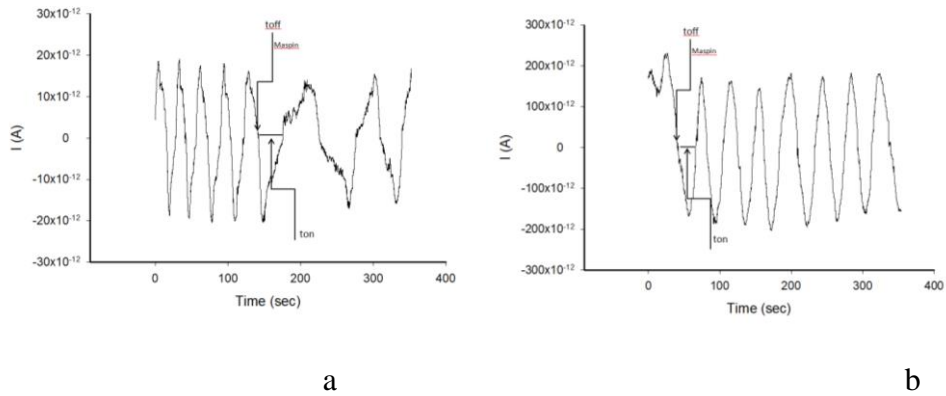


Figura 6.3. Recunoașterea moleculară a maspinului în probe de salivă, utilizând microsenzori stocastici pe bază de NSGR și a) α -ciclodextrină și b) maltodextrină.

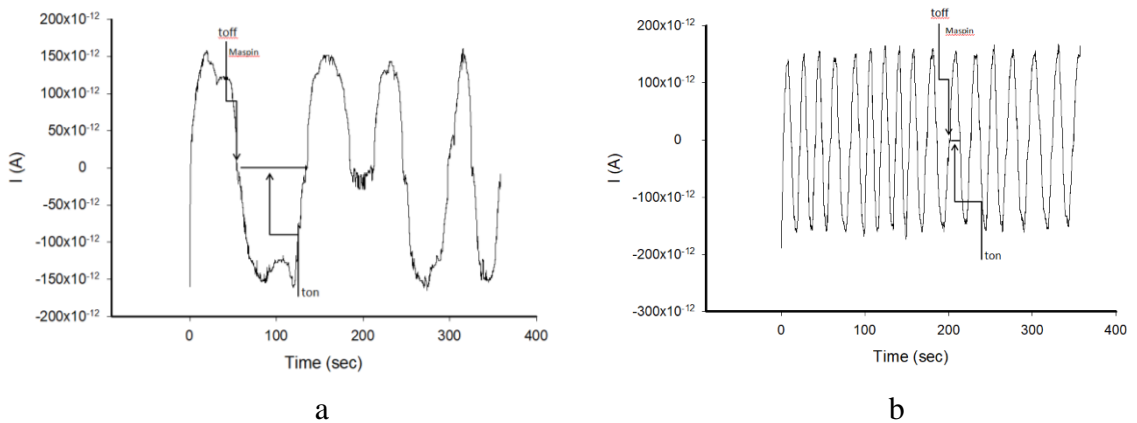


Figura 6.4. Recunoașterea moleculară a maspinului în probele de urină, utilizând microsenzori stocastici pe bază de NSGR și a) α -ciclodextrină și b) maltodextrină.

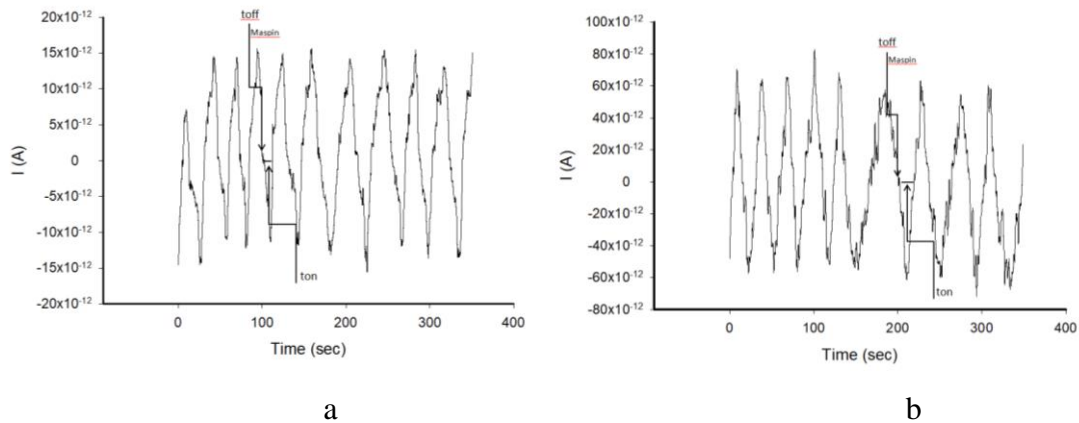


Figura 6.5. Recunoașterea moleculară a maspinului în probe de țesut, utilizând microsenzori stocastici pe bază de NSGR și a) α -ciclodextrină și b) maltodextrină.

6.2.1.6 Probe biologice

Probele biologice, cum ar fi: sânge integral, țesut tumoral gastric, salivă și urină au fost obținute de la Spitalul din Târgu Mureș (aprobarea comitetului de etică nr. 75/2015). Aceste probe au fost obținute de la pacienți confirmați cu cancer gastric, precum și de la pacienți sănătoși. Pacienții nu au fost sub niciun tratament pentru cancer gastric înainte de colectarea probelor. Probele biologice nu au necesitat niciun fel de pretratament înainte de măsurători. Celula electrochimică a fost umplută cu proba biologică și, după înregistrarea diagramei și identificarea semnăturii maspinului, concentrațiile necunoscute ale biomarkerilor în testele biologice au fost determinate utilizând metoda stocastică prezentată mai sus.

6.2.2 Rezultate și discuții

6.2.2.1 Caracterizarea morfologică și structurală a probei NSGR

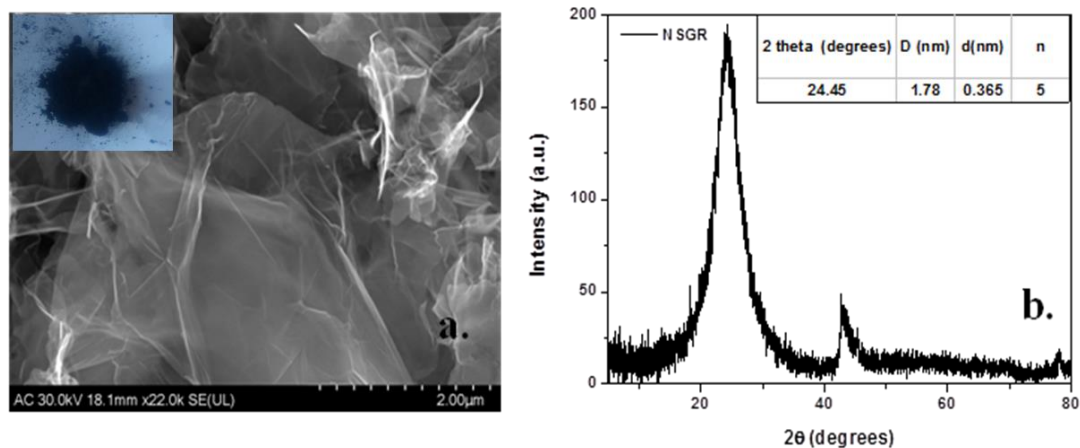


Figura 6.6. SEM (a) și XRD (b) ale probei NSGR

În Fig. 6.6a este prezentată o analiză SEM reprezentativă a probei de grafenă co-dopată NS. Din punct de vedere macroscopic, proba este o pulbere neagră compusă din fulgi mari (a se vedea inserția). Microscopic, fulgii de grafenă sunt subțiri și transparenți, cu dimensiunea laterală de câțiva micrometri. Planul bazal al foii de grafenă apare ca o zonă netedă de culoare gri, în timp ce marginile grafenei apar ca linii luminoase.

Analiza XRD corespunzătoare prezentată în Fig. 6.6b arată un vârf relativ larg centrat la aproximativ 24° , datorat reflexiilor (002), confirmând astfel structura grafenică a materialului preparat. Parametrii structurali calculați pe baza datelor înregistrate sunt prezentați în insertul din Fig. 6b: dimensiunea cristalitelor de grafenă (D) este de aproximativ 1.78 nm, cu o distanță între straturi (d) de 0.365 nm. În plus, cristalitele de grafenă sunt foarte subțiri, fiind compuse din câteva straturi ($n=5$).

6.2.2.2 Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici

Caracteristica de răspuns a senzorilor stocastici se bazează pe conductivitatea canalului: după aplicarea unui potențial de 125mV, molecula biomarkerului intră în canal blocându-l în timp ce intensitatea curentului scade la 0 A. Timpul petrecut pentru acest tip de etapă se numește semnătura maspinului. În următoarea etapă, maspinul suferă procese de legare, precum și procese redox - timpul petrecut pentru aceste procese fiind cunoscut sub numele de t_{on} - și este utilizat pentru măsurători cantitative. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici au fost determinate la două pH-uri, cu valorile 7.40 și 3.00, deoarece trebuie să folosim microsenzorii pentru testarea maspinului în sângele integral, în țesuturile tumorilor gastrice și în salivă (pH 7.40),

precum și în urină (pH 3.00). Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor propuși sunt prezentate în Tabelul 6.1.

Tabel 6.1. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici utilizați pentru testarea maspinului.

Microsenzor stocastic bazat pe NSGR și pe	Ecuatia de calibrare* și coeficientul de corelație (r)	Domeniul liniar de concentrație (g·mL ⁻¹)	t _{off} (s)	Sensibilitate (s ⁻¹ /g·mL ⁻¹)	Limita de cuantificare (g·mL ⁻¹)
pH=7.40					
Maltodextrină	1/t _{on} =0.03+2.95x10 ⁴ xC r=0.9998	4.10x10 ⁻¹⁴ – 2.00x10 ⁻⁶	3.6	2.95x10 ⁴	4.10x10 ⁻¹⁴
α-Ciclodextrină	1/t _{on} =0.03+3.82x10 ⁴ xC r=0.9999	4.10x10 ⁻¹⁴ – 2.00x10 ⁻⁶	2.8	3.82x10 ⁴	4.10x10 ⁻¹⁴
pH=3.00					
Maltodextrină	1/t _{on} =0.03+9.68x10 ² xC r=0.9999	1.02x10 ⁻¹² – 8.00x10 ⁻⁷	3.4	9.68x10 ²	1.02x10 ⁻¹²
α-Ciclodextrină	1/t _{on} =0.04+2.96x10 ³ xC r=0.9995	2.05x10 ⁻¹³ – 2.00x10 ⁻⁶	2.8	2.96x10 ³	2.05x10 ⁻¹³

$$* \langle 1/t_{on} \rangle = s^{-1} \quad \langle C \rangle = g \cdot mL^{-1}$$

Pentru pH 7.40, cea mai mare sensibilitate (panta ecuației de calibrare, 3.82x10⁴ s⁻¹/g·mL⁻¹) a fost înregistrată atunci când s-a utilizat α-ciclodextrina ca modificador, în timp ce domeniul liniar de concentrație și limita de cuantificare rămân aceleași pentru ambii microsenzori stocastici. Limita de cuantificare (considerată cea mai mică valoare a concentrației din domeniul liniar de concentrație) la pH 7.40 este foarte scăzută (4.10x10⁻¹⁴ g·mL⁻¹). Pentru pH 3.00, cea mai mare sensibilitate (2.96x10³ s⁻¹/g·mL⁻¹), precum și cea mai mică limită de cuantificare (2.05x10⁻¹³ g·mL⁻¹) și cel mai larg domeniu liniar de concentrație (2.05x10⁻¹³ – 2.00x10⁻⁶ g·mL⁻¹) au fost obținute pentru microsenzorul bazat pe α-ciclodextrină. În consecință, microsenzorul stocastic pe bază de α-ciclodextrină este microsenzorul de alegere. Microsenzorii stocastici propuși au fost utilizați pentru o perioadă de 6 luni, timp în care nu au fost observate modificări semnificative în ceea ce privește sensibilitatea.

6.2.2.3 Selectivitatea

Selectivitatea microsenzorilor stocastici este dată de semnăturile (valorile t_{off}) ale maspinului și ale posibilelor specii perturbatoare; diferențele dintre semnături înseamnă că microsenzorii sunt selectivi. Speciile interferente selectate au fost: p53, CEA și CA19-9.

Tabel 6.2. Selectivitatea microsenzorilor stocastici utilizați pentru determinarea maspinului.

Microsenzor stocastic bazat pe NSGR și pe	Maspin, Semnatură (s)	CEA, Semnatură (s)	CA19-9, Semnatură (s)	p53, Semnatură (s)
pH=7.40				
Maltodextrină	3.6	2.4	0.5	1.2
α -Ciclodextrină	2.8	1.8	1.2	0.5
pH=3.00				
Maltodextrină	3.4	2.1	1.3	0.8
α -Ciclodextrină	2.8	1.8	1.1	3.2

Rezultatele prezentate în Tabelul 6.2 au demonstrat că CEA, CA19-9 și p53 nu au interferat în determinarea maspinului nici la pH 7.40, nici la pH 3.00.

6.2.3 Recunoașterea modelelor și determinarea maspinului în probele biologice

Probele de sânge integral, țesut tumoral gastric, salivă și urină de la pacienți confirmați cu cancer gastric, precum și probele de sânge integral donate de persoane sănătoase au fost analizate cu ajutorul celor doi microsenzori stocastici. Recunoașterea moleculară a fost realizată mai întâi - pe baza identificării valorii t_{off} (semnatură) specifice maspinului în diagramele obținute cu ajutorul microsenzorilor stocastici propuși. Imediat după citirea valorii t_{off} , între două valori t_{off} , au fost citite valorile t_{on} corespunzătoare. Valorile t_{on} au fost utilizate pentru a determina concentrațiile de maspin în probele biologice, în conformitate cu metoda stocastică descrisă mai sus.

Primul pas al validării a fost testul de regăsire - care a fost efectuat pentru fiecare dintre probele biologice (sânge integral, țesut tumoral gastric, salivă, urină) prin adăugarea unor cantități bine cunoscute de maspin și determinarea, cu ajutorul senzorilor propuși, a procentului de regăsire în fiecare probă biologică. Rezultatele testului de regăsire % sunt prezentate în Tabelul 6.3.

Tabel 6.3. Teste de recuperare a maspinului în probe biologice utilizând microsenzori stocastici (N=10).

Microsenzor stocastic bazat pe NSGR și pe	Maltodextrină	α-ciclodextrină
Tipul de probă	Maspin, Regăsire, %	
Sânge integral	97.89±0.03	99.87±0.02
Țesut tumoral gastric	97.33±0.04	99.47±0.02
Salivă	97.14±0.04	99.12±0.03
Urină	98.83±0.03	99.89±0.03

În cadrul testelor de recuperare s-au înregistrat valori ridicate de regăsire și valori scăzute ale RSD (mai mici de 0.10 %). A doua etapă de validare a fost realizată prin recunoașterea modelelor și determinarea maspinului în sângele integral, țesutul tumoral gastric, saliva, urină. O parte din rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 6.4.

Tabel 6.4. Rezultate obținute pentru cuantificarea maspinului în probe biologice, utilizând microsenzori stocastici (N=10).

Microsenzor stocastic bazat pe NSGR și pe	Maspin, ng mL⁻¹		
	Maltodextrină	α-Ciclodextrină	ELISA
Probă Nr.			
Sânge integral de la pacienți confirmați cu cancer gastric			
1	0.39±0.03	0.38±0.02	0.40
2	0.20±0.02	0.23±0.01	0.24
3	0.30±0.01	0.31±0.03	0.32
4	0.15±0.02	0.16±0.03	0.16
5	0.13±0.02	0.13±0.02	0.15
t-test	2.73	1.83	-
Sânge integral de la voluntari sănătoși			
1	6.21±0.03	6.48±0.03	6.82
2	6.09±0.01	5.92±0.04	6.30
3	9.93±0.03	9.22±0.04	10.02
4	2.35±0.01	2.18±0.03	2.40
5	2.37±0.03	2.03±0.02	2.57
t-test	2.75	1.80	-
Probă de țesut tumoral gastric			
1	0.48±0.03	0.48±0.02	0.50
2	0.30±0.02	0.33±0.03	0.35
3	0.17±0.02	0.18±0.01	0.17
4	0.17±0.01	0.18±0.03	0.19

5	0.23±0.03	0.21±0.02	0.24
t-test	2.58	2.90	-
Salivă			
1	0.42±0.03	0.45±0.02	0.45
2	0.22±0.02	0.25±0.03	0.26
3	0.70±0.03	0.69±0.04	0.70
4	0.32±0.02	0.38±0.03	0.37
5	0.39±0.03	0.39±0.02	0.40
t-test	2.14	1.89	-
Urină			
1	6.59±0.03	6.87±0.02	6.90
2	2.93±0.04	2.67±0.03	2.70
3	7.31±0.02	7.54±0.03	7.55
4	2.37±0.02	2.94±0.03	2.98
5	7.48±0.03	7.45±0.01	7.74
t-test	1.19	1.54	-

Corelații foarte bune între rezultatele s-au obținut cu ajutorul microsenzorilor stocastici și ELISA (un kit standard utilizat în laboratoarele clinice acreditate). S-a efectuat, de asemenea, un test t la un nivel de încredere de 99,00% (valoare t teoretică tabulată: 4.032) pentru fiecare tip de probă și microsenzor, față de ELISA. Toate valorile t calculate au fost mai mici de 4.032, dovedind că nu există o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între rezultatele obținute cu ajutorul microsenzorilor stocastici propuși (Tabelul 6.4). În consecință, microsenzorii stocastici propuși pot fi utilizați în mod fiabil pentru recunoașterea moleculară și cuantificarea maspinului în probele biologice selectate.

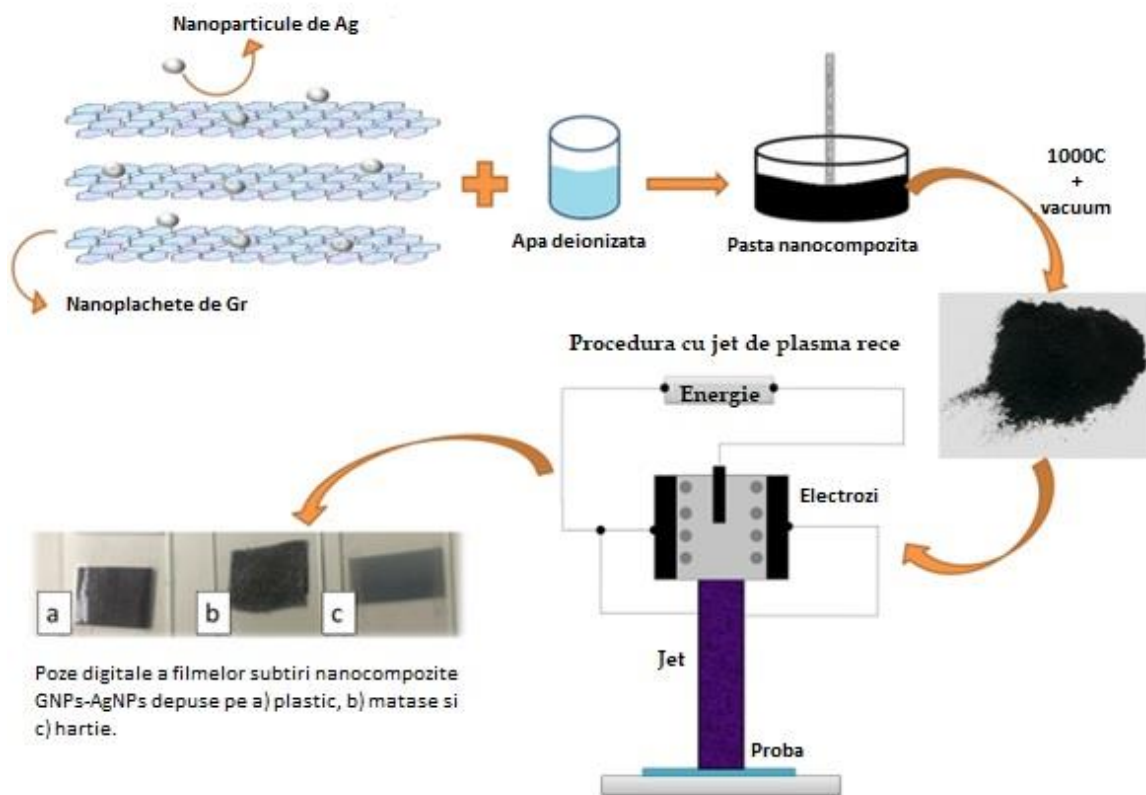
Ambele teste de validare au arătat că microsenzorii stocastici propuși pot fi utilizați în mod fiabil pentru recunoașterea moleculară și cuantificarea maspinului în probele biologice.

6.3 Senzori stocastici pentru recunoașterea modelelor și cuantificarea Maspinului

6.3.1 Experimental

6.3.1.3 Design-ul senzorilor stocastici de unică folosință

Filmele subțiri de material compozit au fost depuse folosind un amestec de nanoplachete de grafenă (GNP) și particule de argint (AgP) ca precursor. Etapele de design sunt prezentate în Schema 6.1.



Schema 6.1. Depunerea de materiale pe plastic, mătase și hârtie cu ajutorul plasmăi reci.

Materialele au fost amestecate manual cu apă dublu deionizată (DI) pentru a obține o soluție de pastă. 4 g de PNG de la Nanografi (nr.: 7782-42-5) și 2 g de AgP (99,9 %) cu dimensiuni diferite în intervalul de mărime de 30-60 μm au fost amestecate în 10 ml de apă DI. Soluția de pastă compozită a fost introdusă la 1000° C timp de 1 h în vid înalt, rezultând o țință solidă care a fost utilizată ca precursor pentru procesul de acoperire. O sursă de plasmă rece dezvoltată în laboratorul nostru, denumită Thermionic Vacuum Arc, a fost utilizată pentru acoperire. Ca substraturi au fost folosite plastic, mătase și hârtie plasate deasupra sursei de plasmă la o distanță de 27 cm, iar depunerea a fost efectuată timp de 20 de minute în condiții de vid înalt (1.3×10^{-5} mBar). Parametrii electrici ai plasmăi au fost: 53 A curent de filament, 1,8 A curent de plasmă și 200 V tensiune de plasmă. Este evident că pelicula subțire nanocompozită GNPs-AgNPs propusă în această lucrare este acoperită uniform pe substraturile organice. Imaginile au arătat că substraturile acoperite au o suprafață aspră, cu mulți nanoclusteri rotunzi și neregulate. Peste electrodul de lucru a fost lăsată să cadă o soluție de chitosan (10^{-5} mol L⁻¹); după aceea, senzorul a fost lăsat să se usuce timp de 24 de ore. Senzorii au fost depozitați în locuri uscate, la temperatura camerei.

6.3.1.4 Metoda stocastică

Pentru modul stocastic, a fost selectată o tehnică cronoamperometrică, pentru care s-a aplicat un potențial constant (125 mV față de Ag/AgCl). Această metodă a fost utilizată atât pentru analiza calitativă, cât și pentru analiza cantitativă a maspinului din sânge integral, salivă, urină și probe de țesut de la pacienți confirmați cu cancer gastric. Doi parametri au fost identificați, t_{off} și, respectiv, t_{on} , din diagramele stocastice (Figurile 6.7-6.10).

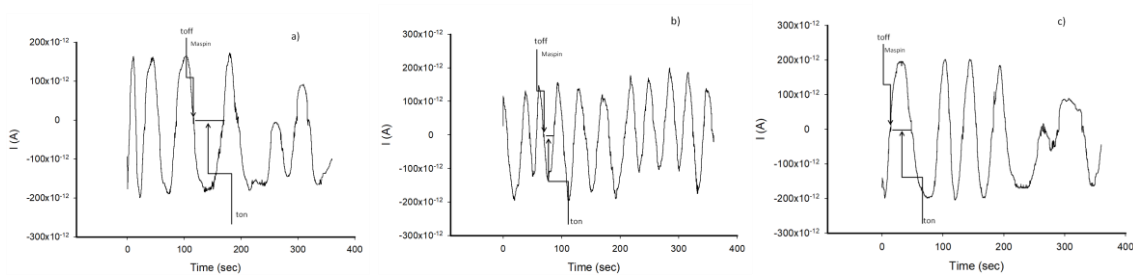


Figura 6.7 Exemple de diagrame obținute pentru testele de depistare a sângelui integral cu ajutorul senzorilor stocastici de unică folosință pe bază de chitosan și GNPs-AgNPs imobilizate pe (a) mătase; (b) hârtie; (c) plastic.

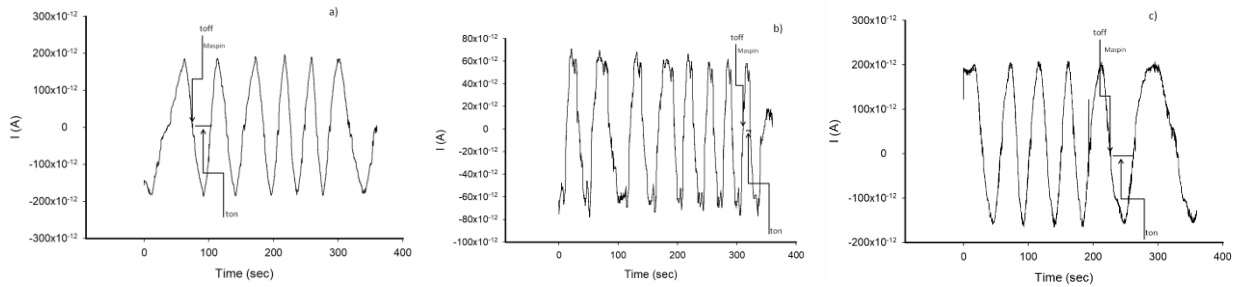


Figura 6.8. Exemple de diagrame obținute pentru testele de depistare a salivei cu ajutorul senzorilor stocastici de unică folosință pe bază de chitosan și GNPs-AgNPs imobilizate pe (a) mătase; (b) hârtie; (c) plastic.

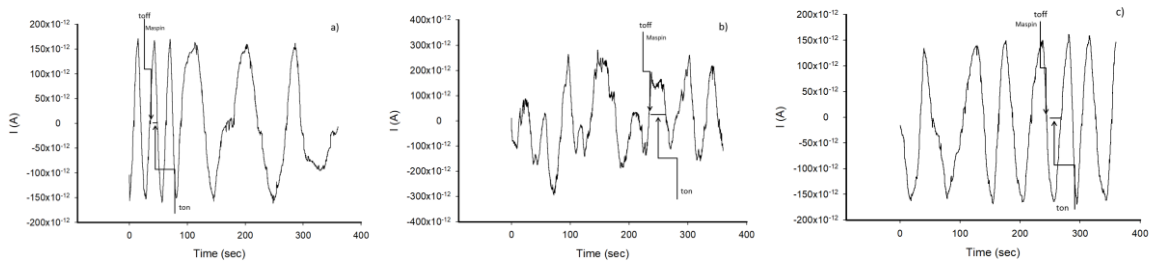


Figura 6.9. Exemple de diagrame obținute pentru testele de depistare a urinei cu ajutorul senzorilor stocastici de unică folosință pe bază de chitosan și GNPs-AgNPs imobilizați pe (a) mătase; (b) hârtie; (c) plastic.

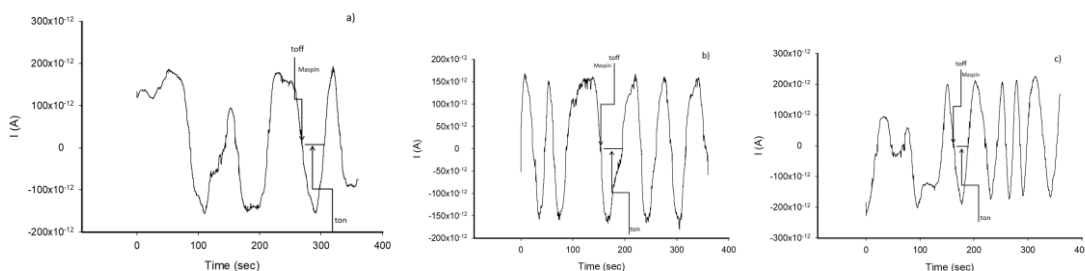


Figura 6.10. Exemple de diagrame obținute pentru testele de depistare a țesuturilor tumorale cu ajutorul senzorilor stocastici de unică folosință pe bază de chitosan și GNPs-AgNPs imobilizate pe (a) mătase; (b) hârtie; (c) plastic.

t_{off} este cunoscută ca semnătura analitului și valoarea sa este utilizată pentru analiza calitativă; pe baza valorii sale, maspinul a fost identificat în diagramele obținute pentru analiza probelor biologice (Figurile 6.7-6.10). După aceea, a fost citită valoarea ton (aceasta este cunoscută ca fiind timpul de echilibru necesar pentru interacțiunea analitului cu canalul de perete și procesele redox) și reprezintă parametrul cantitativ ($1/\text{ton} = a + b \times C_{\text{maspin}}$). Ecuațiile de calibrare au fost obținute prin utilizarea metodei regresiei liniare. Calibrarea a fost efectuată pentru toți senzorii de unică folosință la două valori de pH: 3.00 și 7.40.

6.3.1.5 Probe biologice

Au fost analizate probe biologice, cum ar fi: sânge, țesut, salivă și urină obținute de la pacienți confirmați cu cancer gastric. Pacienții nu au fost supuși niciunui tratament pentru cancer gastric înainte de colectarea probelor. Aceste probe au fost obținute de la Spitalul din Târgu-Mureș (aprobarea comitetului de etică nr. 75/2015). Probele biologice analizate nu au avut nevoie de nicio prelucrare înainte de măsurare. Concentrațiile necunoscute de maspin din probele biologice au fost determinate utilizând modul stocastic descris mai sus.

6.3.2 Rezultate și discuții

6.3.2.1 Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici de unică folosință

Determinarea valorii semnăturii maspinului (t_{off}) a servit pentru analiza calitativă în diagramele obținute pentru probele biologice (Figurile 6.7-6.10, Tabelul 6.5), în timp ce valorile t_{on} au fost utilizate pentru determinarea caracteristicilor de răspuns ale senzorilor (Tabelul 6.5), precum și pentru determinarea cantitativă a maspinului în probele biologice. Caracteristicile de răspuns au fost raportate pentru două valori de pH: 3.00 și 7.40 (Tabelele 6.5); motivul calibrării senzorilor la două pH-uri este acela că nu dorim să efectuăm niciun tratament al probei biologice înainte de măsurători, iar aceste două pH-uri acoperă pH-urile native ale probelor biologice testate.

Pentru ambele pH-uri, atunci când mătasea a fost utilizată ca material suport pentru proiectarea senzorului stocastic de unică folosință, s-au obținut cele mai mari sensibilități: $5.76 \times 10^2 \text{ s}^{-1}/\text{g mL}^{-1}$ pentru pH 7.40 și $7.13 \times 10^3 \text{ s}^{-1}/\text{g mL}^{-1}$ pentru pH 3.00. Pentru senzorii concepuți folosind mătasea ca material de suport s-au obținut intervale liniare de concentrație mai largi: $5.12 \times 10^{-12} - 2.00 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$ pentru pH 7.40, și $4.10 \times 10^{-14} - 2.00 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$ pentru pH 3.00, cu cele mai mici limite de cuantificare de: $5.12 \times 10^{-12} \text{ g mL}^{-1}$ pentru pH 7.40 și $4.10 \times 10^{-14} \text{ g mL}^{-1}$ pentru pH 3.00. O limită de cuantificare foarte scăzută (concentrația cea mai mică din intervalul liniar de concentrație) a fost obținută, de asemenea, atunci când hârtia a fost utilizată ca substrat ($5.12 \times 10^{-12} \text{ g mL}^{-1}$) pentru măsurătorile efectuate la pH-urile 7.40 și 3.00. În general, cel mai bun material - ca suport s-a dovedit a fi mătasea - în ceea ce privește sensibilitatea ridicată și lărgimea intervalului liniar de concentrație.

Tabel 6.5. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici de unică folosință folosiți pentru analiza maspin.

Senzor stocastic de unică folosință bazat pe chitosan și GNPs-AgNPs imobilizate pe	Ecuția de calibrare* și coeficientul de corelație (r)	Domeniul liniar de concentrație ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	t_{off} (s)	Sensibilitate ($\text{s}^{-1}/\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Limita de cuantificare ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
pH=7.40					
Mătase	$1/t_{\text{on}}=0.01+5.76 \times 10^2 \times C$ $r=0.9998$	$5.12 \times 10^{-12} - 2.00 \times 10^{-6}$	2.6	5.76×10^2	5.12×10^{-12}
Hârtie	$1/t_{\text{on}}=0.04+1.24 \times 10^2 \times C$ $r=0.9999$	$5.12 \times 10^{-12} - 8.00 \times 10^{-7}$	2.8	1.24×10^2	5.12×10^{-12}
Plastic	$1/t_{\text{on}}=0.02+7.21 \times 10^2 \times C$ $r=0.9999$	$1.60 \times 10^{-8} - 2.00 \times 10^{-6}$	2.4	7.21×10^2	1.60×10^{-8}
pH=3.00					
Mătase	$1/t_{\text{on}}=0.06+7.13 \times 10^3 \times C$ $r=0.9999$	$4.10 \times 10^{-14} - 2.00 \times 10^{-6}$	3.0	7.13×10^3	4.10×10^{-14}
Hârtie	$1/t_{\text{on}}=0.02+7.37 \times 10^2 \times C$ $r=0.9995$	$5.12 \times 10^{-12} - 2.00 \times 10^{-6}$	2.8	7.37×10^2	5.12×10^{-12}
Plastic	$1/t_{\text{on}}=0.04+4.01 \times 10^3 \times C$ $r=0.9993$	$2.04 \times 10^{-13} - 8.00 \times 10^{-7}$	2.2	4.01×10^3	2.04×10^{-13}

$$* \langle 1/t_{\text{on}} \rangle = \text{s}^{-1} \langle C \rangle = \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

S-au efectuat studii de reproductibilitate pentru fiecare tip de senzor. În acest sens, au fost fabricați 10 senzori de fiecare tip în conformitate cu procedura prezentată la paragraful privind proiectarea senzorilor. Fiecare dintre senzori a fost evaluat în același mod, iar sensibilitățile au fost determinate și comparate atunci când au fost scufundați în soluții de masină cu pH-uri de 3.00 și 7.40. Valorile RSD (%) înregistrate pentru sensibilități au fost: pentru senzorii pe bază de mătase: 0.12 % la pH 7.40 și 0.15 % la pH 3.00; pentru senzorii pe bază de hârtie: 0.10% la pH 7.40 și 0.17% la pH 3.00; și pentru senzorul pe bază de plastic: 0.09% la pH 7.40 și 0.08% la pH 3.00. Valorile RSD (%) înregistrate pentru sensibilități au dovedit reproductibilitatea designului senzorilor.

Stabilitatea fiecărui senzor 2D (proiectat pentru o singură utilizare) a fost verificată după cum urmează: 60 de senzori de fiecare tip au fost depozitați așa cum este descris în paragraful "Proiectarea senzorilor". În fiecare zi a fost luat din locul de depozitare un alt senzor care a fost scufundat în soluții care conțin maspin de diferite concentrații și la pH-uri de 3.00 și 7.40; sensibilitățile fiecărei măsurători au fost păstrate pentru comparație după ce tot lotul de senzori a fost consumat, în 30 de zile. Rezultatele înregistrate la sfârșitul perioadei au arătat o stabilitate ridicată a electrozilor în timp, deoarece variațiile sensibilităților în timp au fost: pentru senzorii pe bază de mătase: 0.06% la pH 7.40 și 0.03% la pH 3.00; pentru senzorii pe bază de hârtie: 0.05% la pH 7.40 și 0.03% la pH 3.00; și pentru senzorii pe bază de plastic: 0.07% la pH 7.40 și 0.05% la pH 3.00.

6.3.2.2 Selectivitatea

Selectivitatea senzorilor stocastici de unică folosință este dată de valorile t_{off} (semnături) înregistrate pentru diferite interferențe posibile. CEA, CA 19-9, p53, glucoza, glutamina și CA72-4 au fost verificate ca posibile interferențe, la ambele pH-uri: 7.40 și 3.00.

Tabel 6.6. Selectivitatea senzorilor stocastici de unică folosință folosiți pentru analiza maspinului.

Senzor stocastic de unică folosință bazat pe chitosan și GNPs-AgNPs imobilizate pe	Maspin, Semnatu ră (s)	CEA, Semnat ură (s)	CA19-9, Semnatură (s)	p53, Semnatură (s)	Glucoză, Semnatură (s)	Glutamine, Semnatură (s)	CA72-4, Semnatură (s)
pH=7.40							
Mătase	2.6	1.4	0.7	3.0	0.3	1.7	3.1
Hârtie	2.8	1.5	0.5	3.5	0.2	1.9	3.3
Plastic	2.4	1.5	0.8	3.2	0.2	1.8	2.7
pH=3.00							
Mătase	3.0	1.7	0.5	2.3	1.0	0.7	2.8
Hârtie	2.8	1.8	0.4	2.1	0.7	1.3	2.8
Plastic	2.2	1.8	0.6	2.6	0.2	1.3	3.0

Tabelul 6.6 arată că niciuna dintre substanțele selectate nu interferează în determinarea maspinului, nici la pH 7.40, nici la pH 3.00, deoarece semnăturile lor sunt diferite de semnătura maspinului.

6.3.3 Recunoașterea moleculară și cuantificarea Maspin în probele biologice

Cei trei senzori stocastici de unică folosință au fost utilizați pentru depistarea rapidă a probelor biologice: sânge integral, țesuturi tumorale gastrice, urină și salivă obținute de la pacienți cu cancer gastric, precum și a probelor de sânge integral obținute de la voluntari sănătoși. În primul rând, maspina a fost identificată în diagrame (Figurile 6.7-6.10) pe baza semnăturii sale, iar apoi tonul corespunzător a fost citit și utilizat așa cum este descris în modul stocastic pentru determinarea concentrației de maspin. Rezultatele pentru 5 eșantioane din fiecare categorie sunt prezentate în tabelul 6.7; au fost analizate peste 100 de eșantioane; valoarea testului t este cea rezultată după analiza tuturor eșantioanelor. Există o corelație foarte bună între rezultatele obținute cu ajutorul senzorilor stocastici de unică folosință și ELISA - care este metoda standard utilizată în laboratoarele acreditate.

Tabel 6.7 Rezultate obținute pentru depistarea rapidă a probelor biologice cu ajutorul senzorilor stocastici de unică folosință (N=10).

Senzor stocastic de unică folosință bazat pe chitosan și GNPs-AgNPs imobilizate pe	Gen	Vârsta	Hârtie	Mătase	Plastic	ELISA
Probă Nr.						
Sânge integral de la pacienți confirmați cu cancer gastric						
1	M	60	0.39±0.03	0.34±0.02	0.38±0.01	0.40±0.11
2	M	69	0.21±0.03	0.23±0.03	0.23±0.03	0.24±0.11
3	F	65	0.27±0.02	0.28±0.03	0.28±0.02	0.28±0.13
4	M	69	0.14±0.02	0.14±0.02	0.15±0.01	0.16±0.10
5	M	73	0.12±0.03	0.14±0.02	0.12±0.01	0.15±0.13
t-test			1.98	2.03	2.12	-
F-test			1.23	1.58	1.87	-
Sânge integral de la voluntari sănătoși						
1	M	25	6.74±0.03	6.41±0.02	6.94±0.03	6.82±0.14
2	M	76	6.50±0.03	6.36±0.02	6.25±0.04	6.30±0.14
3	M	68	9.31±0.02	9.67±0.03	9.40±0.05	10.02±0.13
4	F	60	2.17±0.04	2.85±0.03	2.88±0.03	2.90±0.11
5	M	83	2.14±0.03	2.59±0.02	2.51±0.03	2.57±0.11
t-test			2.03	1.97	2.05	-
F-test			1.66	1.85	1.96	-
Probă de țesut tumoral gastric						
1	M	60	0.48±0.02	0.49±0.03	0.50±0.03	0.50±0.12
2	M	69	0.27±0.03	0.25±0.04	0.26±0.03	0.27±0.12

3	F	65	0.15±0.01	0.16±0.03	0.16±0.02	0.17±0.13
4	M	69	0.14±0.01	0.15±0.02	0.15±0.03	0.15±0.13
5	M	73	0.26±0.03	0.25±0.02	0.23±0.01	0.24±0.12
t-test			2.12	2.35	2.05	-
F-test			1.40	1.57	1.23	-
Salivă						
1	M	60	0.45±0.03	0.46±0.03	0.47±0.02	0.47±0.12
2	M	69	0.28±0.03	0.29±0.04	0.26±0.03	0.27±0.14
3	F	65	0.68±0.03	0.69±0.02	0.65±0.03	0.70±0.14
4	M	69	0.34±0.02	0.31±0.03	0.31±0.04	0.32±0.12
5	M	73	0.40±0.04	0.41±0.03	0.41±0.02	0.40±0.11
t-test			2.19	2.22	2.27	-
F-test			1.23	1.48	1.17	-
Urină						
1	M	60	6.74±0.02	6.78±0.03	6.28±0.03	6.80±0.13
2	M	9 ⁶	2.71±0.03	2.52±0.03	2.39±0.04	2.40±0.11
3	F	5 ⁶	7.30±0.03	7.44±0.04	7.46±0.04	7.45±0.11
4	M	9 ⁶	2.34±0.01	2.35±0.03	2.30±0.04	2.30±0.12
5	M	3 ⁷	7.55±0.03	7.82±0.02	7.07±0.01	7.83±0.11
t-test			2.21	2.94	3.10	-
F-test			1.45	1.19	2.04	-

A fost efectuat un test t student împerecheat la un nivel de încredere de 99,00% (valoare t teoretică tabulată: 4,032). Valorile t calculate pentru fiecare dintre senzori și pentru fiecare tip de probă au fost mai mici de 4,032; acest rezultat a dovedit că nu există o diferență semnificativă din

punct de vedere statistic între rezultatele obținute cu ajutorul senzorilor stocastici propuși (tabelul 6.7) și că senzorii stocastici de unică folosință pot fi utilizați în mod fiabil pentru recunoașterea moleculară și cuantificarea maspinului în probele biologice selectate. S-a efectuat, de asemenea, un test F pentru fiecare test de screening atunci când senzorii propuși au fost utilizați ca instrumente de screening. Deoarece valorile F calculate (tabelul 3) sunt mai mici decât valoarea F tabelată (6,39, la un nivel de încredere de 95 %), se concluzionează că nu există o diferență semnificativă în ceea ce privește precizia metodei de screening propuse utilizând senzorii stocastici 2D și ELISA (abaterile standard provin doar din erori aleatorii și nu depind de eșantion).

În plus, validarea a fost efectuată prin metoda de adăugare standard, care a implicat adăugarea unor cantități bine cunoscute de maspin în fiecare tip de probă biologică: sânge integral, probă de țesut, urină și salivă. Testele de recuperare a cantităților cunoscute sunt prezentate în Tabelul 6.8.

Tabel 6.8 Teste de recuperare a maspinului în probe biologice cu ajutorul senzorilor stocastici de unică folosință (N=10).

Senzor stocastic de unică folosință bazat pe chitosan și GNPs-AgNPs imobilizate pe	Hârtie	Mătase	Plastic
Tipul probei	Maspin, Regăsire, %		
Sânge integral	97.45±0.05	99.47±0.03	98.98±0.03
Țesut tumoral gastric	96.82±0.03	99.98±0.02	97.99±0.04
Salivă	98.03±0.03	99.00±0.04	98.85±0.02
Urină	98.13±0.03	99.21±0.03	99.07±0.03

S-au obținut valori de recuperare foarte ridicate pentru maspin atunci când a fost determinat din cele patru tipuri de probe biologice. Aceste valori au demonstrat, de asemenea, că senzorii stocastici de unică folosință propuși pot fi utilizați pentru o recunoaștere și o cuantificare fiabilă a maspinului în probele biologice.

Capitolul 7: Determinarea p53 din probe de sânge integral folosind un senzor electrochimic bazat pe grafenul decorat cu N și S

7.1 Introducere

Cancerul este o boală cu mortalitate ridicată în societatea modernă și este cauza unei rate ridicate a tuturor deceselor la nivel global [203]. Monitorizarea biomarkerilor de cancer în stadii incipiente este deosebit de importantă pentru furnizarea de informații vitale de diagnosticare și de terapie eficientă și care să economisească timp.

Proteina p53 este un supresor tumoral bine cunoscut care joacă un rol vital în repararea ADN-ului, apoptoza și proliferarea celulară [204]. Există studii în care s-a demonstrat că, în cazul șoarecilor, șoarecii complet dezvoltați cărora le lipsește proteina p53 suferă de diferite tipuri de cancer; în cazul oamenilor, mai mult de 50% din toate cancerurile dezvoltă în timp un anumit tip de mutații [205,206]. În consecință, detectarea precisă a biomarkerului cancerului proteina p53 este foarte importantă pentru diagnosticarea precoce și terapia eficientă a cancerului. Datorită faptului că, în mai mult de jumătate din cazurile de cancer, proteina p53 suferă mutații, s-a constatat că în serurile umane nivelul proteinei este chiar scăzut în comparație cu nivelurile normale [206], fiind foarte de dorit dezvoltarea unei tehnici analitice sensibile, fiabile și selective pentru detectarea nivelului de p53.

Până în prezent, au fost dezvoltate diferite tehnici pentru determinarea biomarkerilor proteici, pentru detectarea p53 până în prezent, cele mai bune performanțe au fost obținute folosind rezonanța plasmonului de suprafață (SPR) [207], tranzistori cu efect de câmp [208], tehnici de sondare a ADN-ului [209], inclusiv testele imunoenzimatică (ELISA) [210], electrochimiluminiscentă (ECL) [211]. Dintre acestea, tehnicile electrochimice au primit o atenție largă datorită procedurii lor simple, selectivității ridicate și economiei de timp [212-219].

În această lucrare am propus un senzor electrochimic pe bază de grafenă decorată cu N și S, modificată cu soluție de clorură de mangan (III) 2,3,7,8,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfirină pentru determinarea p53 în probe de sânge integral.

7.2.3 Designul Senzorului Electrochimic

Pasta utilizată ca parte activă a senzorului electrochimic a fost obținută prin amestecarea fizică a 100 μ L de soluție de clorură de 2,3,7,8,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfirină mangan

(III) (10^{-3} mol L⁻¹) cu 100mg de pastă (obținută prin amestecarea grafenului decorat cu N și S cu ulei de parafină). Pasta modificată a fost plasată într-un tub de polimer neconductor cu un diametru intern de 150μm. Contactul electric a fost realizat cu ajutorul unui fir de argint. Între măsurători, senzorul a fost spălat cu apă deionizată și uscat. Atunci când nu a fost utilizat, senzorul a fost păstrat într-un loc uscat la temperatura camerei.

7.2.4 Procedură recomandată

DPV a fost utilizat pentru măsurătorile fiecărei soluții standard de concentrație cunoscută (1.0×10^{-8} μg mL⁻¹ – 5.00μg/mL). Parametrii de lucru au fost următorii: rata de scanare a fost de 90 mVs⁻¹, intervalul de potențial -1 – 0.750 V și amplitudinea de modulare 50 mV. Ecuația de calibrare ($I=f(\text{Conc.p53})$) a fost obținută prin metoda de regresie liniară și a fost utilizată pentru calculele concentrațiilor necunoscute de p53 în probele de sânge integral. Graficul de calibrare este prezentat în Figura 7.1.

7.2.5 Probe biologice

Probele de sânge integral au fost obținute de la Spitalul Clinic Județean de Urgență Târgu Mureș (aprobarea comitetului de etică nr. 75/2015) de la 5 pacienți diferiți diagnosticați cu cancer gastric. Aceste probe au fost utilizate pentru testarea directă a p53 fără niciun fel de pretratament.

7.2.6 Studii de selectivitate

Studiul selectivității senzorului electrochimic a fost realizat față de: CEA, acid L- și D-aspartic și L- și D-glutamină. Metoda soluției mixte a fost utilizată pentru a determina dacă există interferențe. La prepararea soluțiilor mixte s-a luat în considerare un raport de 1:10 (mol/mol; p53: interferent).

7.3 Rezultate și discuții

7.3.1 Răspunsul caracteristic al senzorului electrochimic propus

Tehnica DPV (Differential pulse voltammetry) a fost utilizată pentru a determina caracteristicile de răspuns ale senzorului electrochimic propus, atunci când este utilizat pentru

testarea p53. Potențialul de jumătate de undă a fost înregistrat la -351 mV. Ecuația de calibrare a fost:

$$I = 5.79 \times 10^{-7} + 2.89 \times 10^{-8} \times C_{p53},$$

unde I este înălțimea vârfului în A, iar C_{p53} este concentrația în $\mu\text{g mL}^{-1}$. Coeficientul de corelație, r , este de 0.9532. Sensibilitatea senzorului electrochimic este de $2.89 \times 10^{-8} \text{ A}/\mu\text{g mL}^{-1}$. Intervalul liniar de concentrație a fost cuprins între 8 ng mL^{-1} și $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Limita de detecție a fost determinată ca fiind de 0.1 ng mL^{-1} .

Rezultatele au arătat o valoare bună a sensibilității și o limită scăzută de determinare a p53. Senzorul propus a acoperit intervalul în care p53 poate fi găsit la persoanele sănătoase, precum și la pacienții care prezintă stadii 1-3 de cancer gastric.

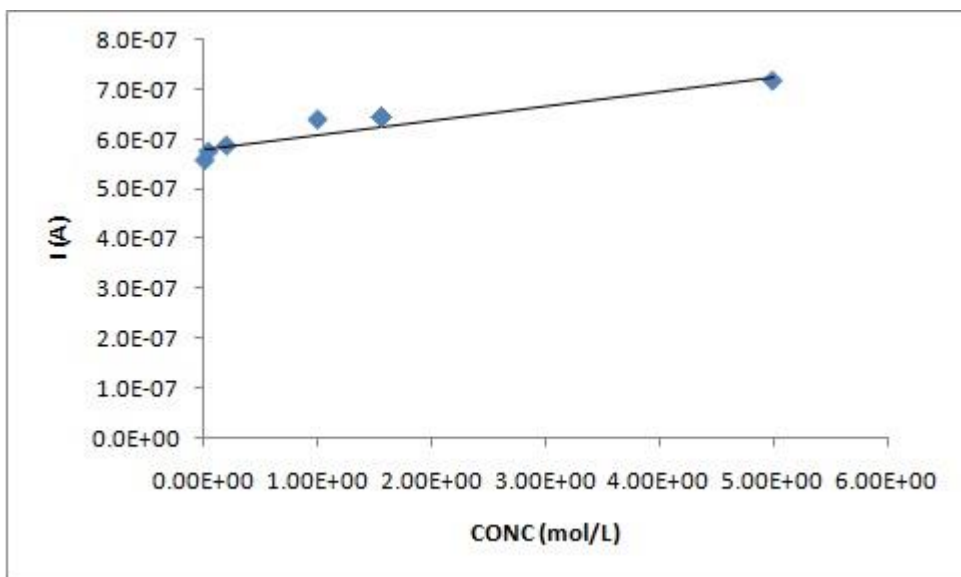


Figura 7.1. Graficul de calibrare obținut pentru p53 cu ajutorul senzorului pe bază de pastă de grafen modificată.

7.3.2 Selectivitatea senzorului electrochimic

Pentru evaluarea selectivității senzorului electrochimic propus s-a utilizat metoda soluției mixte, așa cum a fost descrisă mai sus. Valorile obținute pentru coeficienții de selectivitate amperometrică sunt prezentate în Tabelul 7.1.

Tabel 7.1 Coeficienții de selectivitate obținuți pentru senzorul electrochimic.

Interferent	Coeficient de selectivitate amperometrică
L- acid aspartic	4.00×10^{-3}
D- acid aspartic	4.07×10^{-4}
L- glutamină	4.17×10^{-4}
D- glutamină	4.68×10^{-4}
CEA	1.99×10^{-6}

Coeficienții de selectivitate amperometrică au fost determinați cu ajutorul următoarei ecuații:

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

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 albă, $\Delta I_i = \Delta I_i - \Delta I_b$, unde ΔI_i este intensitatea curentului înregistrat pentru ionul principal, c_i și c_j sunt concentrațiile ionului principal și ale ionilor interferenți.

Valorile obținute pentru coeficienții de selectivitate amperometrică au arătat că acidul L- aspartic interferează ușor în determinarea p53, în timp ce acidul D- aspartic, L- glutamina, D- glutamina și CEA nu au interferat în testul p53.

7.4 Determinarea p53 în probele de sânge integral

Cinci probe de sânge integral au fost analizate cu ajutorul senzorului electrochimic propus. Nu s-a efectuat nicio pretratare înainte de măsurători. DPV a fost utilizat pentru a analiza p53 în probele de sânge. Celula a fost umplută cu sânge integral și s-a măsurat înălțimea vârfului. Rezultatele măsurătorilor de voltametrie cu impulsuri diferențiale sunt prezentate în Tabelul 7.2.

În Figura 7.2 este ilustrat un exemplu de voltammogramă obținută în urma măsurărilor efectuate utilizând modul DPV pentru determinarea p53 în proba de sânge integral.

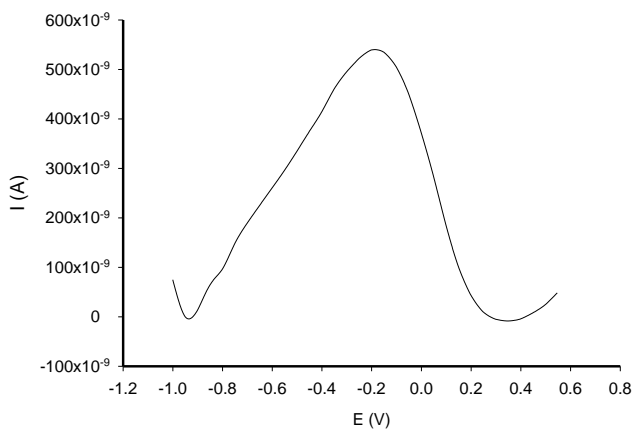


Figura 7.2. Exemplu de voltammogramă obținută pentru determinarea p53 în proba de sânge integral.

Tabel 7.2 Determinarea p53 în probele de sânge integral utilizând senzorul electrochimic și ELISA.

Probă Nr.	ng mL ⁻¹ , p53	
	ELISA	Senzor electrochimic *
1	39.87	40.00±0.09
2	30.95	31.00±0.12
3	36.15	36.10±0.13
4	23.07	23.00±0.10
5	32.30	32.21±0.12

*N=10

Rezultatele au arătat o corelație foarte bună între rezultatele obținute cu ajutorul ELISA (o metodă standard utilizată în laboratoarele clinice) și rezultatele obținute cu ajutorul senzorilor electrochimici în modul DPV.

7.5 Concluzii

Senzorul electrochimic propus a prezentat rezultate foarte bune pentru testul de recuperare, ceea ce îl face un instrument fiabil pentru măsurarea p53 în probele de sânge integral. Senzorul a fost foarte sensibil și a prezentat o selectivitate excelentă pentru detectarea p53 din probele de sânge.

Avantajele metodei propuse în comparație cu tehnici precum ELISA sunt: este o metodă simplă și ușoară, cu costuri reduse, timp de analiză scurt și limită de cuantificare scăzută, contribuind la diagnosticarea într-un stadiu foarte timpuriu a cancerului gastric.

Concluzii și activități viitoare

Au fost concepuți, caracterizați și utilizați diferiți senzori și microsenzori stocastici 2D și 3D pentru recunoașterea moleculară a aminoacizilor (acid aspartic, arginină, glutamină), a maspinului și a p53.

Enantioanaliza acidului aspartic este esențială pentru diagnosticarea rapidă și timpurie a unor boli, cum ar fi cancerul gastric. Prin urmare, au fost propuși doi senzori stocastici 3D pe bază de grafenă dopată cu sulf și protoporfirină IX ca noi instrumente pentru testul de screening al sângelui integral. Sensibilitatea, selectivitatea și enantioselectivitatea ridicate au făcut din ei buni candidați ca noi instrumente pentru testele de depistare a acidului L- și D-aspartic în sângele integral. Senzorii propuși au avut ca caracteristici aplicații în analiza clinică pentru recunoașterea și cuantificarea rapidă a enantiomerilor acidului aspartic, în vederea diagnosticării corecte și rapide a acestor enantiomeri, cum ar fi cancerul gastric.

Doi senzori stocastici cu ac 3D enantioselectivi pe bază de grafenă decorată cu atomi de N și S au fost proiectați, caracterizați, validați și utilizați pentru enantioanaliza argininei în probe biologice (sânge integral și probe de țesut tumoral gastric) colectate de la pacienți confirmați cu cancer gastric și de la voluntari sănătoși. Rezultatele arată că prezența D-argininei poate indica într-un stadiu incipient prezența cancerului gastric și, de asemenea, poate face diferența între cancerul gastric și ulcerul gastric. Caracteristica principală a senzorilor stocastici propuși este utilizarea lor pentru diagnosticarea precoce a cancerului gastric.

A fost propus un senzor stocastic 2D enantioselectiv de unică folosință pentru enantioanaliza glutaminei în sângele integral și în eșantioanele de țesut tumoral gastric. Sensibilitatea ridicată a senzorului, precum și intervalul larg de concentrație de lucru au făcut posibilă analiza probelor provenite de la pacienți confirmați cu cancer gastric, dar și de la voluntari sănătoși. Caracteristica principală este utilizarea sa pentru teste de screening rapide pentru depistarea precoce a cancerului gastric, bazate pe identificarea D-glutaminei, cuantificarea L-, și D-glutaminei, precum și determinarea excesului enantiomeric, mai ales că senzorii au fost conectați la un dispozitiv mobil capabil să înregistreze și să citească diagramele.

Au fost concepuți, caracterizați și validați doi microsenzori stocastici pe bază de grafenă codopată cu N și S și modificată cu α -ciclodextrină și maltodextrină, pentru recunoașterea

modelelor și cuantificarea maspinului în sângele integral, țesutul tumorii gastrice, salivă și urină. Rezultatele obținute au demonstrat că cei doi microsenzori stocastici sunt instrumente puternice pentru testele de depistare rapidă a maspinului în sângele integral, țesutul tumoral, saliva și urina, în vederea stabilirii unui diagnostic rapid al cancerului gastric.

Senzorii stocastici de unică folosință au fost concepuți prin depunerea unui nanocompozit de grafenă (nanograf - nanogold) pe mătase, plastic și hârtie, pentru recunoașterea moleculară și cuantificarea maspinelor în probe biologice. Principalele avantaje ale acestor senzori sunt: costul redus, nu a fost necesară pregătirea probelor, sensibilitatea și fiabilitatea ridicată a măsurătorilor și lipsa contaminării încrucișate, deoarece sunt utilizați o singură dată pentru măsurători.

Senzorul electrochimic propus a prezentat rezultate foarte bune pentru testul de recuperare, ceea ce îl face un instrument fiabil pentru măsurarea p53 în probele de sânge integral. Senzorul a fost foarte sensibil și a prezentat o selectivitate excelentă pentru detectarea p53 din probele de sânge. Avantajele metodei propuse în comparație cu tehnici precum ELISA sunt: este o metodă simplă și ușoară, cu costuri reduse, timp de analiză scurt și limită de cuantificare scăzută, contribuind la diagnosticarea într-un stadiu foarte timpuriu a cancerului gastric.

Activități viitoare

Caracteristicile senzorilor stocastici propuși și ale metodei de screening sunt utilizarea lor în laboratoarele clinice pentru analiza probelor de sânge integral, urină și salivă, precum și în laboratoarele de anatomopatologie pentru analiza țesuturilor tumorale, ca alternativă la analiza colorimetrică semicantitativă, fiind un tip de instrumente și analize extrem de fiabile și rentabile. Metoda va ajuta la diagnosticarea rapidă a cancerului gastric.

Prin urmare, se va realiza o etapă următoare în validarea lor - în principal, ducerea lor în clinici și spitale, unde pot fi utilizate pentru teste de screening.

Referințe Selectate

- [1] Disse E., Bussier A. L., Veyrat-Durebex C., Deblon N., Pfluger P. T., Tschöp M. H., Laville M., Rohner-Jeanrenaud F., Peripheral ghrelin enhances sweet taste food consumption and preference, regardless of its caloric content, **Physiol. Behav.**, **vol.101**, no.2, 2010, 277-281.
- [2] Fujiwara S., Imada T., Nakagita T., Okada S., Nammoku T., Abe K., Misaka T., Sweeteners interacting with the transmembrane domain of the human sweet-taste receptor induce sweet-taste synergism in binary mixtures, *Food Chem.*, **vol.130**, no.3, 2012, 561-568.
- [3] Gardner C., Wylie-Rosett J., Gidding S. S., Steffen L. M., Johnson R. K., Reader, D., Lichtenstein, A. H, Nonnutritive Sweeteners: current use and health perspectives, *Diabetes Care*, **vol.35**, no.8,2012, 1798-1808.
- [4] Huth P. J., Fulgoni V. L., Keast D. R., Park K., Auestad N., Major food sources of calories, added sugars, and saturated fat and their contribution to essential nutrient intakes in the U.S. diet: Data from the national health and nutrition examination survey (2003-2006), *Nutr. J.*, **vol.12**, no. 1, article no. 116, 2013, 1-10.
- [5] Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M. Estimates of worldwideburden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 2010,127,2893-2917.
- [6] Leal MF, Assumpção PP, Smith MC, Burbano RR. Searching for Gastric Cancer BiomarkersThroughProteomicApproaches. *J GastroenterolHepatol*, 2014, 3(3),989-995.
- [7] Braik T., Gupta S., Poola H., Jain P., Beiranvand A., Lad T.E., Hussein L. Carcino embryonic antigen (CEA) elevation as a predictor of better response to first line pemetrexed in advanced lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* 2012, 7, S310.
- [8] Yu D.H., Li J.H., Wang Y.C., Xu J.G., Pan P.T., Wang, L. Serum anti-p53 antibody detection in carcinomas and the predictive values of serum p53 antibodies, carcino-embryonic antigen and carbohydrate antigen 12-5 in the neoadjuvant chemotherapy treatment for III stage non-small cell lung cancer patients. *Clin. Chim. Acta* 2011, 412, 930-935
- [9] Shimada H., Noie T., Ohashi M., Oba K., Takahashi Y. Clinical significance of serum tumor markers for gastric cancer.
- [10] Schwartzenberg-Bar-Yoseph F., Armoni M., Karnieli E., The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression, *Cancer Res.*, 64(7), 2004, 2627-33.

- [11] Zhang J., Xu Z.W., Yu L.X., Chen M.L., Li K., Assessment of the potential diagnostic value of serum p53 antibody for cancer: a meta-analysis. PLoS One, 9(6), 2014.
- [12] Uchino S., Noguchi M., Ochiai A., Saito T., Kobayashi M., Hirohashi S., p53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer, Int J. Cancer., 54(5), 1993, 759–764.
- [13] Karim S., Correlation of p53 over-expression and alteration in p53 gene detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism in adenocarcinoma of gastric cancer patients from India, World J. Gastroentero., 15(11), 2009, 1381–1387.
- [14] Otani K., Li X.X., Arakawa T., Chan F.K.L., Yu J., Epigenetic-mediated tumor suppressor genes as diagnostic or prognostic biomarkers in gastric cancer, Expert Rev. Mol. Diagn., 13(5), 2013, 445–455.

Anexa 1

LUCRĂRI PREZENTATE LA CONFERINȚE

PREZENTĂRI ORALE

1. Teste rapide de screening pentru diagnosticarea precoce a cancerului gastric, bazate pe recunoașterea moleculară și pe analiza maspinului în probe biologice, Mihaela Iuliana Boga, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Ruxandra Maria Ilie-Mihai, Damaris-Cristina Gheorghe, 240th ECS Meeting, Orlando, FL, USA, Octombrie 10-14, 2021
2. Enantioanaliza - un pas înainte pentru depistarea precoce a cancerului gastric, Mihaela Iuliana Boga, R.I. Stefan-van Staden, R.M. Ilie-Mihai, D.C. Gheorghe, A 7-a Conferință Internațională de Inginerie a Senzorilor și Instrumentație Electronică Avansată (SEIA' 2021), Palma de Mallorca, Mallorca (Insulele Baleare), Spania, 22-24 Septembrie 2021.

Anexa 2

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE ISI

(Total I.F.=17.631)

1. Enantioanaliză a acidului aspartic utilizând senzori stocastici 3D
IM Bogea, RI Stefan-van Staden, DC Gheorghe, RM Ilie-Mihai
Anal.Lett, 55(1), 85-92, 2022 (I.F.=2.267)
2. Senzori stocastici 2D de unică folosință pentru recunoașterea moleculară și
cuantificarea maspinelor în probe biologice
RI Stefan-van Staden, RM Ilie-Mihai, DC Gheorghe, IM Bogea, M Badulescu
Microchimica Acta, 189, 101, 2022 (I.F.=6.408)
3. Microsenzori stocastici pe bază de grafenă modificată pentru recunoașterea tiparelor
de maspin în probe biologice
RI Stefan-van Staden, IM Bogea, RM Ilie-Mihai, DC Gheorghe, M Coros, SM
Pruneanu
Anal Bioanal Chem, 414(12), 3667-3673, 2022 (I.F.=4.478)
4. Grafene decorate cu NS modificate cu 2,3,7,7,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-forfină
clorură de mangan (III) pe bază de senzori stocastici cu ac 3D pentru enantioanaliză a
argininei - un factor cheie în metabolomica și detectarea precoce a cancerului gastric
RI Stefan-van Staden, MI Bogea, RM Ilie-Mihai, DC Gheorghe, HY Aboul-Enein, M
Coros, SM Pruneanu
Anal. Bioanal.Chem., 414(22), 6521–6530, 2022 (I.F.=4.478)
5. Determinarea p53 din probe de sânge integral utilizând un senzor electrochimic pe bază
de grafenă decorată cu N și S
IM Bogea, RM Ilie-Mihai, RI Stefan-van Staden
Sci Bull UPB, 84(3), 121-130, 2022