



MINISTERUL EDUCAȚIEI  
**UNIVERSITATEA POLITEHNICĂ DIN  
BUCUREȘTI**

**Școala Doctorală Inginerie Chimică și Biotehnologii**



***TEZĂ DE DOCTORAT***

**Conducător științific:  
Prof. Dr. habil Raluca Ioana van Staden**

**Doctorand:  
Oana-Raluca Mușat**

București  
2023

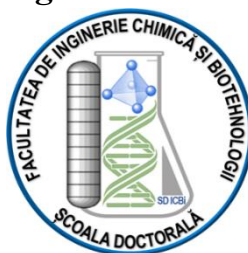


MINISTERUL EDUCAȚIEI

**UNIVERSITATEA POLITEHNICĂ DIN  
BUCUREȘTI**



**Școala Doctorală Inginerie Chimică și Biotehnologii**



# ***TEZĂ DE DOCTORAT***

## **METODE INOVATIVE PENTRU DIAGNOSTICAREA CANCERULUI MAMAR**

**Conducător științific:  
Prof. Dr. habil Raluca Ioana van Staden**

**Doctorand:  
Oana-Raluca Mușat**

București  
2023

Teza de doctorat intitulată "Metode inovative pentru diagnosticarea cancerului mamar" conține 159 pagini, este alcătuită din 7 capitole, prezintă figuri 33, 2 scheme și 18 tabele și citează 374 de referințe bibliografice și 42 site-uri internet. Cuprinsul lucrării care include numerotarea paginilor originale din teză este:

<b>CUPRINS</b>	Pag. Teza	Pag. Rezumat
<b>INTRODUCERE</b>	10	8
<b>CAPITOLUL I.</b>	13	10
BIOMARKERI UTILIZAȚI ÎN DIAGNOSTICAREA CANCERULUI MAMAR	13	10
<b>1.1. Clasificarea biomarkerilor utilizați în diagnosticarea cancerului mamar și efectele lor asupra individului</b>	13	10
<i>1.1.1. Biomarkeri moleculari pentru precizarea diagnosticului, terapei prognosticul mamar</i>	16	11
<i>1.1.2. Biomarkeri imunohistochimici</i>	17	12
<i>1.1.3. Biomarkeri implicați în diagnosticarea și terapie</i>	19	12
<b>1.2. Metode clasice standar de determinare a biomarkerilor cancerului mamar</b>	19	12
<i>1.2.1. Indicatori în diagnosticarea precoce a markerilor tumorali</i>	21	13
<i>1.2.2. Standardizarea biomarkerilor tumorali pentru cancerul mamar</i>	23	14
<i>1.2.3. Incidența și epidemiologia cancerului mamar</i>	30	14
<i>1.2.4. Secvențierea în timp real a unei singure molecule</i>	31	15
<i>1.2.5. Factorii de risc care duc la apariția tumorală</i>	34	15
<i>1.2.6. Implicații etiopatologice, clinic-evoluționale și terapeutice în screening-ul cancerului mamar</i>	35	16
<b>1.3. Markerii tumorali în diagnosticarea cancerului mamar</b>	37	16
<i>1.3.1. Rolul cancerului mamar în proteina supresoare tumorală p53</i>	38	16
<i>1.3.2. Progresul și influența antigenului carbohidrat (CA15-3) în stabilirea diagnosticului cancerului mamar</i>	39	16
<b>CAPITOLUL II.</b>	41	17

<b>SENZORII STOCASTICI UTILIZAȚI ÎN ANALIZA BIOMEDICALĂ</b>	41	17
<b>2.1. Sensorul, elementul principal în analiză umană</b>	41	17
<i>2.1.1. Senzorii inteligenți și sistemele mecatronice în biologia celulară</i>	42	17
<i>2.1.2. Aplicații și considerații teoretice, în domeniul biomedical</i>	43	17
<b>2.2. Aparatură, detecție electrochimică și designul microsenzorilor stocastici</b>	44	18
<i>2.2.1. Detecția electrochimică utilizând senzori stocastici</i>	45	18
<i>2.2.2. Designul senzorilor stocastici</i>	45	19
<i>2.2.3. Mecanismul senzorului stocastic</i>	46	19
<b>CAPITOLUL III.</b>	48	21
<b>D-SERINA ȘI D-LEUCINA – FACTORI CHEIE ÎN DIAGNOSTICAREA CANCERULUI MAMAR. ENANTIOANALIZA SERINEI ȘI LEUCINEI UTILIZÂND SENZORI STOCASTICI</b>	48	21
<b>3.1. INTRODUCERE</b>	48	21
<b>3.2. PARTEA EXPERIMENTALĂ</b>	53	22
<i>3.2.1. Materiale și reactivi</i>	53	22
<i>3.2.2. Aparatură și reactivi</i>	53	23
<i>3.2.3. Proiectarea senzorilor stocastici enantioselective</i>	53	23
<i>3.2.4. Modul stocastic</i>	55	24
<i>3.2.5. Probe de sânge</i>	57	26
<b>3.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII</b>	58	26
<i>3.3.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici enantioselectivi</i>	58	26
<i>3.3.1.1. L- și D-serină</i>	58	26
<i>3.3.1.2. L- și D-leucină</i>	59	28
<i>3.3.2. Selectivitatea senzorilor propuși utilizat pentru determinarea serinei și leucinei</i>	60	29
<i>3.3.2.1. L- și D-serină</i>	60	29
<i>3.3.2.2. L- și D-leucină</i>	61	29
<b>3.3.3. Enantioanaliza serinei în probe de sânge integral utilizat pentru determinarea L- și D-serină</b>	62	30

<b>3.3.4. Enantioanaliza leucinei în probe de sânge integral utilizat pentru determinarea L- și D-leucină</b>	63	31
<b>3.4. CONCLUZII</b>	66	33
<b>CAPITOLUL IV.</b>	68	34
<b>MICROSENZORI STOCASTICI BAZAȚI PE NANOPULBERI DE CARBON PENTRU DETERMINAREA ULTRASENSIBILĂ A CA15-3, CEA și HER-2 ÎN SÂNGELE INTEGRAL</b>	68	34
<b>4.1. INTRODUCERE</b>	68	34
<b>4.2. PARTEA EXPERIMENTALĂ</b>	70	35
<i>4.2.1. Materiale și metode</i>	70	35
<b>4.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII</b>	72	37
<b>4.3.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic</b>	72	37
<b>4.3.2. Măsurătorile de stabilitate și reproductibilitate</b>	74	38
<b>4.3.3. Selectivitatea microsenzorilor stocastici</b>	74	38
<b>4.3.4. Determinarea simultană ultrasensibilă a CA15-3, CEA și HER-2 în sângele integral</b>	75	39
<b>4.4. CONCLUZII</b>	77	41
<b>CAPITOLUL V.</b>	79	42
<b>TESTAREA ULTRASENSIBILĂ A HER-1, HER-2 și HEREGULIN-<math>\alpha</math> ÎN SÂNGELE INTEGRAL</b>	79	42
<b>5.1. INTRODUCERE</b>	79	42
<b>5.2. PARTEA EXPERIMENTALĂ</b>	81	43
<i>5.2.1. Materiale și reacți</i>	81	43
<i>5.2.2. Aparatură și metode</i>	82	43
<i>5.2.3. Proiectarea microsenzorilor stocastici</i>	82	43
<i>5.2.4. Proceduri recomandate: Metoda stocastică</i>	83	43
<i>5.2.5. Probele biologice</i>	85	45
<b>5.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII</b>	85	45
<i>5.3.1. Caracterizarea morfologică și structura pastelor utilizate pentru proiectarea microsenzorilor stocastici</i>	85	45
<i>5.3.2. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici</i>	87	46
<i>5.3.3. Măsurătorile de stabilitate și reproductibilitate</i>	89	48
<i>5.3.4. Selectivitate</i>	89	48

<b>5.3.5. Determinarea simultană ultrasensibilă a HER-1, HER-2 și heregulin-<math>\alpha</math> în sângele integral</b>	90	49
<b>5.4.CONCLUZII</b>	91	50
<b>CAPITOLUL VI</b>	92	51
<b>TESTAREA ULTRASENSIBILĂ A 8-HIDROXI-2'-DEOIGUANOSINEI ÎN SÂNGELE INTEGRAL UTILIZÂND MICROSENZORI STOCASTICI PE BAZĂ DE NANOTUBURI DE CARBON</b>	92	51
<b>6.1. INTRODUCERE</b>	92	51
<b>6.2. PARTEA EXPERIMENTALĂ</b>	94	52
<i>6.2.1. Materiale, metode și reactivi</i>	94	52
<i>6.2.2. Proiectarea microsenzorilor stocastici</i>	94	52
<i>6.2.3. Aparatură</i>	94	52
<i>6.2.4. Metoda stocastică</i>	95	52
<i>6.2.5. Probe</i>	96	53
<b>6.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII</b>	96	54
<i>6.3.1. Morfologia suprafeței active a microsenzorilor stocastici</i>	96	54
<i>6.3.2. Determinarea ultrasensibilă a 8-OHdG în sângele integral</i>	98	55
<b>6.4. CONCLUZII</b>	99	56
<b>CAPITOLUL VII</b>	100	57
<b>DETERMINAREA D-SERINEI DIN PROBE DE SÂNGE INTEGRAL FOLOSIND UN SENZOR ELECTROCHIMIC PE BAZĂ DE ZINC (II)-5 (4-CARBOXIFENIL)-10,15,20-TRIS (4-FENOXIFENIL) PORFIRINĂ</b>	100	57
<b>7.1. INTRODUCERE</b>	100	57
<b>7.2. PARTEA EXPERIMENTALĂ</b>	103	58
<i>7.2.1. Materiale și reactivi</i>	103	58
<i>7.2.2. Aparatură</i>	103	58
<i>7.2.3. Proiectarea senzorului electrochimic</i>	104	58
<i>7.2.4. Procedura recomandată</i>	104	59
<i>7.2.5. Probe biologice</i>	104	59
<i>7.2.6. Studii de selectivitate</i>	105	59
<b>7.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII</b>	105	59

<i>7.3.1. Răspunsul caracteristic al senzorului electrochimic propus</i>	105	59
<i>7.3.2. Selectivitatea senzorului electrochimic</i>	107	61
<i>7.3.3. Determinarea D-serinei în probe de sânge integral</i>	108	62
<b>7.4. CONCLUZII</b>	110	63
<b>CONCLUZII GENERALE</b>	111	64
<b>ANEXA 1</b>	115	67
<b>ANEXA 2</b>	116	68
<b>BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ</b>	117	69

### Obiectivele tezei de doctorat

Această teză arbordează metode inovative pentru diagnosticarea cancerului, analizând metode electrochimice bazându-se pe senzori stocastici, pentru identificarea și analiza calităților biomarkerilor specifici tipului de cancer mamar. Avantajele senzorilor stocastici au fost numeroase, având o sensibilitate și selectivitate mare, o bună corelație între rezultatele obținute, acoperând cât mai multe domenii de concentrații liniare cu limite de detecție, având un rezultat de o bună calitate a probei examinate.

## INTRODUCERE

Cancerul mamar are o incidență crescută în rândul sexului feminin și masculin. Una din nouă femei dezvoltă o tumoră mamară în cursul vieții. În cancerul mamar, vindecarea este posibilă când diagnosticarea este precoce, în fază incipientă. Prioritizarea și precocitatea diagnosticului este cheia succesului în tratarea și tratamentul cancerului mamar.

Metodele inovative de diagnosticare a cancerului mamar au devenit foarte importante pentru diagnosticare precoce și rapidă a tumorilor. Screening-ul pacienților utilizând teste clasice nu poate da informațiile necesare unui diagnostic precoce din cauza sensibilității reduse și a limitei de determinare care este de multe ori mai mare decât concentrațiile markerilor tumorali într-un stadiu 0 sau 1 al cancerului; de asemenea, astfel de metode sunt setate pentru anumiți biomarkeri. Mamografiile pot oferi informații, dar nu în stadiul incipient.

Testarea genetică poate fi indicată dacă individul a avut un istoric familial (o moștenire a genelor sau o transmitere a unor gene mutante), sugerând o cauză genetică de tumoră specifică unui anumit organ sau țesut.

O secvențiere ADN a tumorii este realizată uneori, pentru a stabili dacă celulele canceroase prezente la persoanele care au primit deja un diagnostic de tumoră, pot suferi modificări genetice. Secvențierea ADN-ului este o metodă care permite determinarea secvenței nucleopeptidice a unei molecule de ADN, ea permițând stabilirea structurii genei precum și determinarea tipului de mutație care a produs o boală genetică. Secvențierea ADN-ului poate fi folosită pentru determinarea secvențelor ADN individuale ale genelor, grupurilor de gene, cromozomii întregi sau chiar genomuri. Secvențierea determină ordinea nucleotidelor prezente în moleculele de ADN și ARN izolat de la animale, plante, bacterii sau orice altă formă de viață. Rezultatele testelor genetice pot indica: CHEK2 (specific cancerelor mamare, și cancer colorectal) și BRCA1/2 (specific cancerelor mamare, ovariane, de prostată, pancreatic, cât și melanom).

Unele modificări genetice pot conduce către un răspuns neașteptat sau exagerat la medicația prescrisă, iar recunoașterea variantelor conduce către abordarea unui tratament personalizat de la individ la individ. Date fiind aceste riscuri, este nevoie de noi instrumente și teste de screening capabile să apropie cât mai mult testul de screening de diagnostic într-un stadiu precoce al cancerului mamar prin: găsirea unor biomarkeri specifici cancerului mamar (de exemplu: aminoacizii), prin determinarea simultană a 3-8 biomarkeri.



De aceea, în această teză am propus o nouă clasă de senzori – senzori stocastici, pentru identificarea și analiza calităților biomarkerilor specifici cancerului mamar. D-serină și D-leucină au fost identificate numai în probele de sânge provenite de la pacienții diagnosticați cu cancer mamar, fiind un indiciu că ei pot fi utilizați ca biomarkeri specifici pentru acest tip de cancer. De asemenea, senzorii stocastici construiți au putut fi utilizați la enantioanaliza serinei, leucinei și la determinarea simultană a mai multor biomarkeri cum ar fi: antigenul carcinoembrional (CEA), oncoproteinele Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2), Human Epidermal Growth Factor Receptor 1 (HER-1), Heregulin-Alpha, 8-hydroxyguanosine (8OHdG), antigenul carbohidrat 15-3 (CA15-3).

## CAPITOLUL I

# BIOMARKERI UTILIZAȚI ÎN DIAGNOSTICAREA CANCERULUI MAMAR

### 1.1. Clasificarea biomarkerilor utilizați în diagnosticarea cancerului mamar și efectele lor asupra individului

Biomarkerii sunt compuși cu diferite structuri și dimensiuni chimice [1,2]. În oncologie există o multitudine de aplicații pentru biomarkeri precum: efectuarea diagnosticului diferențial, evaluarea riscului, stabilirea caracterului malign sau benign al unei formațiuni, screeningul, răspunsul la tratament, monitorizarea progresiei și a recidivei, cât și determinarea prognosticului [3,4]. Biomarkerii s-au dovedit pe parcursul timpului un “instrument” eficient, indicând stadiul cancerului mamar, acesta fiind prezentat ca fiind un factor foarte important în stabilirea viitorului prognostic. În utilizarea biomarkerilor, cel mai frecvent întâlnim acizii nucleici, carbohidrații, metaboliții mici, proteinele, citokineticele și celulele tumorale circulante, aceștia controlând procesele fiziologice și farmacologice [5].

În fiecare zi, influențele interne și externe, cum ar fi reacțiile inflamatorii, procesele metabolice, toxinele din mediul înconjurător, cât și radiațiile, provoacă mii de daune aleatorii la nivelul materialului genetic (ADN-ul), al fiecărei celule din corpul uman. Atunci când celula nu poate fi “reparată”, daunele aflate la nivelul ADN-ului, mutațiile și dezvoltarea cancerului ar putea fi consecința diagnosticului precoce.

Pentru diagnosticarea și planificarea unui biomarker ideal ar trebui să urmărim câteva specificații, sensibilități înalte fiind detectabile prin metode simple în probele biologice (de țesut, sânge, urină, spută, materii fecale) [6,7]. Realizarea dozării biomarkerilor trebuie făcută ținând cont de datele în anamneza clinică, paraclinică și urmărind ghidurile existente în prezent [8-12].

În mod normal o celulă riscă să se transforme într-o celulă canceroasă, atunci când celula proteică supresoare tumorală p53 va fi activată. Proteina p53 are un scop de a utiliza diverse metode printre în care regăsim cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC), testul de tip ELISA.

Pe scară largă, până în prezent, au fost investigate diferite metode pentru determinarea antigenului carbohidrat CA15-3, cea mai des utilizată fiind ELISA.

Oncogena HER-2 situată pe cromozomul 17 codifică sinteza unei proteine transmembranare, făcând parte din familia receptorilor tirozin-kinazici. Receptorii prezintă structuri omogene și funcționale cu receptori pentru factorul de creștere epidermal. HER-1 și HER-2/neu sunt frecvent asociați cu tumora mamara. Factorii de creștere care se leagă de receptorul HER-2 stimulează creșterea și diviziunea celulară.

CA15-3 este o glicoproteină transmembranară a cărei sinteză este codificată de gena MUC1[35]. Utilizarea determinării acestui marker principal este monitorizarea tratamentului și a evoluției bolii în tumora mamară, precum: depistarea precoce a recurenței tumorale la pacienții tratați anterior pentru carcinoma mamară stadiul II și III, fără semne clinice de activitate a bolii; nivelul crescut al concentrației CA15-3 la un pacient diagnosticat cu tumoră mamară indică o mare probabilitate a metastazelor; scăderea nivelului seric de CA15-3 este un indicator de răspuns terapeutic în timp ce persistă nivelul crescut care se asociază progresiv bolii și cu un răspuns inadecvat la terapie. Atunci când se determină combinarea de CA 15-3 și CEA poate crește sensibilitatea detecției recurenței tumorale.

Antigenul carcinoembrionar (CEA) este unul dintre antigenele oncofetale produse în timpul vieții cât și a dezvoltării fetale, după naștere producția fiind suprimată și ajungând la o valoare foarte scăzută la vârsta adultă (la individual fumator sub  $5 \text{ ng mL}^{-1}$ , la nefumatori sub  $3 \text{ ng mL}^{-1}$ ) [46].

### ***1.1.1. Biomarkeri moleculari pentru precizarea diagnosticului, terapiei și prognosticul mamar***

În diagnosticarea tumorii, biomarkerii nu prezintă utilitatea deosebită pentru detectarea precoce a cancerului mamar, dar ajută în determinarea, monitorizarea tratamentului, prognosticul și urmărirea post-terapeutică [64-65]. Determinarea nivelului de receptori pentru hormonul numit progesteron, cât și pentru estrogen este utilizată pentru diagnosticarea precoce a pacienților cu cancer mamar invaziv, pentru stabilirea eligibilității tratamentului hormonal. HER-2 este obligatorie pentru aprecierea eficacității terapiei anti-HER-2 (transtuzumab, pertuzumab, ado-transtuzumab emtansin sau lapatinib) [66,67].

### ***1.1.2. Biomarkeri imunohistochimici***

Biomarkerii moleculari utilizați în prognosticul terapeutic în cancerul mamar sunt reprezentați prin evidențierea receptorilor hormonal. Prin utilizarea Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2), antigenul carcinoembrionic (CEA), antigenul carbohidrat (CA15-3), cât și genele BRCA1 și BRCA2 și a altor biomarkeri cu toții au capacitatea de a influența pozitiv conduita terapeutică [71-72].

O testare diferită a testelor genetice, denumită secvențiere ADN a tumorii, este realizată uneori, pentru a stabili dacă celulele canceroase prezente la persoanele care au primit deja un diagnostic de tumoră, au suferit modificări genetice care pot constitui un indiciu în tratament prin reducerea riscurilor [75].

Secvențierea Sanger este o metodă de secvențiere ADN bazată pe încorporarea selectivă a di-deoxinucleotidelor de către enzima ADN polimerază în timpul replicării ADN *in vitro*. Metoda de secvențierea a ADN-ului permite determinarea secvențierii nucleotidice a unei molecule de ADN. Ea permite stabilirea structurii genei, precum și determinarea tipului de mutație care a produs o boală genetică.

### ***1.1.3. Biomarkeri implicați în diagnosticare și terapie***

În implicarea biomarkerilor s-au detectat molecule considerate și validate cu specificități în diagnosticarea cancerelor mamare pozitive, cât și predispoziția genetică de a dezvolta cancer cu această localizare sau iraderea către organe în vecinătate.

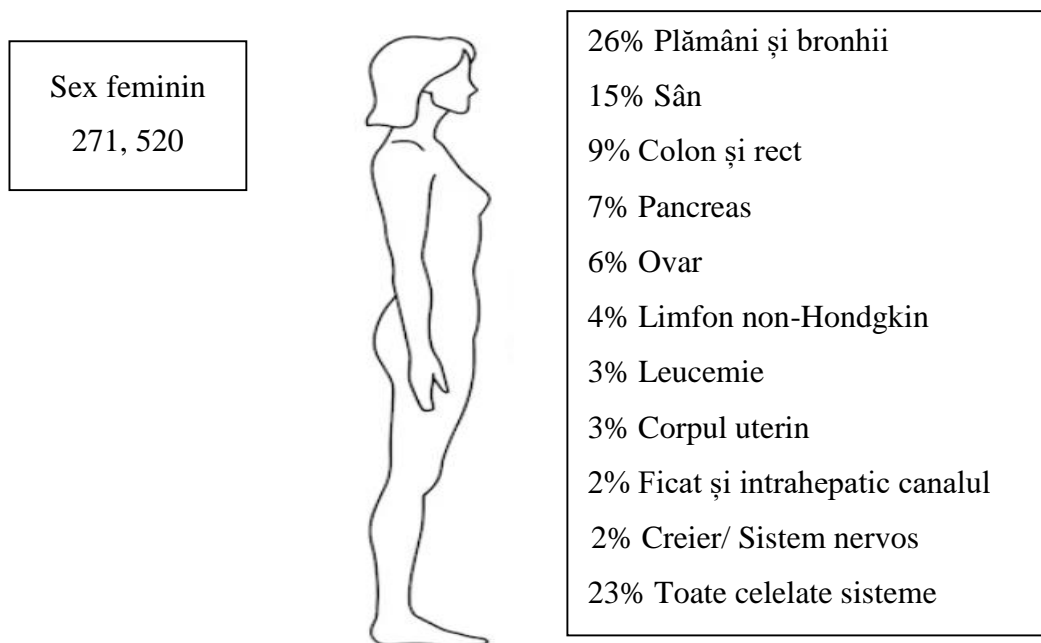
Screening-ul markerilor tumorali nu sunt suficient de sensibili sau suficient de specifici. Diagnosticarea precisă la o persoană simptomatică cu cancer a fost detectată prin diferențierea de alte condiții cu simptome similare. Surplusul de informații aduse de valorile markerilor trebuie utilizată cu prudență pentru că sunt situații care pot scădea sau crește nivelul markerului independent de evoluția sau involuția tumorii. Pentru recurențele bolii, întâlnim și utilizăm markeri tumorali, alături de monitorizarea răspunsului la tratament pentru detecția recidivelor.

## **1.2. Metode clasice standard de determinare a biomarkerilor cancerului mamar**

Cele 4 mari componente în tratamentul cancerului mamar rămâne *chirurgia* fiind o metodă curativă, în timp ce *hormonoterapia*, *radioterapia* precum și *chimioterapia*

perioperatorie și adjuvantă, care pot îmbunătăți impactul cancerului mamar rezecabil prin intermediul disecției extinse a ganglionilor limfatici.

Studiile randomizate nu au demonstrat că utilizarea terapiei cu doze înalte cu suport de celule stem hematopoietice îmbunătățește supraviețuirea [87-88]. Aproximativ 16 luni cu tratament convențional este supraviețuirea medie: inhibitori de aromatază pentru tumorile cu receptori estrogenici pozitivi și chimioterapie combinate pentru tumorile cu receptori estrogenici pozitivi și chimioterapie pentru tumorile cu receptori negativi [89].



**Figura 1.2.** Incidența cancerului glandei mamare la sexul feminin în comparație cu incidența altor tipuri tumorale<sup>2</sup>.

### ***1.2.1. Indicatori în diagnosticarea precoce a markerilor tumorali***

Fibroadenom mamar este o tumoră benignă dezvoltată pe seama proliferării țesutului conjunctiv, care devine fibros. Această tumoră poate fi întâlnită în special la femeile tinere sub 30 de ani, dar se poate manifesta mai rar și la femeile aflate în timpul menopauzei.

În consecință, markerii tumorali singuri, nu reprezintă un criteriu de diagnostic pentru un anumit tip de cancer dar, pentru anumite tipuri de cancer ei oferă informații suplimentare pentru un scop prognostic cât mai timpuriu și precis [100].

<sup>2</sup> <http://www.esciencecentral.org/ebooks/cancer-treatment-strategies/cancer-targeting-strategies-revisited.php>

### ***1.2.2. Standardizarea biomarkerilor tumorali pentru cancerul mamar***

Markerii tumorali au fost considerați în mod obișnuit proteine sau alte substanțe produse atât de celulele normale cât și cele cancerioase, însă sunt produși în cantități mai mari de celulele canceroase [101]. Aceștia sunt prezenți în urina, sânge, materii fecale, tumori specific sau alte țesuturi sau lichide corporale provenind de la indivizi care sunt suferind de o tumoră. Markerii genomici precum mutații ale genelor tumorale, modificări non-genetice în ADN-ul tumorilor și tipare ale expresiei genelor tumorale.

Stadializarea tumorii mamare include: descrierea tumorii primare, mărime și localizare (ductală/lobulară), multicentricitate sau multifocalitate, detalierea și investigarea tipului de invazie ganglionară (câți ganglioni sunt invadați și câți au fost investigați, tipul invaziei tumorale cu sau fără afectarea capsulei ganglionare), descrierea prezentei invaziei a vaselor sanguine și a vaselor limfatice.

Evaluarea include o anamneză completă, insistând pe aspectele legate de tumora primară, evoluția acesteia și statusul menopauzal.

Examenul clinic complet, aprecierea statusului de performanță, evaluarea hematologica și biochimică (hemoleucograma completă, fosfataza alcalină, teste funcționale hepatice și renale) sunt obligatorii. Există două modalități de stadializare: prima este stadializarea clinică, care se bazează pe rezultatul examinării clinice și pe informațiile obținute în urma investigațiilor imagistice, iar a doua stadializarea este cea patologică care se bazează pe informațiile obținute în urma intervenției chirurgicale și a examinării patologice a piesei operatorii (tumoră și limfoganglioni) [107,108].

### ***1.2.3. Incidența și epidemiologia cancerului mamar***

Cancerul mamar este o proliferare malignă la nivelul celulelor epiteliale care determină ductele galactofore sau lobulii sânului. Frecvența cancerului mamar este cea mai frecventă afecțiune întâlnită la sexului feminin. Această afecțiune se va caracteriza printr-o evoluție cu variabilitate extrem de mare de la o pacientă la alta.

Evoluția locală poate dura câțiva ani, tumora putând avea diametrul de mai puțin de 1 cm, iar acest interval este foarte prețios diagnosticarea timpurie, deoarece diagnosticul tumorii în perioada incipientă, acordă șanse maxime de vindecare [112].

#### ***1.2.4. Secvențierea în timp real a unei singure molecule***

Secvențierea este folosită în biologia moleculară pentru a studia genomurile și proteinele codate de acestea. Informațiile obținute în urma secvențierii ajută cercetătorii să descopere schimbări în gene, asocieri cu boli sau fenotipuri și să identifice ținte pentru noi medicamente.

ADN-ul reprezintă o moleculă care oferă informații referitoare la moștenirea genetică. De aceea, secvențierea ADN este folosită în biologia evolutivă pentru a studia înrudirea diferitelor organisme și felul în care au evoluat acestea.

Secvențierea unei singure molecule folosește tehnologia zero-mode waveguide (ZMW) [117]. ADN-ul polimerază are o singură enzimă care se fixează la baza zero-mode waveguide, având o singură moleculă ca șablon. ZMW este o structură care permite observarea unei singure nucleotide încorporate la un moment dat în enzima de ADN polimerază. Fiecare dintre cele patru baze este atașată unei vesele fluorescente.

În spatele secvențierii nanopore în teorie stă următoarele: un curent electric ce poate fi observat atunci când nanoporul este scufundat într-un lichid și îi este aplicat un potențial electronic, datorită deplasării ionilor prin nanopor. Cantitatea de curent este influențată de mărimea și forma nanoporului. Când nucleotidele trec prin nanopor are loc o schimbare a magnitudinii curentului care trece prin acel nanopor.

Secvențierea de nouă generație se referă la secvențierea genomurilor, re-secvențiere a acestora, secvențierea transcripturilor (RNA-Seq), interacțiunea ADN-proteinei (secvențierea CHIP), și caracterizarea epigenomurilor [126]. Re-secvențierea este necesară pentru că genomul unui singur individ nu este reprezentativ pentru întreaga specie.

#### ***1.2.5. Factorii de risc care duc la apariția tumorală***

Factorii de risc se pot împărți în factori personali (endogeni), factori genetici și factori dependenți de mediu și stilul de viață (exogeni). Diagnosticul cancerului mamar este confirmat numai prin biopsia nodulului detectat la palpate sau evidențiat mamografic [131-133].

Nivelul ridicat de risc al factorilor sunt: antecedentele de cancer mamar, predispoziția genetică (genele BRCA1 și BRCA2 sunt gene autosomal dominante și sunt implicate în majoritatea cazurilor de cancer familial), leziunile precursorale ale cancerului mamar [134-136].

### ***1.2.6. Implicații etiopatologice, clinic-evoluționale și terapeutice în screening-ul cancerului mamar***

Dieta sănătoasă poate ajuta la prevenirea acestei obezități, iar în acest sens recomandările sunt: o alimentație limitată în aportul de grăsimi, creșterea consumului de fructe, legume, cereale, minimalizarea consumului de zahăr și cel de sare, iar cel mai important lucru efectuarea de exerciții fizice zilnice timp de 30 minute pe zi putând reduce riscul de afecțiuni precum cancerul de colon, cancerul de sân, diabet și boli cardiovasculare [165].

## **1.3. Markerii tumorali în diagnosticarea cancerului mamar**

În diagnosticarea și prognosticul cancerului mamar, au fost utilizați o varietate de biomarkeri serici care reprezintă determinarea antigenice cum ar fi: CEA, CA15-3, Ki67 Antigen [179]. Nivelele de proteina ale acestor antigene în ser reprezintă caracteristici care indică riscul de dezvoltare a tumori [180,181].

### ***1.3.1. Rolul cancerului mamar în proteina supresoare tumorale p53***

Proteina supresoare tumorală p53 este cea mai frecventă genă mutantă în cancerul uman. Mutațiile localizate în cromozomul p17 sunt cele mai frecvente modificări, încă și în malignități umane.

În celulele canceroase care au un p53 mutant, această proteină nu poate controla o perioadă mai lungă de timp proliferarea celulară, ceea ce duce la repararea inefficientă a ADN-ului și la apariția celulelor instabile genetic [185].

### ***1.3.2. Progresul și influența antigenului carbohidrat (CA15-3) în stabilirea diagnosticului cancerului mamar***

Antigen carbohidrat este un test imunosorbent legat de enzimă (ELISA) în fază solidă bazat pe principiul sandwich pentru detectarea, verificarea recidivei și diagnosticarea markerului tumoral. CA15-3 este o proteină produsă de o varietate de celule, în special celulele canceroase de sân.



## CAPITOLUL II

# SENZORII STOCASTICI UTILIZAȚI ÎN ANALIZA BIOMEDICALĂ

### 2.1. Senzorul, elementul principal în analiză umană

În abordarea senzorilor stocastici am descoperit că au numeroase avantaje în plus față de senzori clasici electrochimici, deoarece aceștia sunt sensibili și selectivi, având de determinat o capacitatea simultană pentru compuși de interes, analiza efectuându-se în cantități foarte mici de probe analizate, acordând o acoperire mare a domeniilor largi de concentrații liniare cu limite foarte mici de detecție a analizei fiabile a calității probei.

#### *2.1.1. Senzorii inteligenți și sistemele mecatronice în biologia celulară*

Senzorii electrochimici cei mai utilizați în analiza biomedicală sunt senzorii amperometrici, senzorii stocastici și senzorii multimod [210]. Aceștia se bazează pe principiul observațional și al modificărilor de curent sau de potențial, datorate interacțiunilor care apar la interfața sensorului cu proba de analiză. Tehnicile care folosesc acești senzori sunt în general clasificate în funcție de parametrul observant: curentul (amperometrice), potențial (potentiometrice) sau impedanță (impedimetrice) [211].

#### *2.1.2. Aplicații și considerații teoretice, în domeniul biomedical*

Analiza stocastică se bazează pe observarea unui eveniment individual de legare dintre o singură moleculă și un receptor. Proteinele transmembranare cu pori proiectate reprezintă un element promițător în design-ul senzorilor utilizați în analiza stocastică, care în simpla lor manifestare produc un răspuns fluchant binar (on/off) în curentul electric transmembranar.

Frecvența cu care se produc fluctuațiile, dezvăluie concentrația analitului, iar identitatea sa poate fi dedusă din magnitudine sau din durata fluctuațiilor. În apariția frecvenței evenimentului de legare a analitului crește odată cu creșterea concentrației.

Detecția stocastică este o tehnică de detectare a unei singure molecule permițând identificarea analiților. Folosirea acestor nanoporii în designul senzorilor stocastici oferă o perspectivă interesantă, despre depistarea și cuantificarea literanților moleculare la nivelul unei

singure molecule. Interacțiile individuale dintre moleculele analitului și situiile receptoare ale canalului pot fi observate ca fiind modelații de curent care trec prin canal. Detecția stocastică este foarte sensibilă, răspunsul oferit este rapid și reversibil (permitând analiza în timp real a analiților). În plus față de detecția cantitativă și identificarea analitului este posibilă și detecția concurentă a mai multor analiți. Senzorii stocastici au cea mai ridicată selectivitate [213].

## 2.2. Aparatură, detecție electrochimică și designul microsenzorilor stocastici

În designul microsenzorilor stocastici, selectarea materialelor este esențială pentru obținerea performanței dorite. Microsenzorii stocastici au la baza principiul de funcționare a canalelor ionice existente în organismul uman [214]. Evoluția senzorilor este legată de cei doi factori: evoluția științei materialelor și a ingineriei porilor sau a canalelor, cât și a tehnicilor de analiză de suprafață. Microsenzori stocastici au o membrană care are două componente de bază: matricea-materialului pe care se imobilizează substanța electrochimică activă și substanța electrochimică activă care prezintă micro sau nanocanale. Printre moleculele care prezintă tipul acesta de canal se numără ciclodextrinele, maltodextrinele, inulinele, antibioticele, eterii coroana, moleculele biologice – care au în structura lor astfel de canale, dar și existența moleculelor care formează agregate moleculare și micro/nanocanale cum ar fi porfirinele și ftalocianinele. Altă clasificare a substanțelor ar fi după proveniență: biologică (exemplu proteina, hemolisina) și de sinteză (exemplu, ciclodextrine, porfirine). Sinteza dirijată a porilor cu o anumită dimensiune facilitează și un răspuns controlat al senzorului stocastic [217].

### 2.2.1. Detecția electrochimică utilizând senzori stocastici

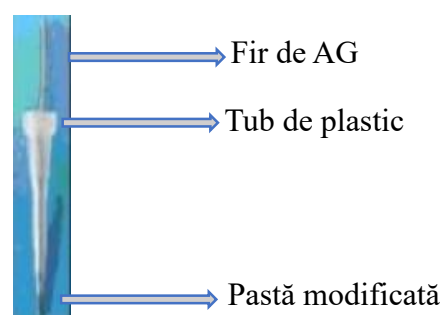
Senzorii stocastici sunt instrumente noi de detecție, cât mai rapidă a markerilor tumorali printr-o metodă electrochimică [218,219]. Ei sunt integrați în celule electrochimice alături de un electrod de referință (Ag/AgCl) și un fir de Pt (electrod auxiliar), pentru efectuarea măsurătorilor (Figura 2.1.).



**Figura 2.1.** Utilizarea senzorului stocastic pentru screening-ul unei probe de sânge.

### 2.2.2. Designul senzorilor stocastici

Designul senzorilor este unul cât se poate de simplu și fără costuri mari, folosind de cele mai multe ori materiale pe bază de carbon. O cantitate de pudră sub formă de pulbere (bazată pe grafit, diamant, nanographene, grafenă, etc), se amestecă cu ulei pe parafină, obținând o pastă omogenă. În această pastă se adaugă o soluție de modificador (care prezintă porii necesarii analizei stocastice). Pasta modificată se pune într-un tub cu diametrul interior al suprafeței active de 300  $\mu\text{m}$ . Un fir de argint este introdus în pasta și utilizat pentru conectarea senzorului cu circuitul electric exterior (Figura 2.2). Între măsurători, senzorii sunt clățiți cu apă dionizată, pentru a nu se contamina probele între ele [221].



**Figura 2.2** - Construcția senzorului stocastic

### 2.2.3. Mecanismul senzorului stocastic

Răspunsul microsenzorilor stocastici se bazează pe conductivitatea canalului, când un potențial constant este aplicat. Recunoașterea moleculară a analitului de interes are loc în două etape: inițial în etapa unu, etapa de recunoaștere moleculară, biomarkerul de interes este extras din soluție în interfața membrana/soluție blocând canalul, intensitatea curentului ajungând la 0 pentru o anumită perioadă de timp, numită semnătură analitului ( $t_{off}$ ), iar în etapa a doua cea de legare, care se desfășoară când biomarkerul interacționează cu peretele canalului. Răspunsul acestor senzorilor stocastici nu este influențat de compoziția matricei.

Alte avantaje față de metodele clasice de analiză sunt: domeniul de lucru mare – care permite determinarea biomarkerilor în diferite stadii ale cancerului, limita foarte mică de determinare a biomarkerilor din diferite probe biologice [229-233].

## CAPITOLUL III

# D-SERINA ȘI D-LEUCINA – FACTORI CHEIE ÎN DIAGNOSTICAREA CANCERULUI MAMAR. ENANTIOANALIZA SERINEI ȘI LEUCINEI UTILIZÂND SENZORI STOCASTICI.

### 3.1. INTRODUCERE

Protonica și metabolomica joacă un rol foarte important în cercetarea cancerului, fiind o sursă valorică de noi biomarkeri. Nivelurile de serină s-a dovedit a avea un rol important în diagnosticarea cancerului mamar.

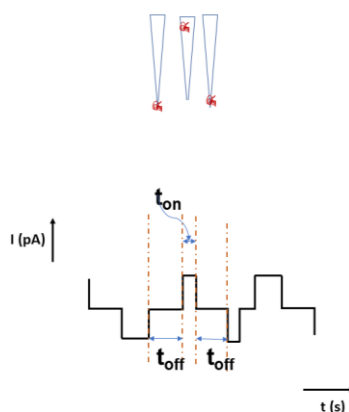
Având în vedere importanța biomarkerilor pentru determinarea și diagnosticarea rapidă și precoce a cancerului mamar, am propus enantioanaliza serinei ca factor cheie pentru un diagnostic precoce a cancerului mamar. Prin urmare, un senzor stocastic enantioselectiv conceput de imobilizarea fizică a Zn(II)-5(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(4-fenoxifenil)-ului de Zn(II) porfirină într-o pastă de nanografene a fost utilizat pentru analiza enantioselectivă a serinei în probe de sânge integral de la voluntari sănătoși și de la pacienți confirmați cu cancer mamar.

Noutatea constă în utilizarea Zn(II)-5(4-carboxifenil)-10,15,20-tris (4 fenoxifenil) porfirină ca modificador în proiectarea unui senzor electrochimic, iar utilizarea sa pentru enantioanaliza unui aminoacid. Rolul său în senzorul stocastic este acela de a furniza canalul necesar pentru răspunsul stocastic al senzorului.

Principalele avantaje ale senzorilor stocastici atunci când sunt utilizați pentru analiza biomedicală sunt: nu este necesară pregătirea probelor; complexitatea matricei nu influențează rezultatele analizei; analiza multianalitică este posibilă.

Atunci când se utilizează semnătura enantiomerului (valoarea  $t_{off}$ ), precum și o analiză cantitativă prin utilizarea valorii tonice măsurate între două semnături (valorile  $t_{off}$ ) (Schema 3.1). Principiul dezvoltării curentului se bazează pe conductivitatea canalului; în prima etapă, enantiomerul intră în canal, blocându-l în timp ce intensitatea curentului scade la zero (semnătura enantiomerului dată de valoarea  $t_{off}$  caracterizează această etapă); în interiorul

canalului au loc procese de legare și redox, iar echilibrul este atins (valoarea  $t_{on}$  utilizată pentru analiza cantitativă a enantiomerilor caracterizează această etapă).



**Schema 3.1.** Dezvoltarea actuală a senzorilor stocastici.

Avantajele senzorilor stocastici față de senzorii electrochimici clasici sunt: semnătura enantiomerilor nu depinde de compoziția matricei, ci doar de dimensiunea și geometria enantiomerului. Derivatul de fulleren' N-metil-fullero-pirrolidină a fost selectat datorită capacității sale de a furniza canalele necesare pentru detecția stocastică.  $Fe_2O_3$  a fost adăugat la pasta de grafit pentru a-i îmbunătăți conductivitatea, ceea ce a facilitat la potențialul selectat (125mV) semnături și valori pentru  $t_{on}$  de ordinul mărimii secunde, și, prin urmare, citirea s-a făcut cu o fiabilitate ridicată.

Noutatea este dată de utilizarea N-metil-fullero-pirrolidinei ca modificator al grafitului/ $Fe_2O_3$  și al pastelor de nanografene, pentru proiectarea de senzori stocastici enantioselectivi și utilizarea lor pentru enantioanaliza leucinei în probe de sânge integral.

## 3.2. PARTEA EXPERIMENTALĂ

### 3.2.1. Materiale și reactivi

L-serină, D-serină, ulei de parafină, nanografene (dimensiunea particulelor mai mică de 3 nm, conținut de carbon de 99,6%, Zn (II)-5(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(4-fenoxifenil) porfirină și tamponul de fosfat, iar L- și D-leucină, grafitul,  $Fe_2O_3$ , nanopulberea de grafenă, N-metil-fullero-pirrolidina, uleiul de parafină. Pentru prepararea tuturor soluțiile s-a folosit apă deionizată. Soluțiile de L-serină și D-serină (au avut concentrații cuprinse între  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  la  $1 \text{ fmol L}^{-1}$ ) au fost obținute prin metoda diluției în serie; toate soluțiile au fost tratate cu un tampon de fosfat (pH 7,50), iar soluțiile de L- și D-leucină au fost preparate folosind tamponul fosfat cu pH 7,40. Intervalul de concentrație utilizat pentru ambii enantiomeri a fost cuprins între  $1 \times 10^{-20}$  și  $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .

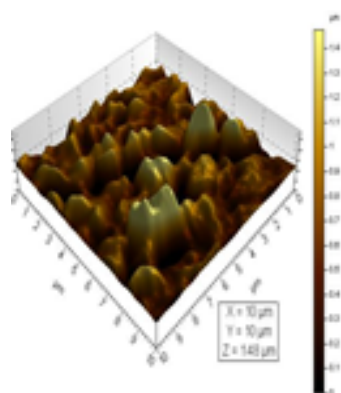
### 3.2.2. Aparatură și reactivi

Pentru toate măsurătorile s-a folosit un potențiosat/galvanostat Autolab/ PGSTAT 12. Ag/AgCl servind ca electrod de referință în celula electrochimică, în timp ce electrodul auxiliar a fost un fir de Pt. Electrocul de lucru din celulă a fost reprezentat de noii senzori stocastici enantioselectivi proiectați.

### 3.2.3. Proiectarea senzorilor stocastici enantioselectivi

100  $\mu\text{L}$  de amestec de  $10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  de Zn (II)-5(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(4-fenoxifenil)-porfirină au fost adăugate de 100 mg de pulbere de nanografene. La acest amestec s-au adăugat 30  $\mu\text{L}$  de ulei de parafină pentru a forma o pastă de nanografene modificată. Pasta modificată a fost analizată cu ajutorul microscopiei de forță atomică (Figura 3.1). Pasta a fost plasată într-un tub special imprimat cu un diametru de 300  $\mu\text{m}$ . În pastă a fost introdus un fir de argint care a fost folosit ca și contact electric. Suprafața senzorului a fost reînnoită prin lustruirea cu folie de aluminiu.

Experimentele de microscopie de forță atomică au fost efectuate cu ajutorul unui aparat Agilent Technologies 5500 scanning probe microscope. Imaginile straturilor de carbon/diamant modificate au fost achiziționate în modul tapotare (AFM modul AAC) folosind un cantilever de siliciu (sondă punctiformă plus modulația forței) cu raza vârfului  $< 10$  nm (lungime 227  $\mu\text{m}$ , forță constantă 1,8 N/m frecvență de rezonanță 69 kHz; nanosenzori) la viteze de scanare de la 0,5 la 1 line/s. Imaginile au fost înregistrate cu rezoluție de 512 X 512 pixeli. Imagistica și software de analiză utilizat a fost PicoVieq 1.6 (Agilent Technologies, Chandler AZ), cu procesare suplimentară a imaginilor (extragerea profilelor de suprafețe, filtrare, corecția liniilor, studii analitice și parametri 2D și 3D) cu ajutorul software-ului Pico Image.



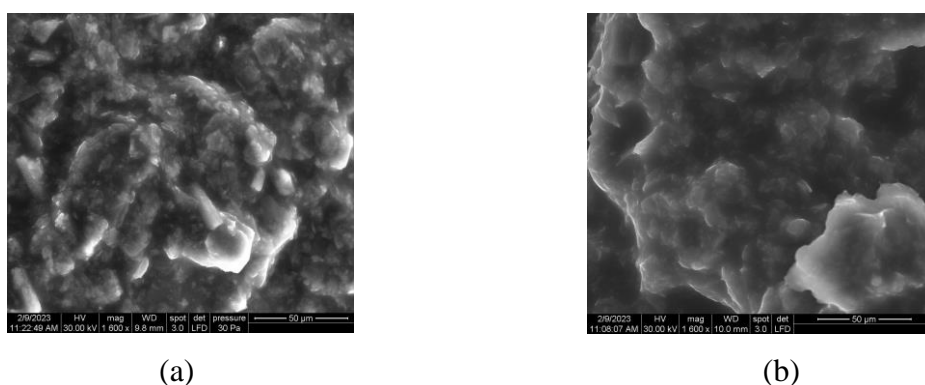
**Figura 3.1.** Imagine AFM 3D (zona de scanare 10X10 mm) a suprafeței active a reactorului stocastic enantioselectiv stocastic.

Pentru L- și D-leucină, proiectarea senzorului stocastic enantioselectiv a fost realizată după cum urmează: 100 mg de nanopulberi de grafit/grafenă au fost amestecate fizic cu 20 mg

de N-metil-fullero-pirrolidină. La amestecul de pulbere de grafit s-au adăugat 10 mg de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . La fiecare dintre pulberi s-au adăugat 30  $\mu\text{l}$  de ulei de parafină pentru a forma o pastă omogenă. Fiecare dintre paste a fost plasată într-un tub de plastic 3D neconductor imprimat în laboratorul nostru cu ajutorul unei imprimante 3D. Diametrul interior al fiecărui tub a fost de  $25\mu\text{m}$ , iar lungimea de 1cm. Un fir de Ag a fost utilizat pentru a conecta pasta cu circuitul extern.

Morfologia pastelor proiectate a fost investigată cu ajutorul microscopiei electronice de scanare (SEM) (Inspect S, FEI Company, Țările de Jos). Pentru a obține o rezoluție bună a imaginilor microscopice, pastele au fost analizate cu ajutorul detectorului LFD (low vac-uum), la o tensiune înaltă (HV) de 30 kV și la o mărire de 1600X.

Morfologia suprafeței active a senzorilor stocastici este prezentată în Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Imagini SEM pentru (a) senzor stocastic enantioselectiv pe bază de pastă de grafit și (b) senzor stocastic enantioselectiv pe bază de pastă de nanografene.

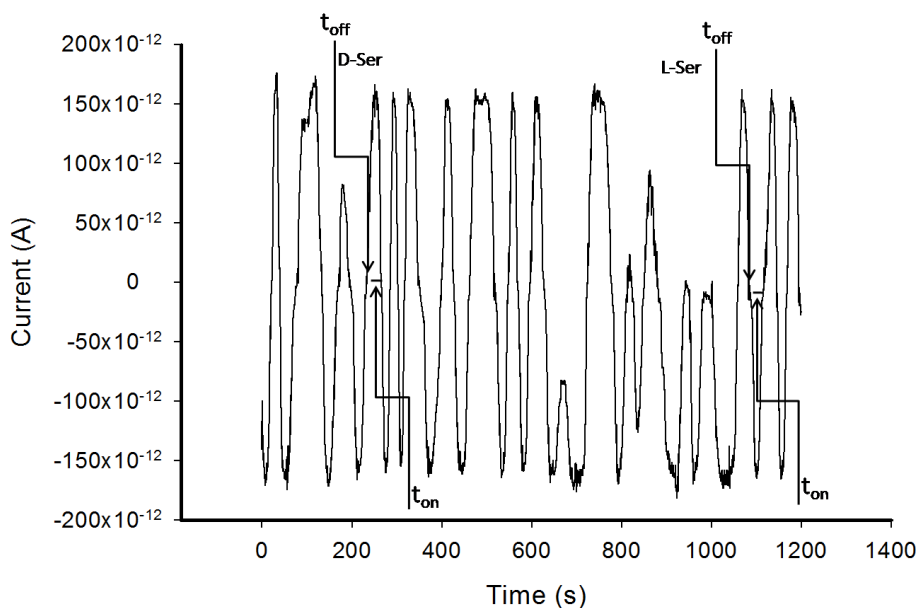
#### 3.2.4. Modul stocastic

Fiecare serie de soluții, respectiv L- și D-serină și L- și D-leucină, a fost analizată cu ajutorul senzorului stocastic enantioselectiv propus la un potențial constant de 125mV vs Ag/AgCl, utilizând cronoamperometria ca tehnică electrochimică. S-au obținut diferite semnături (valori de  $t_{\text{off}}$ ) obținute pentru fiecare enantiomer, dovedind că senzorul este enantioselectiv.

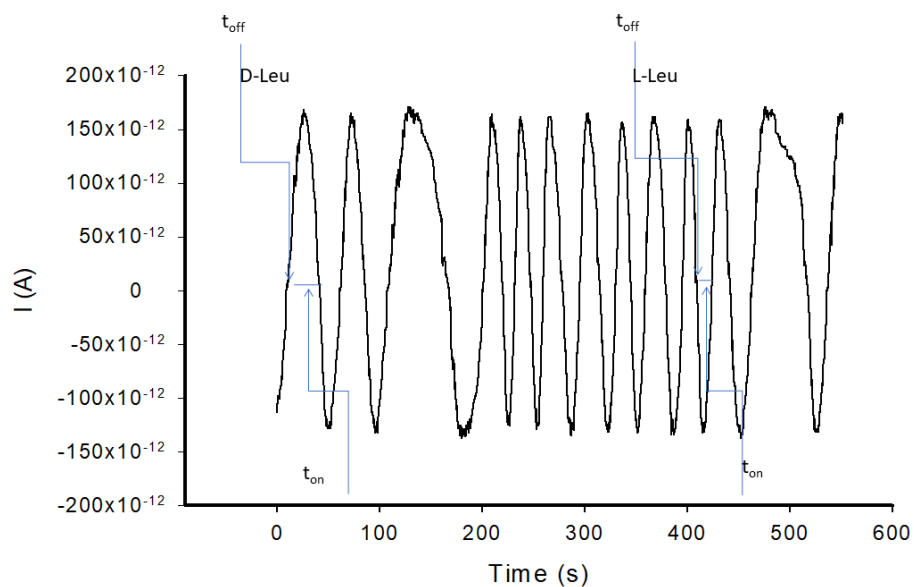
Etalonările au fost obținute pentru fiecare enantiomer folosind metoda regresiei liniare. Se utilizează forma ecuației de calibrare, care este:  $1/t_{\text{on}}=a+bx\text{Conc}_{\text{enantiomer}}$ . Valoarea  $t_{\text{on}}$  a fost citită între valorile  $t_{\text{off}}$ .

Principiul dezvoltării curente se bazează pe conductibilitatea canalului: la intrarea în canal, enantiomerul este blocat și, prin urmare, se produce un efect de curentul acesta scade până la zero. Timpul necesar pentru a intra în canal este asociat cu semnătura enantiomerului (valoarea  $t_{\text{off}}$ ), făcând parte din analiza calitativă. După intrarea în canal, au loc procese redox

de legare; timpul necesar pentru aceste procese ( $t_{on}$ ) este asociat cu cantitatea de enantiomer din probă (Figurile 3.3. și 3.4.).

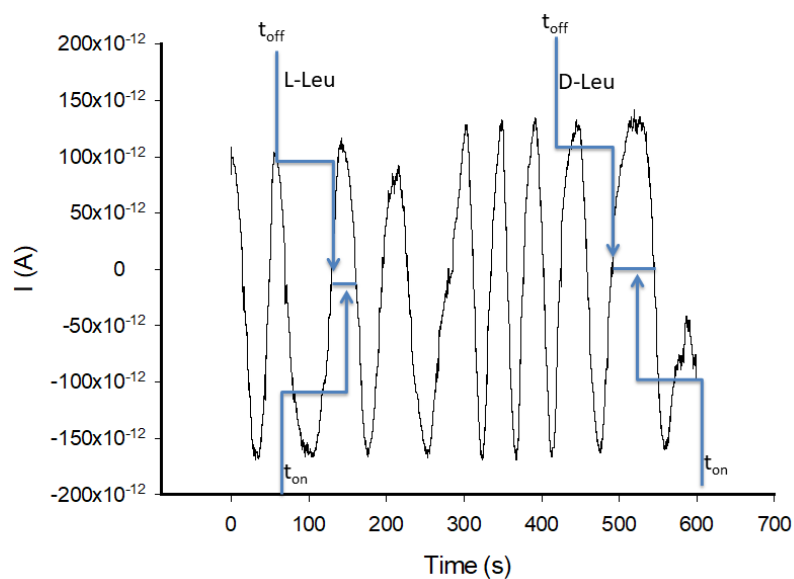


**Figura 3.3 .** Exemplu de diagramă obținută cu ajutorul senzorului stocastic enantioselectiv (Zn(II)-5(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(4-fenoxifenil)-porfirină/nanografenă) pentru determinarea L-și D-serinei.  $E=125\text{mV vsAg/gCl}$ ,  $C_{L\text{-serină}}=6.12 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $C_{D\text{-serină}}=5.07 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



(a)





(b)

**Figura 3.4.** Exemple de diagrame obținute pentru depistarea probelor de sânge integral cu ajutorul (a) senzorului stocastic enantioselectiv pe bază de pastă de grafit și (b) senzorului stocastic enantioselectiv pe bază de pastă de nanografene.

Determinarea concentrațiilor de L- și D-serină și L- și D-leucină a fost realizată cu ajutorul metodei ecuației de calibrare, prin introducerea valorii  $t_{on}$  în ecuația corespunzătoare.

Testul imunoenzimatic (ELISA) este o metodă standard utilizată pentru determinarea enantiomerilor de serină.

### 3.2.5. Probe de sânge

Probe de sânge integral de la voluntari sănătoși, precum și de la pacienți, precum și de la pacienți confirmați cu cancer de sân au fost obținute de la Spitalul Universitar București (aprobarea Comitetului de etică nr 11/2013; consimțământul informat a fost obținut de la toți subiecții). La probele de sânge integral au fost analizate fără niciun fel de pretratament.

## 3.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### 3.3.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici enantioselectivi

#### 3.3.1.1. L- și D-serină

Toate caracteristicile de răspuns au fost determinate de 25°C folosind cronoampermetria la temperatură de potențial de 125 mV față de Ag/AgCl.

În primul rând, au fost analizate semnăturile (valorile  $t_{off}$ ) de la L- și D-serină fiind și determinate. Semnătura pentru L-serină a fost de 1,8 s., în timp ce semnătura pentru D-serină a fost de 1,0 s.

**Tabelul 3.1.** Enantioanaliza serinei în sângele integral obținut de la pacienți confirmați cu cancer mamar utilizând un senzor stocastic enantioselective și un protocol ELISA standard.

Proba nr.	$\mu\text{mol L}^{-1}$ , L-serine		$\mu\text{mol L}^{-1}$ , D-serine	
	Metoda de screening	ELISA	Metoda de screening	ELISA
1	1.45±0.02	1.42±0.12	3.13± 0.04	3.02±0.12
2	8.77±0.03	8.70±0.14	3.75± 0.02	3.70±0.11
3	204.13±0.02	203.97±0.14	8.98± 0.03	8.90±0.11
4	25.72±0.03	25.17±0.15	6.41 ±0.01	5.97±0.15
5	2.86±0.01	2.85±0.12	1.44± 0.02	1.39±0.19
6	5.35±0.02	5.40±0.13	5.63± 0.01	5.60±0.10
7	27.45±0.03	27.40±0.17	3.56 ±0.02	3.56±0.13
8	26.56±0.02	26.50±0.12	2.35 ±0.01	2.34±0.12
9	6.93±0.01	6.92±0.12	1.11 ±0.02	1.30±0.10
10	10.46±0.03	10.40±0.15	4.32 ±0.02	4.30±0.12
11	9.36±0.02	9.36±0.16	8.53± 0.04	8.49±0.10
12	22.75±0.01	22.15±0.12	9.06± 0.03	9.07±0.15
13	3.11±0.02	3.11±0,13	4.04 ±0.01	3.95±0.1
14	9.83±0.05	9.80±0.13	9.98 ±0.02	9.90±0.17
15	6.12±0.03	6.10±0.20	5.06 ±0.02	5.00±0.17
t-test	2.22		2.19	

Ecuția de calibrare înregistrată pentru L-serină a fost:  $1/t_{on} = 0.03 + 3.82 \times 10^3 C_{L-serină}$  cu un coeficient de corelație  $r$  de 0.9999. Intervalul linear de concentrație a fost cuprins între  $1 \times 10^{-12}$  și  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , cu o limită de determinare de  $1 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ . Intervalul este capabil să acopere concentrațiile de L-serină la persoanele sănătoase și pacienții cu cancer mamar.

Ecuția de calibrare înregistrată pentru D-serină a fost:  $1/t_{on} = 0.03 + 4.71 \times 10^{10} C_{D-serină}$ , cu un coeficient de corelație  $r$  de 0.9995. Intervalul linear de concentrație a fost cuprins între  $1 \times 10^{-14}$  și  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  cu o limită de determinare de  $1 \times 10^{-14} \text{ mol L}^{-1}$ . Intervalul este capabil să acopere concentrația de D-serină la pacienții cu cancer mamar.

## 3.3.1.2. L- și D-leucină

Modul stocastic a fost utilizat pentru determinarea caracteristicilor de răspuns ale senzorilor stocastici enantioselectivi. Caracteristicile de răspuns sunt prezentate în Tabelul 3.2.

**Tabelul 3.2.** Caracteristicile de răspuns pentru senzorii stocastici enantioselectivi utilizați pentru enantioanaliza leucinei.

Senzor stocastic bazat pe N-methyl-fullero-pyrrolidine &	Leucină	Semnătură $t_{off}(s)$	Ecuatie de calibrare <sup>1</sup> , R	Sensibilitate, $s^{-1} g^{-1} L$	Limită de determinare, $ag L^{-1}$	Domeniul linear de concentrație, $g L^{-1}$
Graphite/Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	L	0.6	$1/t_{on} = 0.04 + 8.17 \times 10^{13}C$ r=0.9993	$8.17 \times 10^{13}$	10.00	$1 \times 10^{-17} - 1 \times 10^{-5}$
	D	0.8	$1/t_{on} = 0.01 + 1.42 \times 10^{13}C$ r=0.9994	$1.42 \times 10^{13}$	100.00	$1 \times 10^{-16} - 1 \times 10^{-9}$
Nanographene	L	2.2	$1/t_{on} = 0.02 + 3.44 \times 10^{12}C$ r=0.9995	$3.44 \times 10^{12}$	100.00	$1 \times 10^{-16} - 1 \times 10^{-4}$
	D	0.9	$1/t_{on} = 0.02 + 1.35 \times 10^{15}C$ r=0.9996	$1.35 \times 10^{15}$	1.00	$1 \times 10^{-18} - 1 \times 10^{-6}$

<sup>1</sup>  $\langle C \rangle = mol L^{-1}$ ;  $\langle t_{on} \rangle = s$ .

Semnăturile celor doi enantiomeri sunt diferite atunci când s-a utilizat același senzor stocastic, ceea ce dovedește că senzorii sunt enantioselectivi și că pot fi utilizați pentru testarea simultană a celor doi enantiomeri. Domeniile liniare de concentrație sunt largi, permițând enantioanaliza leucinei în probe de sânge integral, în ciuda stării de sănătate a persoanelor. S-au înregistrat limite de determinare foarte scăzute ( $ag L^{-1}$ ); pentru dozarea L-leucinei, cea mai mică limită de determinare a fost înregistrată atunci când s-a utilizat senzorul stocastic enantioselectiv pe bază de grafit/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, în timp ce pentru dozarea D-leucinei, cea mai mică limită de determinare a fost înregistrată pentru senzorul stocastic enantioselectiv pe bază de nanografene. L-leucina a fost determinată cu cea mai mare sensibilitate atunci când a fost utilizat senzorul pe bază de grafit/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, în timp ce D-leucina

a fost determinată cu cea mai mare sensibilitate atunci când a fost utilizat senzorul pe bază de nanografene.

### 3.3.2. Selectivitatea senzorilor propuși utilizat pentru determinarea serinei și leucinei

#### 3.3.2.1. L- și D-serină

Selectivitatea senzorilor stocastici este data de valorile înregistrate pentru semnătura posibilelor interferențe; o diferență de minimum 2 s între semnăturile posibilelor interferențe posibile și semnăturile enantiomerilor de serină confirm selectivitatea senzorului stocastic.

Următorii aminoacizi au fost testați ca posibile interferențe: L- și D-glutamină, L- și D-triptofan, L- și D-acid aspartic și L- și D-leucină.

Valorile înregistrate pentru semnăturile acestora au fost: L-glutamină 0,3 s, D-glutamină 0,7 s; L-triptofan 3,7 s; D-triptofan 3,3 s; acid L-aspartic 2,1 s; acid D-aspartic 2,5 s; leucine 1,5 s; D-leucină 2,8 s. Aceste valori au arătat că senzorul propus nu este doar enantioselectiv, dar este și selectiv față de acești aminoacizi.

#### 3.3.2.2. L- și D-leucină

Selectivitatea senzorilor stocastici este dată de diferența dintre semnalele (valorile  $t_{off}$ ) înregistrate pentru enantiomerii de leucină și cele obținute pentru CA15-3, CEA, HER2, p53, Ki67, maspin și CA19-9 - biomarkerii obișnuiți utilizați pentru stabilirea diagnosticului de cancer de sân.

**Tabelul 3.3.** Selectivitatea senzorilor stocastici.

Senzor stocastic bazat pe N-methyl-fulleropyrrolidine &	CA15-3	CEA	HER2	Maspin	Ki67	CA19-9	p53	L-leucină	D-leucină
	Semnătură (s)								
Graphite/Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.1	1.5	2.2	1.9	3.0	2.4	3.5	0.6	0.8
Nanographene	0.2	0.6	3.0	2.5	3.2	2.8	1.7	2.2	0.9

Rezultatele prezentate în Tabelul 3.3, au dovedit că niciunul dintre ceilalți biomarkeri nu interferează în enantioanaliza leucinei, în ciuda matricei utilizate pentru proiectarea senzorului stocastic.

Au fost construiți zece senzori stocastici enantioselectivi din fiecare dintre cele două tipuri concepute pentru enantioanaliza leucinei. Caracteristicile de răspuns au fost măsurate

zilnic timp de o lună. Nu s-au înregistrat modificări semnificative ale sensibilității, variația acesteia fiind mai mică de 0,15%, ceea ce dovedește reproductibilitatea proiectării fiecărui tip de senzor stocastic. După o lună de măsurători, variația sensibilităților înregistrate din nou a fost mai mică de 1,2%, ceea ce dovedește că senzorii sunt stabili timp de cel puțin o lună.

### 3.3.3. Enantioanaliza serinei în probe de sânge integral utilizat pentru determinarea L- și D-serină

Enantiomerii serinelor au fost identificați în diagramele obținute în urma screening-ului în probele de sânge integral, cu ajutorul senzorului stocastic enantioselectiv, în funcție de semnăturile acestora. Probele de sânge integral de la pacienți confirmați cu cancer mamar, precum și de la voluntari sănătoși au fost examinate cu ajutorul senzorului propus. Rezultatele sunt prezentate în Tabelele 3.1. și 3.2.

**Tabelul 3.4.** Antioanaliza serinei în sângele integral obținut de la voluntari sănătoși, utilizând un senzor stocastic enantioselectiv și un protocol ELISA standard.

Numărul probei	$\mu\text{mol L}^{-1}$ , L-serine	
	Metoda de screening	ELISA
1	209.15 $\pm$ 0.03	209.20 $\pm$ 0.17
2	293.63 $\pm$ 0.03	291.93 $\pm$ 0.17
3	315.40 0.02	314.87 $\pm$ 0.13
4	123.41 $\pm$ 0.03	123.50 $\pm$ 0.15
5	178.65 $\pm$ 0.04	178.79 $\pm$ 0.20
t-test	2.67	

O corelație foarte bună între concentrațiile de enantiomeri ai serinei a fost obținută prin metoda de screening (bazată pe utilizarea metodei enantioselective a senzorului stocastic) și ELISA (metodă standard de analiză a enantiomerilor de serină).

S-a efectuat un test t student împerecheat la nivelul de încredere de 99,00 % (valoare toretică t-value: 4,032). Valorile t calculate pentru fiecare dintre senzori și pentru fiecare tip de eșantion au fost mai mici de 4,032; aceste rezultate au arătat că nu există o valoare semnificativă din punct de vedere static diferență static semnificativă între rezultatele obținute cu ajutorul senzorului stocastic propus și ELISA (Tabelele 3.1. și 3.4.). În consecință, metoda de screening propusă este validată pentru a fi utilizată pentru enantioanaliza serinei în probe de sânge integral. Absența D-serinei în probele de sânge integral de la voluntari sănătoși poate

indica faptul că D-serina este un biomarker capabil să fie utilizat pentru diagnosticarea precoce a cancerului mamar. În plus, enantioanaliza serinei poate fi un factor cheie pentru diagnosticarea precoce a cancerului mamar.

Principalele avantaje ale utilizării metodei propuse pentru enantioanaliza de serine au fost că pot asigura un cost redus al analizei cantitative și calitativă a L- și D-serină; ambii enantiomeri pot fi analizați simultan, iar cancerul mamar poate fi identificat într-un stadiu foarte timpuriu.

În proiectarea senzorului nu s-au utilizat enzime, ceea ce face ca senzorul să fie stabil în timp și să aibă avantaje semnificative în ceea ce privește fiabilitatea.

### 3.3.4. Enantioanaliza leucinei în probe de sânge integral utilizat pentru determinarea L- și D-leucină

Probele de sânge integral au fost utilizate așa cum au fost recoltate de la pacienți, fără niciun fel de prelucrare. Măsurătorile au fost efectuate în conformitate cu descrierea metodei stocastice de mai sus. După ce s-au obținut diagramele (Figura 3.3. și 3.4), au fost identificate semnăturile L- și D-leucinei și după ce au fost citite valorile  $t_{on}$  între cele două valori  $t_{off}$ . Pentru a valida senzorii, amestecuri cunoscute de enantiomeri (în diferite proporții) au fost introduse în probe de sânge integral și s-a realizat recuperarea enantiomerilor (Tabelul 3.5.).

S-au efectuat determinări ale enantiomerilor de leucină înainte și după adăugarea amestecurilor, pentru a calcula recuperarea cantității cunoscute adăugate.

**Tabelul 3.5.** Teste de recuperare a L- și D-leucinei în probe de sânge integral (N=10).

L:D	Recuperare, %													
	1:99		1:50		1:25		1:1		25:1		50:1		99:1	
Enantio mer	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
Senzor pe bază de Graphite /Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	99.10±0. 05	96.98± 0.02	97.95± 0.04	99.18±0 .02	99.00±0 .02	98.75±0 .03	98.82 ±0.02	98.99 ±0.01	99.15±0 .01	99.10± 0.03	99.99±0 .01	97.98± 0.02	98.16± 0.03	99.90± 0.02
Senzor bazat pe Nanograp hene	99.32±0. 02	96.50± 0.03	98.00± 0.02	99.53±0 .03	99.18±0 .03	99.65±0 .02	98.09 ±0.01	99.99 ±0.03	99.13±0 .02	99.76± 0.02	99.12±0 .03	97.00± 0.04	97.43± 0.02	99.66± 0.03

**Tabelul 3.5.** arată că s-au obținut recuperări ridicate de enantiomeri în sângele integral, în ciuda raporturilor dintre L- și D-leucină în sângele integral. Acest lucru a dovedit acuratețea și fiabilitatea ridicată a măsurătorilor.

Probele reale de sânge integral colectate de la pacienți confirmați cu cancer mamar și de la voluntari sănătoși au fost analizate cu ajutorul senzorilor stocastici enantioselectivi. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 3.6.

**Tabelul 3.6.** Enantioanaliză a leucinei în probele de sânge integral (N=10).

Proba Nr.	Starea de sănătate	L-leucină, pg mL <sup>-1</sup>		D-leucină, ng mL <sup>-1</sup>	
		Graphite/Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Nanographene	Graphite/Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Nanographene
Senzor stocastic bazat pe N-methyl-fullero-pyrrolidine &					
1	Confirmat cu cancer de sân	8.62±0.02	8.08±0.01	3.52±0.02	3.30±0.03
2		0.48±0.01	0.49±0.03	5.00±0.03	4.75±0.02
3		8.25±0.01	8.71±0.03	0.20±0.01	0.18±0.02
4		15.48±0.02	16.02±0.03	1.87±0.02	1.69±0.03
5		6.11±0.01	5.50±0.03	1.00±0.02	1.00±0.03
6		1.24±0.03	0.98±0.02	2.00±0.01	2.17±0.02
7		3.47±0.01	2.93±0.02	2.60±0.03	2.58±0.01
8		0.08±0.01	0.07±0.02	33.10±0.02	35.01±0.01
9		2.91±0.01	2.26±0.03	5.23±0.03	5.00±0.01
10		8.30±0.03	8.12±0.01	1.17±0.03	1.18±0.01
1	Voluntari sănătoși	18.21±0.01	18.34±0.02	-*	-*
2		20.58±0.02	20.84±0.01	-*	-*
3		5.48±0.01	5.12±0.03	-*	-*
4		32.25±0.02	32.40±0.01	-*	-*
5		7.12±0.01	7.15±0.03	-*	-*
6		27.16±0.02	27.19±0.01	-*	-*
7		52.01±0.03	51.15±0.02	-*	-*
8		4.89±0.01	4.68±0.03	-*	-*
9		51.97±0.03	52.53±0.01	-*	-*
10		43.47±0.01	43.50±0.02	-*	-*
t-test		2.96		3.01	

\* D-leucina nu a fost găsită.

A fost efectuat un test t la un nivel de încredere de 99,90%. Valorile t calculate pentru fiecare enantiomer de leucină au fost mai mici de 3,10, ceea ce indică faptul că nu există

nicio diferență semnificativă din punct de vedere statistic între rezultatele obținute cu ajutorul senzorilor stocastici enantioselectivi propuși (tabelul 4) și că senzorii stocastici enantioselectivi pot fi utilizați pentru identificarea și cuantificarea moleculară a L- și D-leucinei în probele de sânge integral. Mai mult, D-leucina a fost găsită doar în probele recoltate de la pacienți confirmați cu cancer de sân, și nu în sângele integral de la voluntari sănătoși.

### 3.4. CONCLUZII

Un senzor stocastic enantioselectiv a fost proiectat și utilizat pentru screening-ul de probe de sânge pentru L- și D-serină. Zn(II)-5(4-carboxifenil)-10,15,20-tris (4 fenoxifenil) porfirină a fost utilizată pentru a modifica o pasta de nanografene, care a fost introdusă într-un tub de plastic neconductor pentru a obține senzorul stocastic enantioselectiv. Senzorul a avut o sensibilitate ridicată pentru ambii enantiomeri și, de asemenea, limite de determinare scăzută.

Validarea senzorului a arătat că există o bună corelație între rezultatele obținute prin metoda de depistare propusă și ELISA demonstrând adecvarea metodei propuse pentru enantioanaliza serinei în probele de sânge integral.

În plus, această metodă a demonstrat că D-serina poate fi un biomarker pentru diagnosticarea precoce a cancerului mamar.

În ceea ce privește leucina, senzorii stocastici enantioselectivi propuși s-au dovedit a avea caracteristici deosebite în analiza biomedicală. Utilizarea lor pentru depistarea probelor de sânge integral poate aduce testul de depistare foarte aproape de testul de diagnosticare, deoarece D-leucina a fost găsită doar la pacienții confirmați cu cancer de sân, și nu la voluntarii sănătoși.



## CAPITOLUL IV

# MICROSENZORI STOCASTICI BAZAȚI PE NANOPULBERI DE CARBON PENTRU DETERMINAREA ULTRASENSIBILĂ A CA15-3, CEA ȘI HER-2 ÎN SÂNGELE INTEGRAL

### 4.1. INTRODUCERE

CA15-3, CEA și HER-2 joacă rolul de biomarkeri care are un prognostic și poate facilita tratamentul personalizat pentru cancerul mamar. HER-2 pozitiv cancer mamar ține cont să fie mai agresiv decât cancerul mamar HER-2 negativ. Au fost propuse numeroase metode pentru dozarea CA15-3, CEA și HER-2 (Tabelul 4.1). Prin urmare, această lucrare propune doi noi microsenzori stocastici pe bază de carbon nanopulbere (nC) modificate cu nanoparticule de aur (AuNp) și două porfirine – 5,10,15,20-tetrafenil-21H, 23H-porfirină (TPP) și 5,10,15,20-tetrakis (clorură de pentafluorofenil) – 21H, 23H-fer (III) porfirină [Fe(TPFPP)Cl] – pentru dozarea simultană a CEA, CA15-3 și HER-2, deoarece un test de depistare bazat pe analiza simultană a acestora va furniza mai multe informații despre diagnosticarea și tratamentul personalizat al cancerului mamar. Noutatea lucrării, pe lângă noul design utilizat pentru microsenzorii stocastici propuși pentru dozarea CEA, CA15-3 și HER-2, constă în utilizarea unui singur instrument de dozarea simultană a celor trei biomarkeri.

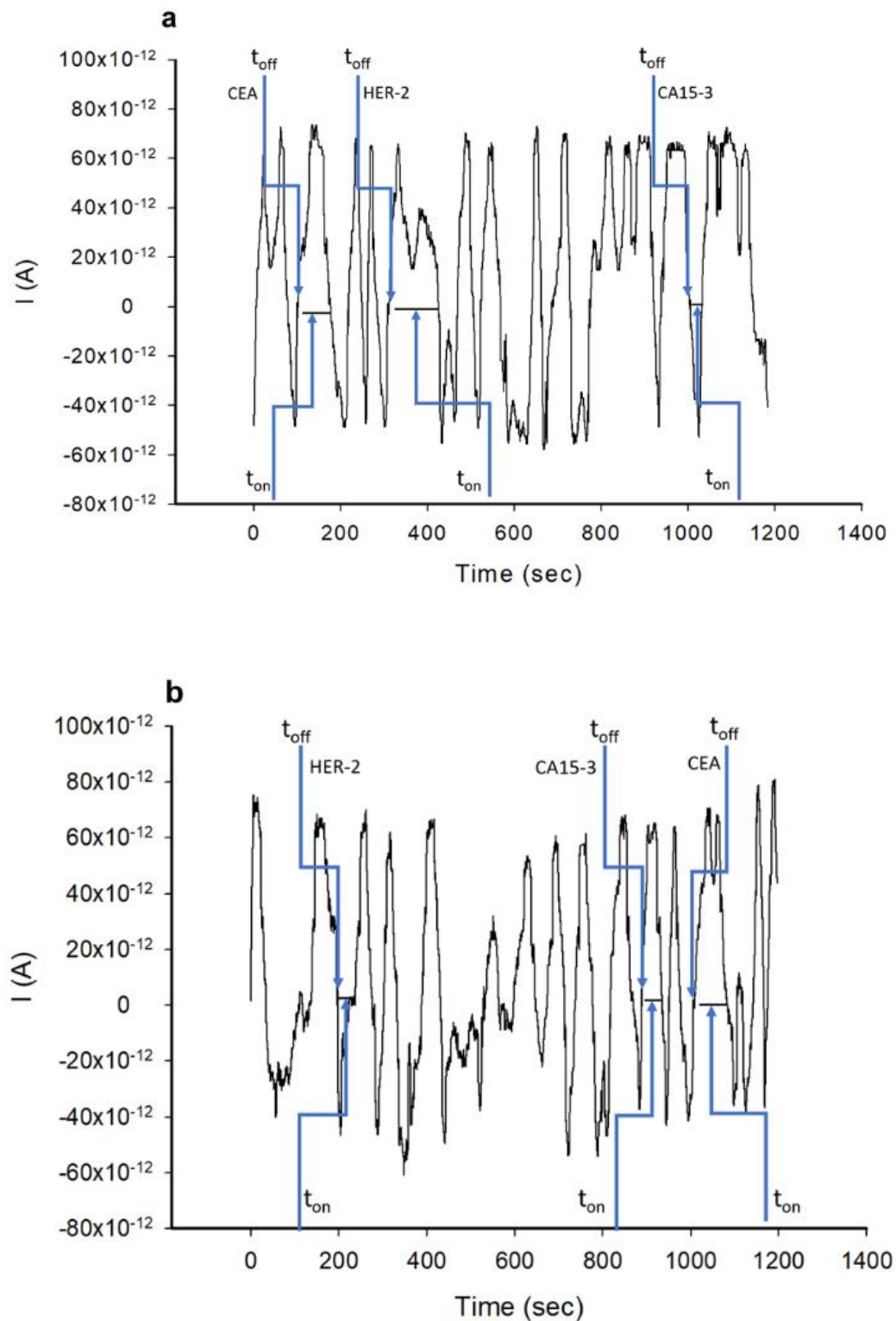
Mecanismul de dezvoltare a curentului pentru senzorii stocastici se bazează pe conductivitatea canalului: molecula intră în canal și curentul scade la zero până când toată molecula este în interiorul canalului – timpul necesar pentru a intra în canal depinde de mărimea, volumul, conformația, capacitatea de desfășurare (dacă este proteică) și viteza determinate de potențialul aplicat, și este cunoscut sub numele de semnătură moleculară, notată ca valoarea  $t_{off}$  pe diagrame. Între timp, în canal, au loc procese redox, într-un timp de echilibru numit  $t_{on}$  pe diagrame, valoarea  $t_{on}$  se citește între două valori  $t_{off}$ , iar aceasta depinde de concentrația moleculei în fluidul biologic în care molecula este determinată.

## 4.2. PARTEA EXPERIMENTALĂ

### 4.2.1. Materiale și metode

Toate substanțele chimice au fost de calitate analitică. Pentru prepararea soluțiilor utilizate în experimente s-a folosit apă deionizată. Toate soluțiile CA15-3, CEA și HER-2 au fost preparate în soluție tampon fosfat (PBS, pH=7,40). Celula electrochimică a fost compusă din trei electrozi: electrodul de referință (Ag/AgCl), contraelectrodul (Pt) și electrodul de lucru (microsenzorul stocastic). Pentru măsurarea valorilor  $t_{on}$  și  $t_{off}$  a fost utilizată o metodă cronoamperometrică, la un potențial constant (125 mV vs Ag/AgCl).

Pentru proiectarea microsenzorilor: 100 mg de nanopulbere de carbon au fost amestecate cu 10  $\mu$ L suspensie de nanoparticule de aur și s-a adăugat ulei de parafină până când s-a obținut o pastă. Pasta a fost împărțită în două părți egale, iar pe fiecare s-au adăugat 50  $\mu$ L din una dintre următoarele porfirine: 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfirină (TPP/AuNp) sau 5,10,15,20 -tetrakis (clorură de pentafluorfenil)-21H,23H-fier (III) porfirină (Fe(TPFPP)Cl/AuNp). Sârma de argint a servit ca contact între pastă și circuitul extern. A fost utilizată o metodă cronoamperometrică pentru măsurătorile  $t_{on}$  și  $t_{off}$  la un potențial constant (125 mV vs Ag/AgCl). Valoarea potențialului aplicat (125 mV vs Ag/AgCl) a fost determinată experimental; au fost aplicate potențiale între 0,05 și 250mV; cea mai bună formă a semnalului stocastic a fost obținută atunci când a fost aplicat un potențial de 125 mV vs Ag/AgCl. Pe baza valorii  $t_{off}$ , analitul a fost identificat în diagramele înregistrate cu microsenzorii stocastici, iar apoi a fost citită în continuare valoarea  $t_{on}$  și utilizată pentru determinarea concentrației fiecărui biomarker (Figura 4.1). Concentrațiile necunoscute de CA15-3, CEA și HER-2 în probele de sânge integral au fost determinate din ecuațiile de calibrare ( $1/t_{on} = a + b \times C_{biomarker}$ ) înregistrate cu fiecare dintre senzori pentru fiecare dintre biomarkeri.



**Figura 4.1.** Recunoașterea modelului CA15-3, CEA și HER-2 în probele de sânge integral, utilizând un microsenzor stocastic pe bază de: a) Fe(TPFPP)Cl/AuNp și (b) TPP/AuNp.

Probele de sânge integral au fost obținute de la Spitalul Universitar București (cu aprobarea comitetului de etică nr. 11/2013). Celula electrochimică a fost încărcată cu probă

biologică, iar după înregistrarea diagramei și identificarea semnăturilor CA15-3, CEA și HER-2, concentrațiile necunoscute ale biomarkerilor din probele de sânge integral au fost determinate utilizând metoda stocastică descrisă mai sus.

### 4.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

#### 4.3.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic

Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor propuși sunt prezentate în Tabelul 4.1. Toate caracteristicile de răspuns au fost determinate la 25 °C, atunci când un potențial de 125 mV versus Ag/AgCl a fost aplicat. În primul rând, au fost înregistrate semnături diferite (valori  $t_{off}$ ) pentru CA15-3, CEA și HER-2 pentru fiecare dintre microsenzorii stocastici, dovedind că cei trei biomarkeri pot fi determinați simultan în probe de sânge integral.

**Tabelul 4.1.** Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici utilizați pentru testarea CA15-3,CEA și HER-2.

Microsenzor stocastic bazat pe nC	Semnătură $t_{off}$ (s)	Domeniul linear de concentrație	Ecuatii de calibrare; coeficient de corelație, $r^*$	Sensibilitate	LOQ
Fe(TPFPP)Cl/AuNp	CA15-3*				
	4.7	1.00x10 <sup>-7</sup> - 1.00x10 <sup>3</sup>	1/ $t_{on}$ = 0.03 + 5.80x10 <sup>3</sup> xC r=0.9998	5.80x10 <sup>3</sup>	1.00x10 <sup>-7</sup>
	CEA**				
	0.6	1.28x10 <sup>-5</sup> - 2.00x10 <sup>-1</sup>	1/ $t_{on}$ = 0.04 + 6.16x10xC r=0.9993	6.16x10	1.28x10 <sup>-5</sup>
	HER 2**				
	2.6	3.90x10 <sup>-9</sup> - 3.90x10 <sup>-5</sup>	1/ $t_{on}$ = 0.02 + 1.43x10 <sup>5</sup> xC r=0.9999	1.43x10 <sup>5</sup>	3.90x10 <sup>-9</sup>
TPP/AuNp	CA15-3*				
	6.8	1.00x10 <sup>-7</sup> - 1.00x10 <sup>3</sup>	1/ $t_{on}$ = 0.04 + 2.32x10 <sup>3</sup> xC r=0.9994	2.32x10 <sup>3</sup>	1.00x10 <sup>-7</sup>
	CEA**				
	1.9	1.00x10 <sup>-7</sup> - 1.00	1/ $t_{on}$ = 0.03 + 1.90x10 <sup>4</sup> xC r=0.9997	1.90x10 <sup>4</sup>	1.00x10 <sup>-7</sup>
	HER 2**				
1.3	3.50x10 <sup>-8</sup> - 3.90x10 <sup>-5</sup>	1/ $t_{on}$ = 0.03 + 3.53x10 <sup>4</sup> xC r=0.9986	3.53x10 <sup>4</sup>	3.50x10 <sup>-8</sup>	

\* $\langle C \rangle = U \text{ mL}^{-1}$ ;  $\langle t_{\text{on}} \rangle = s$ ;  $\langle \text{Sensibilitate} \rangle = s^{-1} U^{-1} \text{ mL}$ ; \*\* $\langle C \rangle = \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $\langle t_{\text{on}} \rangle = s$ ;  $\langle \text{Sensibilitate} \rangle = s^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{ mL}$ ;  
LOQ – limită de cuantificare

Toate intervalele liniare de concentrație sunt largi, făcând posibilă determinarea acestor biomarkeri în oricare dintre stadiile cancerului de mamar.

Sensibilitatea este, de asemenea, foarte ridicată. Sensibilități mai mari au fost înregistrate în cazul testării CEA și HER-2 atunci când a fost utilizat senzorul bazat pe TPP/AuNp. În comparație cu cei mai recentți senzori utilizați pentru testarea CA15-3, CEA și HER-2 (Tabelul 4.1), se poate concluziona că senzorul bazat pe TPP/AuNp a prezentat cea mai inferioară limită de determinare (ordinul de mărime  $\text{fg mL}^{-1}$ ), iar pentru testarea HER-2, senzorul bazat pe Fe(TPFPP)Cl/AuNp a prezentat cea mai mică limită de determinare. Pentru testarea CA15-3, deși limitele de determinare sunt mai mari decât cele raportate anterior [288-290], senzorii propuși pot fi utilizați pentru testarea CA15-3 fără a fi nevoie de nici o procesare a probei, intervalul de concentrația lineară acoperă pacienții cu cancer mamar în orice stadiu al bolii.

Avantajele senzorilor propuși față de cei prezentați în Tabelul 4.1. sunt, de asemenea, următoarele: pot realiza detecția simultană a celor trei biomarkeri; nu este necesară prelevarea de probe înainte de măsuratori; analiza calitativă fiabilă a fiecărui biomarker este urmată imediat de analiză a acestuia.

#### **4.3.2. Măsurătorile de stabilitate și reproductibilitate**

Zece senzori stocastici pentru fiecare dintre cele două tipuri au fost proiectați [TPP/AuNp și Fe(TPFPP)Cl/AuNp] iar măsurătorile au fost efectuate zilnic timp de o lună.

Măsurătoarea pentru fiecare tip de senzor a demonstrat că nu există modificări semnificative ale sensibilității, variația acesteia fiind pentru fiecare tip mai mică de 0,12%; aceasta a dovedit reproductibilitatea designului fiecărui tip de senzor stocastic. După 30 de zile de măsurători, variația sensibilităților înregistrate pentru senzorul stocastic bazat pe TPP/AuNp a fost mai mică de 0,11%, în timp ce, pentru senzorul stocastic bazat pe Fe(TPFPP)Cl/AuNp, aceasta a fost mai mică de 0,08%; acest lucru a dovedit că senzorii sunt stabili timp de cel puțin o lună, atunci când se efectuează măsurători zilnice.

#### **4.3.3. Selectivitatea microsenzorilor stocastici**

Selectivitatea microsenzorilor stocastici este dată de diferența dintre semnăturile (valorile  $t_{\text{off}}$ ) înregistrate pentru CA15-3, CEA și HER-2 și cele obținute pentru alți biomarkeri/substanțe din probele biologice. Posibilele specii de interferență selectate au fost: p53, Ki67, maspin, CA19-9, acid ascorbic, dopamină și acid uric.

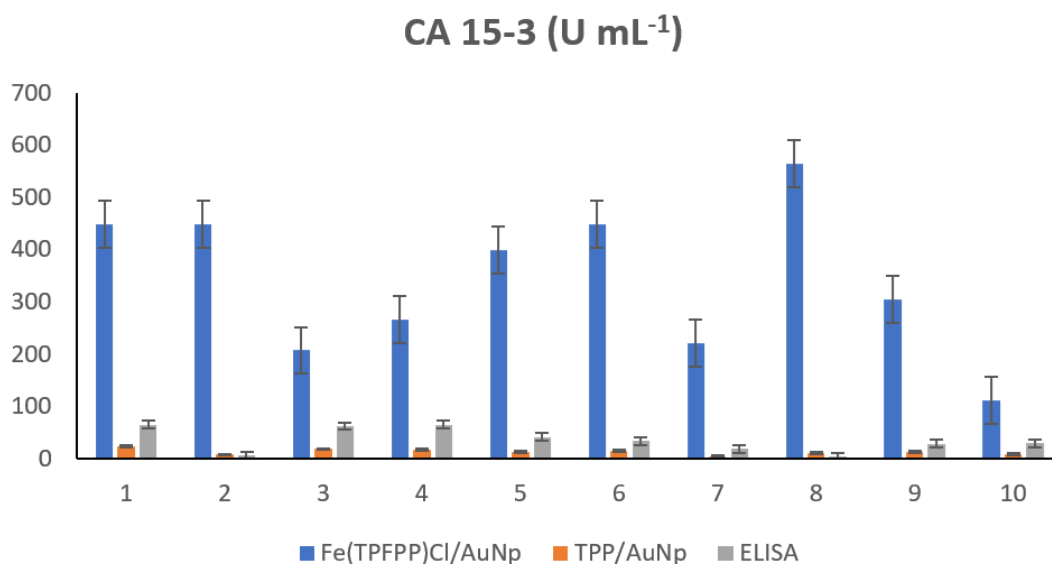
Rezultatele prezentate în Tabelul 4.2 au demonstrat că niciuna dintre presupusele specii interferențe nu interferează cu analiza simultană a CA15-3, CEA și HER-2.

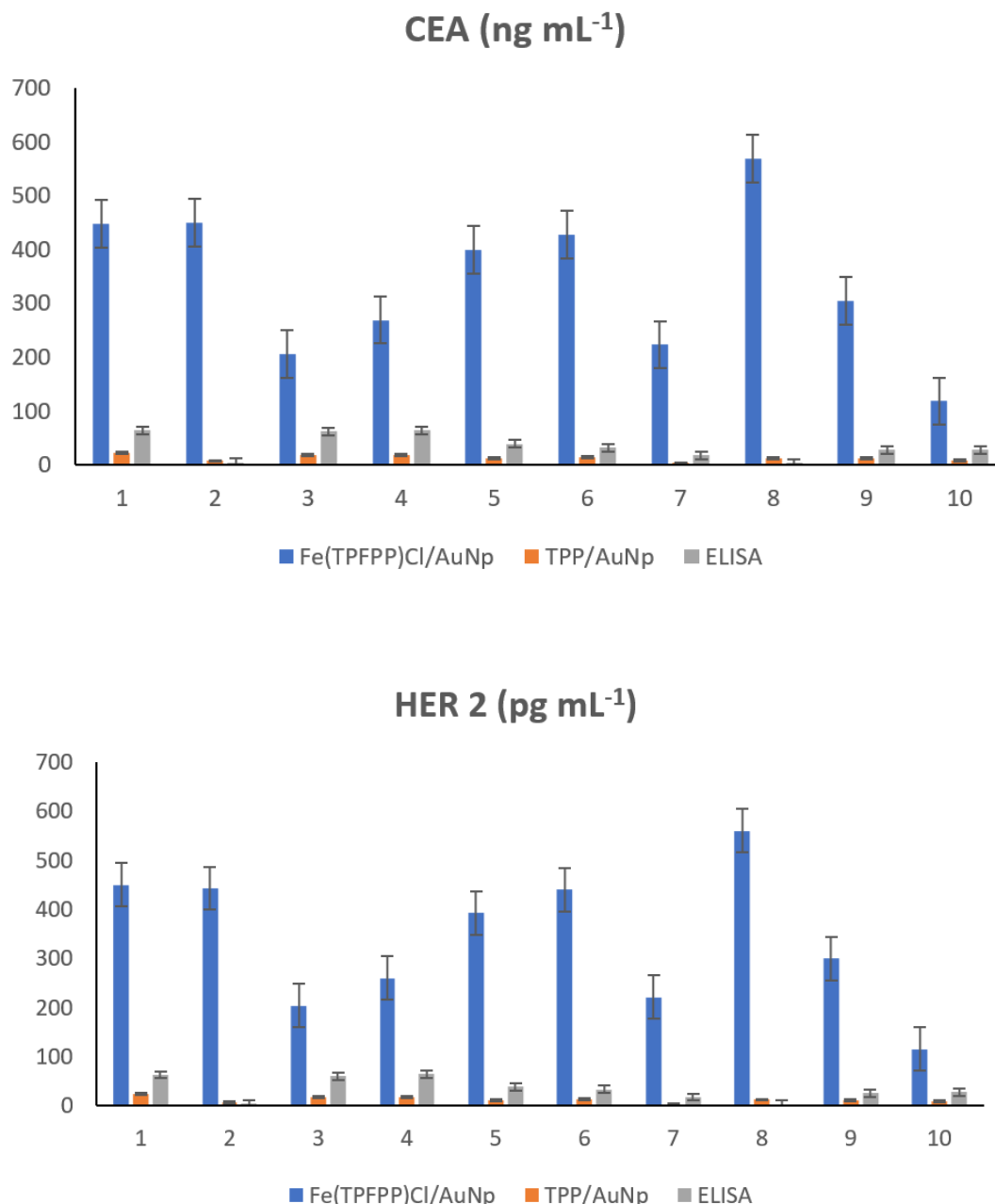
**Tabelul 4.2.** Selectivitatea microsenzorilor stocastici.

Microsenzor stocastic pe bază de nC	Semătură (s)									
	CA15-3	CEA	HER2	Maspin	Ki67	CA19-9	p53	Acid ascorbic	Dopamină	Acid uric
Fe(TPFPP)Cl/AuNp	4.7	0.6	2.6	2.0	1.3	3.0	3.5	0.2	1.7	3.2
TPP/AuNp	6.8	1.9	1.3	2.3	3.2	2.5	0.8	0.4	1.5	0.2

#### 4.3.4. Determinarea simultană ultrasensibilă a CA15-3, CEA și HER-2 în sângele integral

Zece probe de sânge integral de la pacienții confirmați cu cancer mamar au fost examinate utilizând cei doi microsenzori stocastici. La scurt timp după citirea valorilor  $t_{off}$ , între două valori  $t_{off}$ , au fost citite valorile  $t_{on}$  corespunzătoare. Valorile  $t_{on}$  au fost utilizate pentru a determina concentrațiile de CA15-3, CEA și HER-2 în probele de sânge integral, în funcție de metoda stocastică descrisă mai sus. Rezultatele obținute în urma screening-ul probelor de sânge integral sunt prezentate în Tabelul 2 și Figura 2.





**Figura 4.2.** Determinarea cantitativă a (a) CA15-3, (b) CEA și (c) HER-2 în probe de sânge integral, utilizând microsenzori stocastici pe bază de: Fe(TPFPP)Cl/AuNp și TPP/AuNp, iar standardul prin metoda standard - ELISA.

S-au obținut corelații foarte bune între rezultatele obținute cu ajutorul celor doi microsenzori stocastici. De asemenea, a fost efectuat un test - t la un nivel de încredere de 99,00% (valoarea t teoretică tabelată: 4,032) pentru fiecare biomarker. Toate valorile t calculate au fost mai mici decât valoarea tabelată, dovedind că nu există nicio diferență semnificativă din punct de vedere statistic între rezultatele obținute cu ajutorul celor doi microsenzori stocastici și ELISA (testul standard, metoda utilizată pentru testarea acestor biomarkeri în

probele de sânge integral) (Tabelul 4.2. și Figura 4.2.). În consecință, microsenzorii stocastici propuși pot fi utilizați în mod fiabil pentru determinarea ultrasensibilă simulată a CA15-3, CEA și HER-2 în probele de sânge integral.

#### **4.4. CONCLUZII**

Microsenzorii stocastici propuși au fost utilizați pentru testarea simultană a CA15-3, CEA și HER-2 în probe de sânge integral. Domeniile lor de concentrație liniară de lucru acoperă pacienții cu cancer mamar în orice stadiu al bolii, determinările fiind efectuate cu sensibilitate ridicată. Testul de screening bazat pe utilizarea celor doi microsenzori ca instrumente de screening poate fi utilizat pentru depistarea precoce a cancerului mamar, pentru determinarea necesității unui tratament personalizat, precum și pentru determinarea eficienței tratamentului împotriva cancerul mamar.



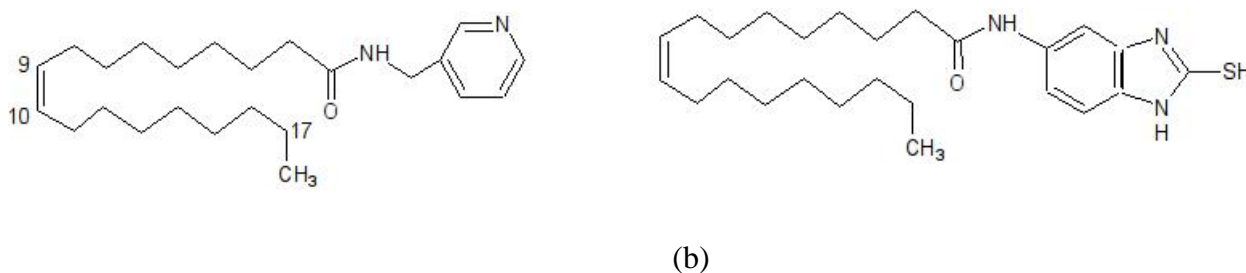
## CAPITOLUL V

TESTAREA ULTRASENSIBILĂ A HER-1, HER-2 ȘI  
HEREGULIN- $\alpha$  ÎN SÂNGELE INTEGRAL

## 5.1. INTRODUCERE

HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  au avut rolul de biomarkeri de prognostic, dar pot fi, de asemenea, utilizați pentru a facilita un tratament personalizat. Cu excepția metodelor standard bazate pe utilizarea ELISA (testul imunoenzimatic de imunoabsorbție) pentru testarea HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$ , au fost propuse diferite metode de analiză. Datorită importanței testării simultane a HER-1, HER-2 și heregulinei- $\alpha$  în probe biologice, există o nevoie reală de a dezvolta metode de screening rapid și ultrasensibile pentru determinarea lor într-o singură rundă (simultan), în probe reale. Prin urmare, în această lucrare, am propus doi microsenzori stocastici pe bază de oleamide imobilizate fizic în pasta de nanografene decorate cu Cupru sferoidal, pentru testarea simultană a HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  în probe de sânge integral.

Noutatea lucrării este dată de dozarea simultană a HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$ , precum și de utilizarea oleamidelor ca modificatori ai pastelor de nanografene decorate cu Cupru sferoidal. Oleamidele selectate pentru dozarea ultrasensibilă a HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  au fost: HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$ : N-(piridină-3-il-metil) oleamidă (O1) și N-(2-mercapto-1H-benzo [d] imidazole-5-il) oleamidă (O2) (Figura 5.1.).



**Figura 5.1.** Structurile (a) N-(piridin-3-il-metil) oleamidei (O1) și (b) N-(2-mercapto-1H-benzo[d]imidazol-5-il) oleamidei (O2).

## 5.2. PARTEA EXPERIMENTALĂ

### 5.2.1. Materiale și reacți

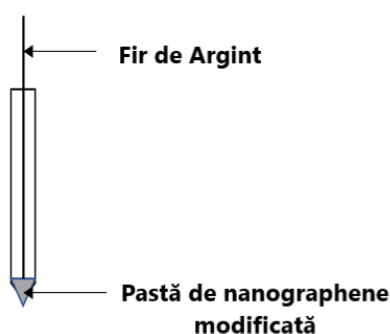
Toate substanțele chimice au fost de calitate analitică. Pentru prepararea soluțiilor utilizate în experimente s-a folosit apă deionizantă. Toate soluțiile HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  au fost preparate în soluție tampon de fosfat (PBS, pH=7,40). Atunci când nu au fost utilizate, soluțiile au fost păstrate la o temperatură de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2.2. Aparatură și metode

Toate măsurătorile electrochimice ale soluțiilor de HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  și ale probelor de sânge integral au fost efectuate prin conectarea unui computer care avea software-ul GPES. Celula electrochimică a fost compusă din trei electrozi: electrodul de referință (Ag/AgCl), contraelectrodul (Pt) și electrodul de lucru (microsenzorul stocastic). Toate măsurătorile au fost efectuate la  $25^{\circ}\text{C}$ . Pentru măsurarea valorilor  $t_{\text{on}}$  și  $t_{\text{off}}$  s-a utilizat o metodă cronoamperometrică, la un potențial constant (125 mV vs. Ag/AgCl).

### 5.2.3. Proiectarea microsenzorilor stocastici

100 mg de pulbere de nanografene a fost amestecată fizic cu 10 mg de Cupru sferoidal. Nanografena, în comparație cu oxidul de grafenă, oferă o suprafață mai bună pentru canalele formate de modificador (oleamidă); în plus, există o creștere a ariei suprafeței care influențează sensibilitatea senzorului. Amestecul a fost împărțit în două părți egale, iar în fiecare parte s-au adăugat  $50\mu\text{L}$  de soluție de O1, respective O2 ( $10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ ). Fiecare pastă modificată a fost plasată într-un tub de plastic neconductor imprimat cu ajutorul unei imprimante 3D din laboratorul nostru, având un diametru interior de  $50\mu\text{m}$  și o lungime de 5 mm (**Schema 5.1.**).

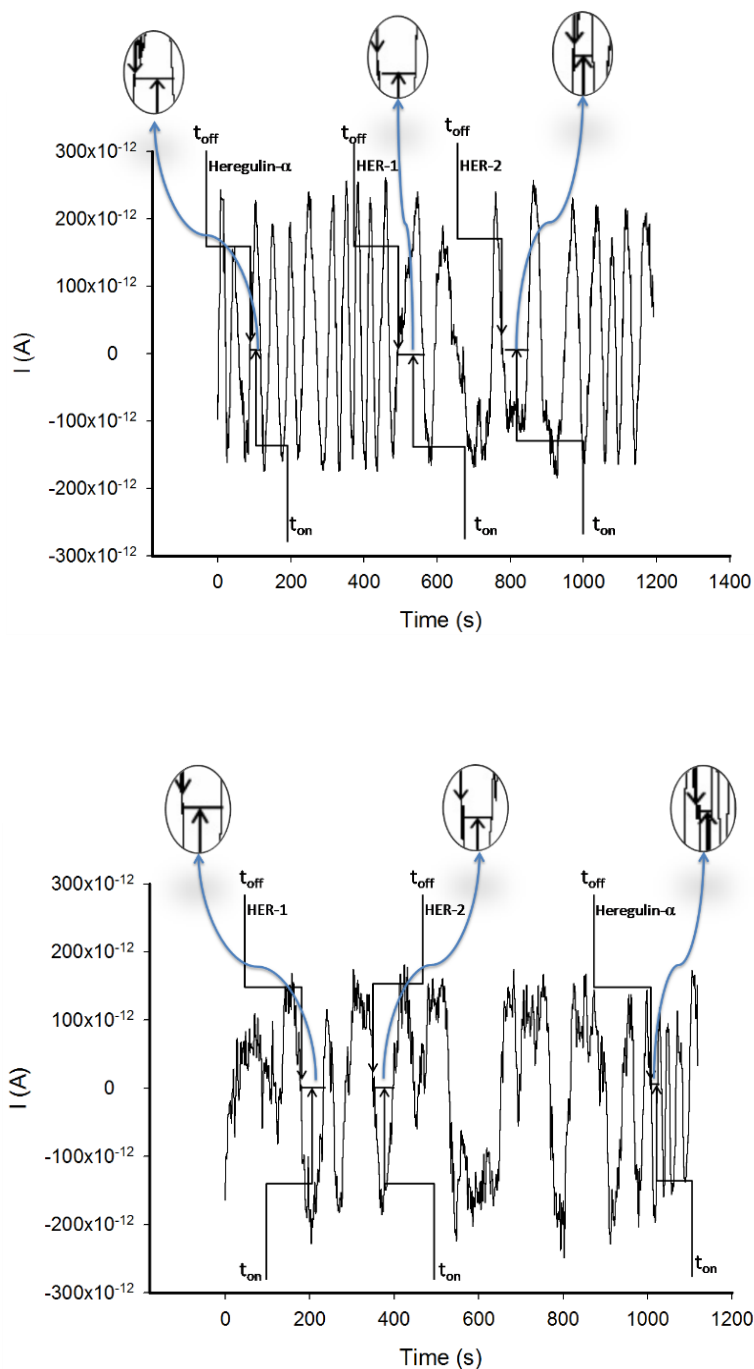


**Schema 5.1.** Proiectarea microsenzorului stocastic

### 5.2.4. Proceduri recomandate: Metoda stocastică

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

5.2). Concentrațiile necunoscute de HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  în probe de sânge integral au fost determinate din ecuația de calibrare  $1/t_{on} = a+bx C_{biomarker}$  înregistrată cu fiecare sensor pentru fiecare biomarker.



**Figura 5.2.** Recunoașterea tiparelor HER-1, HER-2, heregulin- $\alpha$  în probe de sânge integral, utilizând microsenzori stocastici pe bază de nanografene decorate cu Cupru sferoidal și (a) N-(piridină-3-il-metil) oleamidă (O1) și (b) N-(2-mercapto-1H-benzo[d]imidazole-5-il) oleamidă (O<sub>2</sub>).

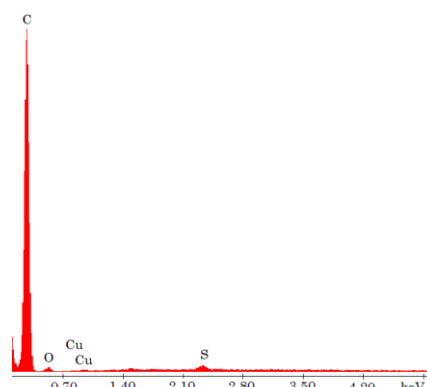
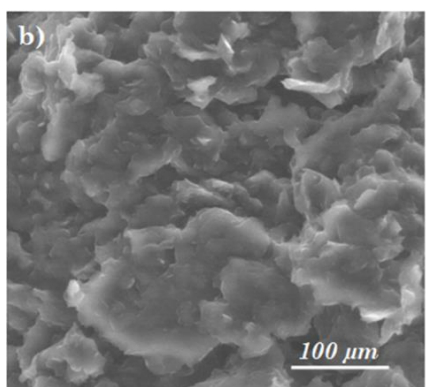
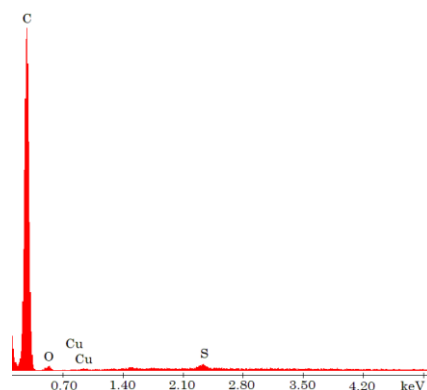
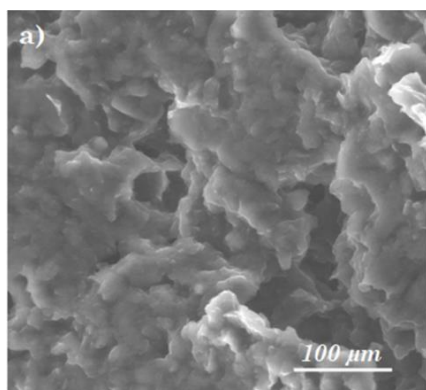
### 5.2.5. Probele biologice

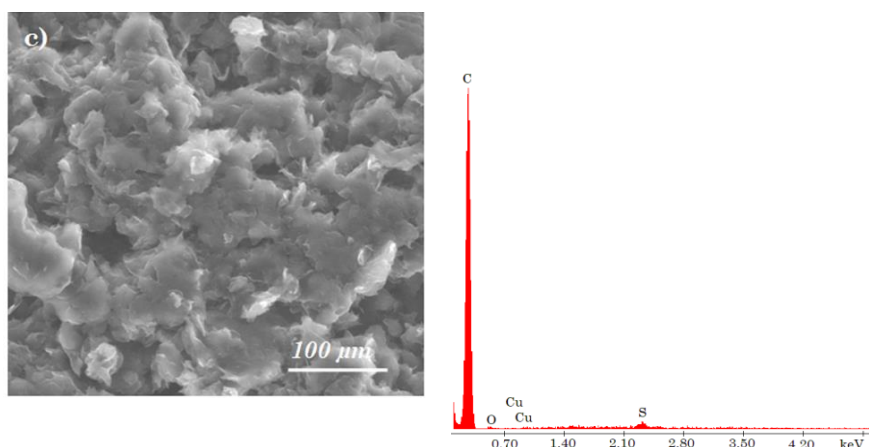
Probele de sânge integral au fost obținute de la Spitalul Universitar București (aprobarea comitetului de etică nr. 11/2013). Aceste probe au fost obținute de la pacienți confirmați cu cancer mamar. Celula electrochimică a fost încărcată cu proba biologică și, după înregistrarea diagramei și identificarea semnăturilor HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$ , concentrațiile necunoscute ale biomarkerilor în probele de sânge integral au fost determinate utilizând metoda stocastică descrisă mai sus.

## 5.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### 5.3.1. Caracterizarea morfologică și structura pastelor utilizate pentru proiectarea microsenzorilor stocastici

Figura 5.3. relevă morfologia probelor analizate și analiza elementară prin tehnica EDX. Din analiza calitativă a nanografenei modificate cu Cupru sferoidal se pot observa particulele sferice înglobate în matricea organică (Figura 5.3 (a)). Adăugarea oleamidelor O1 și O2 (Figurile 5.3. (b) și (c)) a facilitat prezența canalelor/porilor necesari în metoda de analiză stocastică pentru dezvoltarea semnalului stocastic. Analiza semi-cantitativă EDX a arătat că elementul relevant este C (98,6 % în greutate), urmat de O (0,64 % în greutate), Cu (0,43% în greutate) și S(0,33% în greutate)





**Figura 5.3.** Imagini SEM și spectre EDX ale:(a) pastei care conține nanografene și Cu sferoidal; (b) pastei care conține nanografene și Cupru sferoidal modificate cu O1;(c) pastei care conține nanografene și Cupru sferoidal modificate cu O2.

### 5.3.2. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici

S-a aplicat un potențial de 125 mV și biomarkerii se duc unul câte unul în porul oleamidei. În timp ce intră în por, aceasta îl blochează și intensitatea curentului scade la 0 A. Timpul petrecut în această etapă se numește semnătura biomarkerului și este dată de valoarea  $t_{off}$ . În etapa următoare, biomarkerul suferă procese de legare, precum și procese redox – timpul petrecut pentru aceste procese fiind cunoscut sub numele de  $t_{on}$  – și utilizat pentru măsurători cantitative.

**Tabelul 5.1.** Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici atunci când sunt utilizați pentru determinarea HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$ .

Microsenzor stochastic pe bază de nanografene, Cu sferoidal și	Semnătură $t_{off}$ (s)	Domeniu linear de concentrație (g mL <sup>-1</sup> )	Ecuatie de calibrare; coeficient de corelație, r*	Sensibilitate (s $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOQ (pg mL <sup>-1</sup> )	
O1	1.2	3.90x10 <sup>-13</sup> - 3.90x10 <sup>-8</sup>	HER 1			
			$1/t_{on} = 0.03 + 7.99 \times C$ $r = 0.9998$	7.99	0.39	
	4.2	3.90x10 <sup>-12</sup> - 3.90x10 <sup>-10</sup>	HER 2			
			$1/t_{on} = 0.01 + 1.55 \times 10^2 \times C$ $r = 0.9993$	$1.55 \times 10^2$	3.90	
				Heregulin- $\alpha$		

Metode inovative pentru diagnosticarea cancerului mamar

	2.3	$2.56 \times 10^{-12}$ - $6.40 \times 10^{-11}$	$1/t_{on} = 0.15 + 3.01 \times 10^3 \times C$ $r=0.9998$	$3.01 \times 10^3$	2.56
			HER 1		
	1.2	$3.90 \times 10^{-11}$ - $3.90 \times 10^{-8}$	$1/t_{on} = 0.05 + 9.97 \times C$ $r=0.9998$	9.97	39
O2			HER 2		
	3.4	$3.90 \times 10^{-12}$ - $3.90 \times 10^{-10}$	$1/t_{on} = 0.01 + 1.10 \times 10^2 \times C$ $r=0.9999$	$1.10 \times 10^2$	3.90
			Heregulin- $\alpha$		
	2.3	$5.12 \times 10^{-13}$ - $1.28 \times 10^{-11}$	$1/t_{on} = 0.01 + 4.30 \times 10^4 \times C$ $r=0.9999$	$4.30 \times 10^4$	0.51

\* $\langle C \rangle = \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $\langle t_{on} \rangle = \text{s}$ ; LOQ – limita de cuantificare.

În primul rând, au fost înregistrate diferite semnături (valori  $t_{off}$ ) pentru HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  pentru fiecare dintre microsenzorii stocastici, dovedind că cei trei biomarkeri pot fi determinați simultan în probele de sânge integral. S-au înregistrat sensibilități comparabile (ca ordin de mărime) pentru ambii microsenzorii atunci când au fost utilizați pentru testarea HER-1 și HER-2. Un ordin de mărime mai mare ( $10^4$ ) a fost înregistrat pentru sensibilitatea microsenzorului bazat pe O2, atunci când a fost analizată heregulin- $\alpha$ .

Un interval de concentrație de lucru mai larg a fost înregistrat pentru analiza HER-1, atunci când a fost utilizat microsenzorul bazat pe O1. Pentru analiza HER-2, s-a înregistrat același interval de concentrație de lucru pentru ambii senzori, în timp ce pentru analiza heregulinei- $\alpha$ , s-a obținut un interval de concentrație liniară mai larg pentru microsenzorul bazat pe O2. Cea mai mică limită de cuantificare pentru HER-1 a fost obținută atunci când a fost utilizat microsenzorului bazat pe O1, în timp ce cea mai mică limită de cuantificare pentru heregulin- $\alpha$  a fost obținută utilizând microsenzorul bazat pe O2. Aceeași valoare a fost obținută folosind ambii microsenzori, atunci când au fost utilizați pentru testarea HER-2. În consecință microsenzorul stocastic de alegere este cel bazat pe O2. A fost evaluată fiabilitatea proiectului, precum și stabilitatea în timp a microsenzorului propus.

Au fost proiectate zece din fiecare tip de microsenzor și utilizate timp de o lună pentru testarea HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$ . În această perioadă de timp, au fost înregistrate sensibilitățile pentru HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$ . Pentru fiecare tip de microsenzor, măsurătorile efectuate pe parcursul unei zile au arătat că valorile RSD% pentru variația

sensibilităților înregistrate pentru 10 microsenzori au fost de 0,12% pentru HER-1, 0,09% pentru HER-2 și 0,07% pentru heregulin- $\alpha$ , în urma tipului de microsenzor, dovedind o proiectare foarte fiabilă (reproductibilă) a microsenzorilor stocastici propuși. Atunci când au fost utilizate timp de o lună, variațiile de sesibilitate au fost de 0,21% pentru testul HER-1, 0,25% pentru testul HER-2 și 0,18% pentru testul heregulin- $\alpha$ , în ciuda tipului de microsenzor, dovedind stabilitatea microsenzorilor în timp.

### 5.3.3. Măsurătorile de stabilitate și reproductibilitate

Au fost proiectat 10 senzori din fiecare dintre cele două tipuri (pe baza O1 și O2) și s-au efectuat măsurători zilnice timp de o lună. Măsurătorile pentru fiecare tip de senzor au dovedit că nu există modificări semnificative ale sensibilității, variația acesteia fiind pentru fiecare tip mai mică de 0,30%; acest lucru a dovedit reproductibilitatea proiectării fiecărui tip de senzor stocastic. După 30 zile de măsurători, variația sensibilităților înregistrate pentru senzorul stocastic pe bază de O1 a fost mai mică de 0,10%, în timp ce pentru senzorul stocastic pe bază O2 a fost mai mică de 0,15%; acest lucru a dovedit că senzorii sunt stabili timp de cel puțin o lună, atunci când se efectuează măsurători zilnice.

### 5.3.4. Selectivitate

Selectivitatea microsenzorilor stocastici este data de diferența dintre semnaturile (valorice  $t_{off}$ ) înregistrate pentru HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  și cele obținute pentru alți biomarkeri/substanțe din probele biologice. Posibilele specii interferente selectate au fost: p53, CEA, maspin și CA19-9.

**Tabelul 5.2.** Selectivitatea microsenzorilor stocastici utilizați pentru determinarea HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$ .

Microsenzor stocastic bazat pe nanographene, sferiodal de Cu &	Maspin, Semnătură (s)	CEA, Semnătură (s)	CA19-9, Semnătură (s)	p53, Semnătură (s)
O1	0.5	1.7	2.9	3.3
O2	0.7	1.9	3.7	4.2

Rezultatele prezentate în tabelul 5.2 au dovedit că maspin, CEA, CA19-9 și p53 nu au interferat în determinarea HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$ .

**5.3.5. Determinarea simultană ultrasensibilă a HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  în sângele integral**

Au fost analizate cu ajutorul celor doi microsenzori stocastici unsprezece probe de sânge integral de la pacienți confirmați cu cancer mamar. Recunoașterea a fost realizată mai întâi – pe baza identificării valorii  $t_{off}$  (semnătură) specifică pentru HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  în diagramele obținute cu ajutorul microsenzorilor stocastici propuși (Figura 5.2.). Imediat după citirea valorilor  $t_{off}$ , au fost citite valorile  $t_{on}$  corespunzătoare. Valorile  $t_{on}$  au fost utilizate pentru a determina concentrațiile de HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  în probele de sânge integral, în conformitate cu metoda stocastică descrisă mai sus. Rezultatele obținute în urma screening-ului probelor de sânge integral sunt prezentate în Tabelul 5.3.

**Tabelul 5.3.** Rezultatele obținute pentru testul ultrasensibil al HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  în sângele integral, utilizând microsenzori stocastici (N=10).

Proba Nr.	pg mL <sup>-1</sup> , HER 1		pg mL <sup>-1</sup> , HER 2		pg mL <sup>-1</sup> , Heregulin- $\alpha$	
	Microsenzori stocastici pe bază de Cu sferoidal și					
	O1	O2	O1	O2	O1	O2
1	1.93±0.02	1.97±0.03	193.75±0.04	192.04±0.03	1.36±0.02	1.15±0.03
2	5.87±0.03	6.12±0.02	169.79±0.03	169.97±0.05	2.48±0.03	2.44±0.02
3	3.48±0.03	3.50±0.03	256.24±0.05	251.08±0.04	3.76±0.03	3.25±0.02
4	0.92±0.03	0.99±0.01	224.65±0.03	227.09±0.05	0.97±0.04	1.01±0.01
5	3.49±0.01	3.23±0.03	528.13±0.05	531.25±0.05	1.49±0.01	1.92±0.02
6	5.87±0.03	5.30±0.03	256.20±0.03	258.43±0.04	0.93±0.01	0.89±0.02
7	1.90±0.02	1.98±0.01	357.16±0.04	359.81±0.05	0.63±0.02	0.60±0.03
8	1.89±0.02	1.92±0.02	222.65±0.05	229.81±0.05	1.55±0.02	1.34±0.01
9	5.87±0.03	5.90±0.04	195.01±0.04	197.78±0.03	2.48±0.01	2.46±0.02
10	3.47±0.04	3.19±0.02	192.51±0.03	194.30±0.05	1.59±0.02	1.92±0.01
11	0.89±0.01	0.92±0.02	221.14±0.05	221.03±0.03	1.50±0.02	1.58±0.01
t-test	2.57		2.43		2.17	



S-au obținut corelații foarte bune între rezultatele obținute cu ajutorul celor doi microsenzori stocastici. S-a efectuat, de asemenea, un test-t împerecheat la un nivel de încredere de 99,00% (valoare t-teoretică tabulată: 4,032) pentru fiecare biomarker. Toate valorile-t calculate au fost mai mici decât valoarea tabulată, demonstrând că nu există o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între rezultatele obținute utilizând cei doi microsenzori stocastici (Tabelul 5.3.). În consecință, microsenzorii stocastici propuși pot fi utilizați în mod fiabil pentru determinarea simultan ultrasensibilă a HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  în probe de sânge integral.

#### **5.4. CONCLUZII**

Doi microsenzori stocastici pe bază de nanografene decorate cu Cupru sferoidal, modificat cu N-(piridină-3-il-metil) oleamidă și N-(2-mercapto-1H-benzo[d]imidazol-5-il) oleamidă au fost utilizați cu succes pentru determinarea ultrasensibilă a HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$  în probe de sânge integral.

Caracteristica principală a senzorilor este utilizarea lor ca noi instrumente în testele de screening ale probelor de sânge integral și de țesut pentru cancerul mamar.

## CAPITOLUL VI

# TESTAREA ULTRASENSIBILĂ A 8-HIDROXI-2'- DEOXIGUANOSINEI ÎN SÂNGELE INTEGRAL UTILIZÂND MICROSENZORI STOCASTICI PE BAZĂ DE NANOTUBURI DE CARBON

### 6.1. INTRODUCERE

8-Hidroxi-2'-deoxiguanina (8-OHdG) este utilizată pentru a estima deteriorarea ADN-ului la om după expunerea la agenți cauzatori de cancer, cum ar fi fumul de tutun, fibrele de azbest, metalele grele și hidrocarburile aromatice policiclice. 8-OHdG este un biomarker critic pentru carcinogeneză [327] și un biomarker discriminatoriu pentru detectarea precoce a cancerului mamar [328,329]. Nivelurile de 8-OHdG indică stadiul și tipul de cancer mamar și pot fi exprimate ca pmol mg<sup>-1</sup> ADN (0,25 pentru sânul normal, 0,98 pentru tumori benigne și 2,44 pentru tumori maligne [329]) sau ca pg mL<sup>-1</sup> (90,8 pentru sânul normal, 302 pentru tumori benigne și 552 pentru tumori maligne, de asemenea, 810 pentru stadiul I, 510 pentru stadiul II, 380 pentru stadiul III și 190 pentru stadiul IV [328]). Până în prezent, cromatografia lichidă de înaltă performanță [330,331], precum și testul imunoenzimatic [330] și senzorii optici [332] și electrochimici [333] au fost propuși pentru determinarea 8-OHdG în probele biologice.

Au fost propuși doi microsenzori stocastici pe bază de paste de nanotuburi de carbon cu un singur perete (SWCNT) și cu mai mulți pereți (MWCNT), modificate cu  $\alpha$ -ciclodextrină ( $\alpha$ -CD) pentru dozarea 8-Hidroxi-2'-deoxiguanina în sângele integral. Principiul determinării 8-OHdG în sângele integral se bazează pe conductivitatea curentului: în etapa de analiză calitativă, biomarkerul care intră în canal, îl blochează, iar curentul scade până la valoarea zero până când întreaga moleculă a biomarkerului intră în canal (semnătura biomarkerului este definită ca valoarea  $t_{off}$ ); etapa de cuantificare are loc în interiorul canalului – când au loc procesele de legare cu pretele canalului, precum și procesele redox –  $t_{on}$  este valoarea măsurată (între 2 valori  $t_{off}$ ) în diagrame, iar valoarea sa este legată de concentrația de 8-OHdG în probele biologice.

Selectarea SWCNT și MWCNT ca matrici a fost făcută deoarece acestea sunt structuri foarte stabile, care pot menține canalele în formă stabilă.  $\alpha$ -CD a fost utilizată ca modifikator, deoarece forma sa poate oferi canalele necesare pentru detecția stocastică.

## 6.2. PARTEA EXPERIMENTALĂ

### 6.2.1. Materiale, metode și reactivi

SWCNT, MWCNT,  $\alpha$ -CD, 8-OHdG și componentele necesare pentru prepararea soluției tampon (pH=7,5). Metoda diluției în serie a fost utilizată pentru a obține soluții de 8-OHdG cu concentrații între  $1 \times 10^{-15}$  și  $1 \times 10^{-2}$  g mL<sup>-1</sup> necesare pentru determinarea caracteristicilor de răspuns ale senzorilor stocastici.

### 6.2.2. Proiectarea microsenzorilor stocastici

100 mg din fiecare dintre SWCNT și MWCNT au fost amestecate cu ulei de parafină pentru a forma paste omogene. La fiecare dintre paste s-au adăugat 100  $\mu$ L de soluție de  $\alpha$ -CD de  $1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> pentru a forma pastele modificate. Fiecare dintre paste a fost plasată într-un tub 3D imprimat în laboratorul nostru cu ajutorul imprimantei 3D, având un diametru intern al părții active a microsenzorului de 25  $\mu$ m. Contactul electric cu circuitul extern a fost stabilit cu ajutorul unui fir de Ag. Atunci când nu sunt utilizați, microsenzorii stocastici au fost plasați într-o cutie uscată.

### 6.2.3. Aparatura

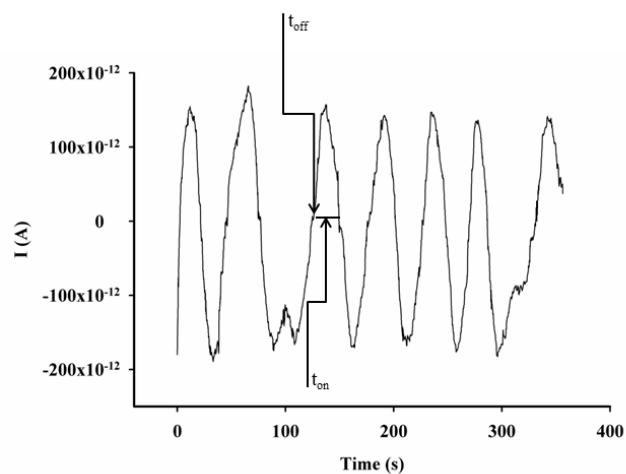
Celula electrochimică a cuprins microsenzorul stocastic (ca senzor de lucru), un electrod de referință Ag/AgCl și un fir de Pt ca electrod auxiliar. Toate măsurătorile au fost efectuate la 125mV față de Ag/AgCl și 25°C.

Morfologia pastelor studiate pe bază de MWCNT  $\alpha$ -CD și SWCNT  $\alpha$ -CD au fost investigate cu ajutorul microscopiei electronice cu scanare (SEM). Pentru a obține o rezoluție bună a imaginilor microscopice, pastele au fost analizate folosind detectorul LFD (vid redus), la o tensiune înaltă (HV) de 30 KV și o mărime de 1600X.

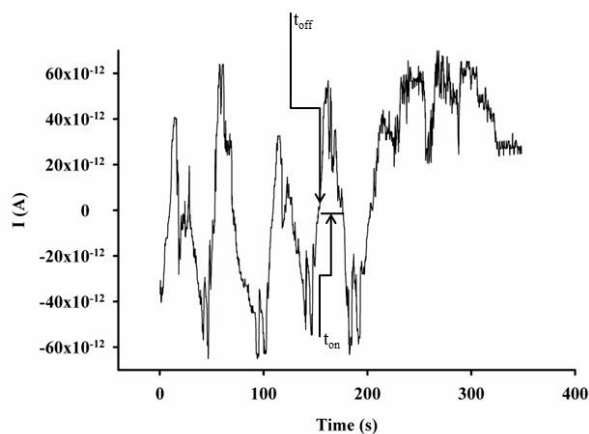
### 6.2.4. Metoda stocastică

Pentru măsurătorile  $t_{on}$  și  $t_{off}$  s-a utilizat o metodă cronoamperometrică la un potențial constant (125 mV vs Ag/AgCl). Pe baza valorii  $t_{off}$ , 8-OHdG a fost identificat în diagramele înregistrate cu microsenzorii stocastici și, ulterior, valoarea lui  $t_{on}$  a fost citită și utilizată pentru determinarea concentrației de 8-OHdG (Figura 6.1.). Concentrațiile necunoscute de 8-OHdG în probele de sânge integral au fost determinate din ecuația de calibrare  $1/t_{on} = a + bxC_{8-OHdG}$

înregistrată cu fiecare dintre senzorii pentru 8-OHdG. Parametrii  $a$  și  $b$  din ecuațiile de calibrare au fost determinați prin metoda regresiei liniare.



(a) SWCNT



(b) MWCNT

**Figura 6.1.** Exemple de diagrame obținute pentru depistarea probelor de sânge integral cu ajutorul microsenzorilor stocastici pe bază de a) SWCNT și b) MWCNT.

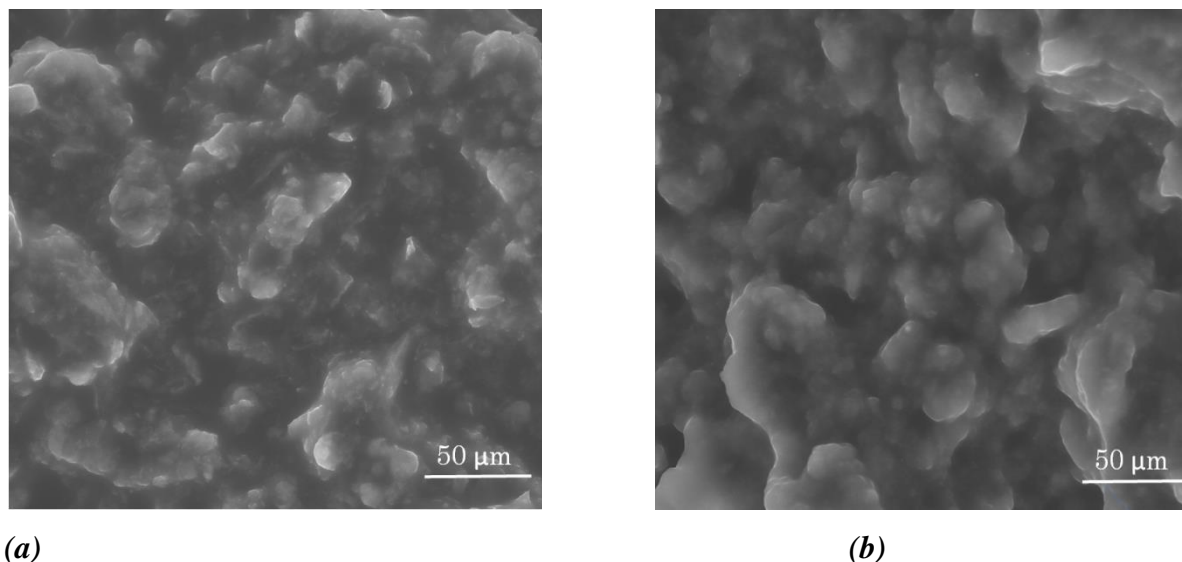
### 6.2.5. Probe

Probele de sânge integral au fost obținute de la Spitalul Universitar București (aprobarea comitetului de etică nr. 11/2013). Celula electrochimică a fost încărcată cu proba biologică și, după înregistrarea diagramei și identificarea semnăturilor de 8-OHdG, concentrațiile necunoscute de 8-OHdG, concentrațiile necunoscute de 8-OHdG în probele de sânge integral au fost determinate utilizând metoda stocastică descrisă mai sus.

### 6.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

#### 6.3.1. Morfologia suprafeței active a microsenzorilor stocastici

Figura 6.2. prezintă imagini SEM ale  $\alpha$ -CD MWCNT (a) și  $\alpha$ -CD SWCNT (b). Se pot observa aglomerări de particule și canale în formațiuni asimetrice.



**Figura 6.2.** Imagini SEM pentru  $\alpha$ - CD MWCNT (a) și  $\alpha$ -CD SWCNT (b)

Caracteristicile de răspuns ale senzorilor sunt prezentate în Tabelul 6.1.

**Tabelul 6.1.** Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici pe bază de CNT și  $\alpha$ -CD

Microsenzor stocastic pe bază $\alpha$ -CD și	Semnătură $t_{off}$ , s	Ecuție de calibrare* R	Domeniul linear de concentrație $g mL^{-1}$	Sensibilitate, $s^{-1} g^{-1} mL$	Limită de determinare $g mL^{-1}$
SWCNT	1.2	$1/t_{on}=0.03+2.64 \times 10^4 C$ $r=0.9999$	$1 \times 10^{-12}-1 \times 10^{-6}$	$2.64 \times 10^4$	$1 \times 10^{-12}$
MWCNT	0.7	$1/t_{on}=0.07+7.38 \times 10^7 C$ $r=0.9998$	$1 \times 10^{-12}-1 \times 10^{-8}$	$7.38 \times 10^7$	$1 \times 10^{-12}$

$$\langle C \rangle = g mL^{-1} \quad \langle t_{off} \rangle = s$$

Intervalul de concentrație liniară mai larg ( $1 \times 10^{-12}-1 \times 10^{-6} mg L^{-1}$ ) a fost înregistrat atunci când a fost utilizat microsenzorul bazat pe SWCNT, în timp ce cea mai mare sensibilitate ( $7.38 \times 10^7 s^{-1} g^{-1} mL$ ) a fost înregistrată atunci când a fost utilizat microsenzorul bazat pe MWCNT. Tipul de nanotube de carbon (SWCNT/MWCNT) nu a influențat limita de determinare a 8-OHdG ( $1 \times 10^{-12} mg L^{-1}$ ). În comparație cu senzorul electrochimic propus de Thanghatthanarungruang et al. [7] care raportează un interval linear de concentrație de  $1 \times 10^{-6}$ -

$5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , și o limită de determinare de  $3.06 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , senzorii propuși au prezentat intervale liniare de concentrație mai largă și limite de determinare mai mici.

A fost evaluată fiabilitatea proiectului, precum și stabilitatea în timp a microsenzorilor stocastici. Zece din fiecare tip de microsenzori au fost proiectați și utilizați timp de 1 lună pentru dozarea 8-OHdG. În această perioadă de timp, au fost înregistrate sensibilitățile pentru 8-OHdG. Pentru fiecare tip de microsenzor, măsurătorile efectuate pe parcursul unei zile au arătat că valorile RSD% pentru variația sensibilităților înregistrate pentru 10 microsenzori au fost de 0,10% pentru microsenzorul bazat pe SWCNT și de 0,05% pentru microsenzorul bazat pe MWCNT, ceea ce dovedește că proiectarea microsenzorilor stocastici este fiabilă. Atunci când a fost utilizat timp de o lună variațiile sensibilității au fost de 0,15% în cazul microsenzorului bazat pe SWCNT și de 0,08% în cazul microsenzorului bazat pe MWCNT, ceea ce dovedește stabilitatea microsenzorilor în timp.

### 6.3.2. Determinarea ultrasensibilă a 8-OHdG în sângele integral

Cele zece probe de sânge integral de la pacienți la care s-a confirmat cancerul mamar au fost analizate cu ajutorul celor doi microsenzori stocastici. Recunoașterea de tipare a fost realizată mai întâi – pe baza identificării valorii  $t_{off}$  (semnătură) specifică pentru 8-OHdG în diagramele obținute cu ajutorul microsenzorilor stocastici propuși (Figura 6.1.). Imediat după citirea valorilor  $t_{off}$ , între două valori  $t_{off}$ , au fost citite valorile  $t_{on}$  corespunzătoare. Valorile  $t_{on}$  au fost utilizate pentru a determina concentrațiile de 8-OHdG în probele de sânge integral, în conformitate cu metoda stocastică descrisă mai sus. Rezultatele obținute în urma analizei probelor de sânge integral sunt prezentate în Tabelul 6.2.

**Tabelul 6.2.** Determinarea concentrației de 8-hidroxi-2'-deoxigozozină în probele de sânge integral.

Sample No	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, $\text{pg mL}^{-1}$		
	Stochastic microsensor based on $\alpha$ -CD and		ELISA
	SWCNT	MWCNT	
1	198.02±0.02	201.00±0.03	200.03±0.14
2	150.08±0.01	155.30±0.03	151.47±0.12
3	488.18±0.02	487.43±0.01	485.95±0.11
4	184.24±0.01	184.15±0.02	184.00±0.13
5	185.95±0.03	186.00±0.01	184.32±0.12
6	366.12±0.01	363.99±0.03	364.02±0.15

7	287.46±0.02	288.03±0.01	287.95±0.21
8	576.18±0.02	576.54±0.02	576.02±0.30
9	213.65±0.01	213.15±0.04	211.98±0.18
10	174.86±0.02	174.27±0.03	175.02±0.23
t-test	2.21	2.19	-

S-au obținut corelații foarte bune între rezultatele obținute cu ajutorul celor doi microsenzori stocastici și ELISA. Testul-t a fost efectuat la un nivel de încredere de 99,00% (valoare t teoretică tabulată: 4,032) pentru fiecare microsenzor. Toate valorile-t calculate au fost mai mici decât valoarea tabulate, demonstrând că nu există o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între rezultatele obținute cu ajutorul celor doi microsenzori stocastici (Tabelul 6.2.). În consecință, microsenzorii stocastici propuși pot fi utilizați în mod fiabil pentru determinarea ultrasensibilă a 8-OHdG în probele de sânge integral.

#### 6.4. CONCLUZII

Microsenzorii stocastici pe bază de  $\alpha$ -CD/CNT cu un singur sau mai mulți pereți s-au dovedit a fi capabili să determine concentrația de 8-OHdG într-un interval linear larg de concentrație, acoperind de la persoane sănătoase până la pacienți aflați în ultimul stadiu al cancerului mamar. Cea mai mare sensibilitate a fost înregistrată pentru senzorul stocastic bazat pe MWCNT. Microsenzorii stocastici propuși se caracterizează prin utilizarea lor ca instrumente de screening pentru diagnosticarea precoce a cancerului mamar, precum și pentru determinarea stadiului cancerului mamar. Principalele avantaje sunt: există teste rentabile, nu este necesară o testare în prealabil a probei înainte de măsurători; rezultatele pot fi obținute în câteva minute.

## CAPITOLUL VII

# DETERMINAREA D-SERINEI DIN PROBE DE SÂNGE INTEGRAL FOLOSIND UN SENZOR ELECTROCHIMIC PE BAZĂ DE ZINC (II) - 5 (4-CARBOXIFENIL)-10, 15, 20-TRIS (4-FENOXIFENIL) PORFIRINĂ

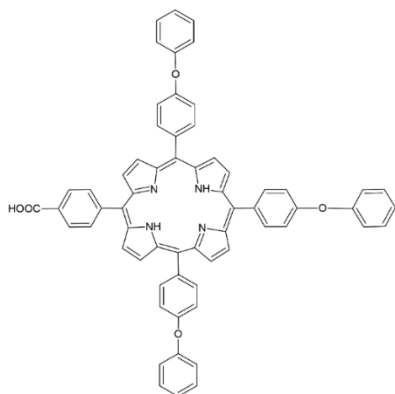
### 7.1. INTRODUCERE

În determinare concentrația de D-serină din probe biologice umane, inclusiv sânge, ser sau urină, majoritatea cer cercetătorilor să aibă încredere în tehnicile HPLC (cromatografie lichidă de înaltă presiune) [346] și LC-MC (cromatografie lichidă-spectrometrie de masă) [347-349].

Unele dintre proprietățile porfirinei pot fi atribuite materialelor nanostructurate pe bază de derivați de porfirină, și anume metaloderivați, care au unele dintre caracteristicile optime în aplicații electrochimice, fiind utilizați ca modificatori.

Acești metalderivați includ un nucleu de porfirină care are în structura sa o conjugare suplimentară de electroni, iar introducerea unui ion metalic, are ca rezultat intensificarea capacității de mișcare a electronilor. Dintre ionii metalici, cei cu cel mai crescut comportament electrocatalitic sunt reprezentați de cupru, nichel, fier [366] și cobalt.

Senzorii care au fost concepuți cu ajutorul pastelor de carbon și aur [367] s-au dovedit a fi importanți în detectarea analiților clinici [368] și farmaceutici, datorită fiabilității demonstrate în furnizarea de informații analitice utile; îmbunătățirea senzorilor cu material adecvat a amplificat răspunsul senzorilor [368, 369-374].

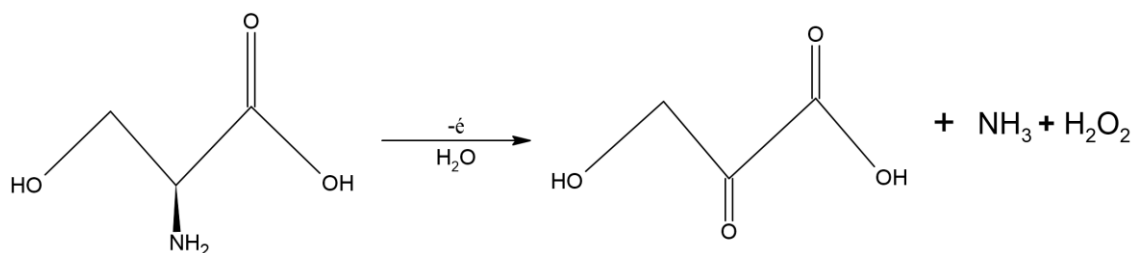


**Figura 7.1.** Structura chimică a 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(4fenoxifenil)-porfirinei.



Utilizarea senzorilor electrochimici pentru analiza biomedicală [353-361] are multe avantaje: metoda este rapidă și fiabilă, iar proba nu necesită nici o pretratare [362-364].

Posibilul mecanism al oxidării electrochimice a D-serinei este ilustrat în Figura 7.2, detecția D-serinei făcându-se prin intermediul produsului stoichiometric al peroxidului de hidrogen, în timpul procesului de oxidare a D-serinei. Metoda propusă a fost voltametria cu impulsuri diferențiale (DPV). Senzorul a fost validat folosind probe de sânge integral.



**Figura 7.2.** Mecanismul posibil al oxidării electrochimice a D-serinei pe suprafeța pastei de nanografene modificate.

## 7.2. PARTEA EXPERIMENTALĂ

### 7.2.1. Materiale și reactivi

L- și D-serina, D-triptofanul, D-arginina, acidul D-aspartic, Zn (II)-5(4-carboxifenil)-10,15,20 – tris(4-fenoxifenil) porfirină și pulbere de nanografene. Soluțiile de D-Serină au fost preparate proaspăt, în fiecare zi, în soluție tampon de fosfat (PBS, pH=7,5).

### 7.2.2 Aparatură

Toate măsurătorile experimentale au fost efectuate cu ajutorul unui AUTOLAB/PGSTAT 302 (Metrohm, Utrecht, Olanda), conectate la un computer pentru achiziția de date. Celula electrochimică este formată din trei electrozi: un electrod de referință (Ag/AgCl, 0,1 mol/L KCl), un electrod de lucru (senzorul electrochimic propus) și un contraelectrod (fir de platină).

### 7.2.3. Proiectarea senzorului electrochimic

Pulberea de nanografene a fost amestecată cu ulei de parafină pentru a obține o pastă omogenă, care a fost modificată ulterior cu Zn(II)-5(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(4-fenoxifenil) porfirină. Un vârf de plastic a fost umplut cu pastă de nanografene modificată.

Contactul electric a fost un fir de Ag. Suprafața senzorului a fost spălată cu apă deionizată și lustruită cu hârtie înainte de fiecare utilizare.

#### **7.2.4. Procedura recomandată**

Măsurătorile DPV au fost efectuate la 25°C pentru fiecare soluție standard ( $10^{-3}$ - $10^{-13}$  mol/L). S-au măsurat intensitățile înălțimilor vârfurilor și li s-a găsit ecuația de calibrare folosind metoda regresiei liniare. Concentrațiile necunoscute au fost calculate din ecuația de calibrare determinate statistic.

Parametrii de lucru au fost următorii: viteza de scanare a fost de 10 mV s<sup>-1</sup>, intervalul de potențial de la -0,5 la -0,1V și amplitudinea de modulare de 25 mV.

#### **7.2.5. Probe biologice**

Probele de sânge integral au fost obținute de la Spitalul Universitar de Urgență București (aprobarea comitetului de etică nr. 75/2015) de la 3 pacienți diferiți diagnosticați cu cancerul mamar. Aceste probe au fost utilizate pentru dozarea directă a D-serinei fără niciun fel de pretratament.

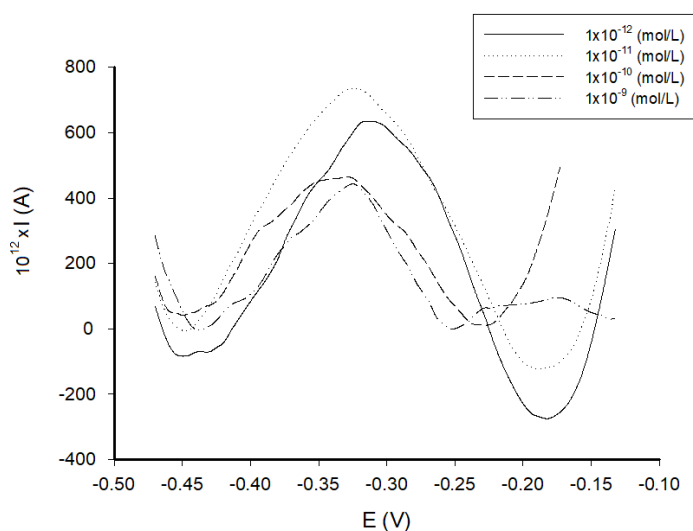
#### **7.2.6. Studii de selectivitate**

Studiul selectivității senzorului electrochimic a fost realizat față de: D-trp, D-Glu, D-Srg, L-Ser și acid D-aspartic. Pentru a determina selectivitatea senzorului electrochimic propus, coeficienții de selectivitate amperometrică au fost determinați prin metoda soluțiilor mixte pentru a determina dacă există interferențe. Soluțiile au fost pregătite conform metodei soluțiilor mixte, înainte de măsurători, luând în considerare raportul de 1:10 (mol/mol) între D-ser și interferent. Metoda a fost utilizată pentru o bună înțelegere a utilizării electrozoului în condiții eficiente, fiind astfel o procedură recomandată pentru determinarea coeficienților de selectivitate amperometrică.

### **7.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII**

#### **7.3.1. Răspunsul caracteristic al senzorului electrochimic propus**

DPV a fost utilizat pentru a determina caracteristicile de răspuns ale senzorului electrochimic. Voltamogramele utilizate pentru calibrarea senzorului propus au fost prezentate în Figura 7.3.



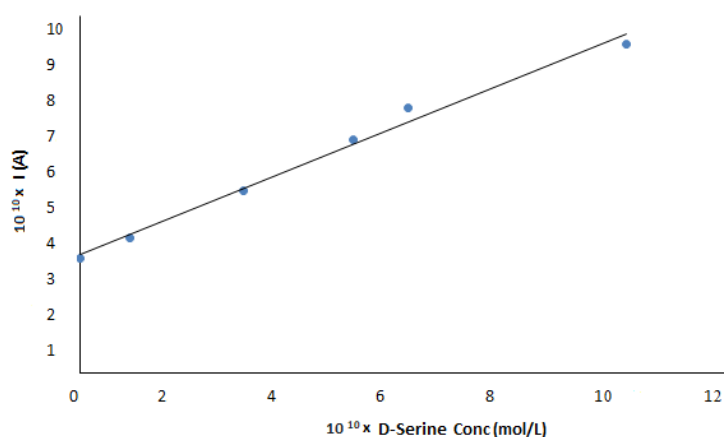
**Figura 7.3.** Voltammograma cu impulsuri diferențiale obținută pentru D-serină la diferite concentrații. Parametrii de lucru au fost următorii: viteza de scanare a fost de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , intervalul de potențial de la  $-0,5$  la  $-0,1\text{V}$  și amplitudinea de modulare de  $25 \text{ mV}$ .

Potențialul de jumătate de undă a fost înregistrat la  $-0,248 \text{ mV}$  pentru  $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$  D-serină. Figura 7.4. prezintă curba de calibrare. Caracteristicile de răspuns obținute au fost: intervalul linear de concentrație a fost cuprins între  $1 \times 10^{-12} \text{ mol/L}$  x  $1 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ , iar limita de determinare a fost de  $5 \times 10^{-13} \text{ mol/L}$ . Ecuația de calibrare a fost:

(1)

$$I = 3.02 \times 10^{-10} + 0.52 \times C_{D-serine}$$

unde  $I$  este curentul în A,  $C_{D-serine}$  este concentrația de D-serină în mol/L. Coeficientul de corelație,  $r$  este  $0,9949$ . Rezultatele au arătat o valoare bună a sensibilității ( $0,52 \text{ A/mol/L}$ ) și o limită de detecție scăzută ( $0,5 \text{ pmol/L}$ ) pentru D-serină. Intervalul linear de concentrație este larg.



**Figura 7.4.** Graficul de calibrare obținut pentru D-serină folosind pastă de nanografene modificată pe bază de pastă nanometrică.

În comparație cu senzorul stocastic propus anterior pentru determinarea D-serinei [373], senzorul electrochimic propus a prezentat o sensibilitate mai bună; de asemenea, determinarea D-serinei cu acest senzor electrochimic poate fi efectuată mai rapid.

### 7.3.2. Selectivitatea senzorului electrochimic

Coeficienții de selectivitate amperometrică au fost determinați folosind următoarea ecuație [374]:

(2)

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

unde  $K_{i,j}(amp)$  este coeficientul de selectivitate amperometrică,

$$\Delta I_t = \Delta I_i - \Delta I_b,$$

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

Metoda soluției mixte a fost utilizată pentru determinarea potențialilor interferenți în dozarea D-ser. Valorile obținute pentru coeficienți sunt prezentate în Tabelul 7.1.

**Tabelul 7.1.** Coeficienți de selectivitate amperometrică.

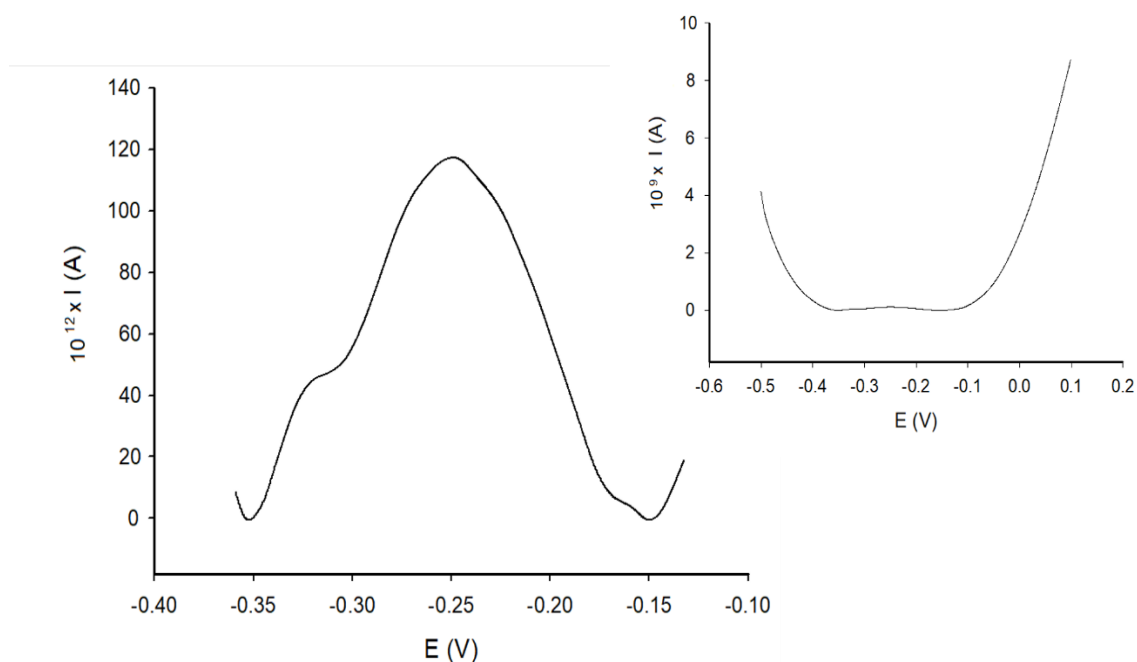
Parametrii	Analit	Interferent (10 <sup>-3</sup> M)	$K_{sel}^{amp}$
viteza de scanare 10 mV s <sup>-1</sup>	D-Serină (10 <sup>-4</sup> M)	D-Trp	1.05x10 <sup>-4</sup>
		D-Glu	2.09x10 <sup>-3</sup>
D-Arg		1.45x10 <sup>-3</sup>	
L-Ser		1.14x10 <sup>-3</sup>	
D-Asp Acid		7.37x10 <sup>-4</sup>	
domeniul de potențial -0.5 ÷ 0.1 V			
amplitudinea de modulație 25 mV			

Coeficienții amperometrici au fost determinați folosind același potențial care a fost utilizat pentru determinarea D-serinei cu ajutorul senzorului propus. Rezultatele arată că nu

există nicio interferență a D-Trp și a acidului D-Asp și o interferență scăzută a D-Glu, D-Arg și L-ser în determinarea D-serinei.

### 7.3.3. Determinarea D-serinei în probe de sânge integral

DPV a fost utilizat pentru determinarea D-serinei în trei probe de sânge integral. Celula electrochimică care conținea cei trei electrozi a fost scufundată în celula care a fost umplută cu probe de sânge integral. Rezultatele măsurătorilor sunt prezentate în Tabelul 7.2. Un exemplu de voltamogramă obținută pentru proba de sânge integral este prezentat în Figura 7.5., care este o mărire a inserției, pentru o mai bună înțelegere. Pentru a efectua testul de recuperare, a fost adoptat următorul mecanism: D-serina a fost mai întâi determinate din probele de sânge integral, apoi s-au adăugat cantități cunoscute de D-serină. Cantitățile recuperate au fost comparate cu cele care au fost introduce în probele biologice. O metodă clasică a fost utilizată pentru a determina D-serina din proba biologică. Rezultatele obținute cu ajutorul DPV au fost în bună corelație cu rezultatul obținut prin HPLC, dar în general, s-au obținut rezultate mai bune folosind electrochimia (Tabelul 7.2.).



**Figura 7.5.** Exemplu de voltamogramă obținută pentru determinarea D-serinei în proba de sânge integral. Parametrii de lucru au fost următorii: viteza de scanare a fost de 10 mV s<sup>-1</sup>, intervalul de potențial -0,5 ÷ 0,1 V, și amplitudinea modulatoră este de modulație 25 mV.

**Tabelul 7.2.** Determinarea D-serinei în probele de sânge integral utilizând senzorul electrochimic propus (rata de scanare a fost de 10 mV s<sup>-1</sup>, intervalul de potențial -0.5 ÷ 0.1 V, și amplitudinea de modulație 25mV) și datele HPLC.

Proba Nr.	□mol L <sup>-1</sup> , D-serină	
	DPV Electroanalysis*	HPLC [11]
1	2.57±0.12	2.50±1.14
2	2.86±0.13	2.70±1.20
3	3.80±0.12	3.20±1.40

\*Utilizarea senzorului electrochimic propus

#### 7.4. CONCLUZII

A fost propus un senzor electrochimic bazat pe imobilizarea fizică a Zn(II)-5(4-carboxifenil)-10,15,20-tris (4 fenoifenil) porfirinei pentru analiza D-serinei în probele de sânge integral. Senzorul electrochimic a prezentat o selectivitate ridicată, precum și limite scăzute de detecție și determinare și o sensibilitate ridicată. Senzorul a fost validat folosind probe de sânge integral.

## CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE DE VIITOR

### CONCLUZII GENERALE

Pe parcursul anilor s-a observat o evoluție în progresia metodelor de analiză în domeniul biomedical, farmaceutic, chimic și fizic cu scopul de a dezvolta anumite metode inovative, de ultimă generație pentru îmbunătățirea detecției și prevenire prin screening a cancerului. Markerii tumorali (CA15-3, CEA, HER-1, HER-2, heregulin- $\alpha$ , 8-OHdG) studiați în cadrul tezei de doctorat au un rol important în aflarea rapidă și diagnosticarea anumitor boli prin prevenirea, vindecarea sau stoparea din evoluție a acestora.

Scopul tezei doctorale a constat în dezvoltarea unor metode pentru determinarea compușilor de interes biomedical bazate pe designul senzorilor stocastici. În partea experimentală am inclus realizarea, construcția și validarea senzorilor stocastici pe bază de materiale funcționale (cupru, zinc, grafenă, diamant), modificați cu anumite materiale electroactive (nanopulbere de carbon, clorură de pentafluorofenil, porfirină). În analiza și validarea metodelor stocastice au fost utilizate probe de tip biologic (sânge) obținute prin colaborare cu Spitalul Universitar din București.

Determinarea D-serinei și D-leucinei a fost un factor cheie în realizarea și utilizarea senzorilor stocastici enantioselectivi pentru screening-ul de probe biologice (sangvine - probe de sânge integral). În urma analizei enantioselective a probelor de sânge integral obținute atât de la pacienți confirmați cu cancer mamar, cât și de la voluntari sănătoși, s-a depistat doar prezența enantiomerului D-serină la pacienții cu cancer, nu și la voluntarii sănătoși.

Valorile rezultate în urma utilizării senzorului au arătat că există o bună corelație între rezultatele obținute prin metoda stocastică și ELISA. Această metodă a demonstrat că D-serină poate fi un biomarker pentru diagnosticarea precoce a cancerului mamar.

Testarea biomarkerilor a fost determinată simultan cu ajutorul a trei microsenzori stocastici pe bază de nC modificate cu nanoparticule de aur și două porfirine (tetrafenil, tetrakis) în dozarea simultană a CEA, CA15-3 și HER-2, deoarece un test de depistare bazat pe analiza simultană a acestora va furniza mai multe informații despre diagnosticarea și tratamentul personalizat al cancerului mamar.

Pentru determinarea ultrasensibilă a celor trei biomarkeri, HER-1, HER-2 și heregulin- $\alpha$ , doi microsenzori stocastici pe bază de nanografene decorate cu Cupru sferiodal și modificați cu N-(piridină-3-il-metil) oleamidă și N-(2-mercapto-1H-benzo[d]imidazol-5-il) oleamidă au fost utilizați cu succes în probe de sânge integral. O caracteristică principală a acestor senzori

este utilizarea lor ca noi instrumente în testele de screening ale probelor de sânge și a țesutului tumoral. Un domeniu amplu de concentrație a fost obținut analizând HER-1 în urma folosirii microsenzorului bazat pe O1, pentru analiza HER-2, s-a înregistrat un interval de concentrație de lucru identic pentru ambii senzori, în timp ce în urma analizei heregulin- $\alpha$  s-a obținut un interval de concentrație mai larg pentru microsenzorul pe baza de O2.

Determinarea concentrației de 8-OHdG într-un interval linear care cuprinde atât persoane sănătoase, cât și voluntari aflați în ultimul stadiu al cancerului mamar a fost dovedită prin utilizarea microsenzorilor stocastici pe bază de  $\alpha$ -CD/CNT cu perete unic sau cu pereți multipli. Senzorul stocastic bazat pe MWCNT a prezentat cea mai mare sensibilitate înregistrată pentru determinarea 8-OHdG, în schimb utilizarea microsenzorului bazat pe SWCNT a înregistrat o sensibilitate mai mică. Microsenzorii stocastici propuși se caracterizează prin utilizarea lor ca instrumente de screening pentru diagnosticarea precoce a cancerului mamar. Unele din principalele avantaje al senzorilor o reprezintă rentabilitatea acestora, faptul că nu este necesară o pre-tratare a probei înainte de măsurătoare, astfel obținându-se un rezultat în câteva minute.

În recunoașterea moleculară a D-serinei utilizând senzorul electrochimic bazat pe imobilizarea fizică a Zn(II)-5(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(4 fenolifenil) porfirinei, acesta a prezentat o selectivitate și o sensibilitate ridicată, cât și o limită de detecție scăzută pentru determinarea D-serinei din probe biologice. Noua tehnică prezentată, DPV, a fost utilizată pentru determinarea caracteristicilor de răspuns a senzorului electrochimic. Noile metode propuse pot fi utilizate pentru testele de screening rapid în probele de sânge pentru diagnosticarea cancerului mamar.

## CONTRIBUȚII ORIGINALE

Scopul fundamental al tezei de doctorat a fost: dezvoltarea metodelor inovative în diagnosticare prin utilizarea senzorilor stocastici (electrochimici) pe bază de materiale funcționale: cupru, zinc, grafenă, diamant, cât și folosirea următoarelor materiale electroactive: nanopulbere de carbon, clorură de pentafluorofenil, porfirină, N-(piridină-3-il-metil) oleamidă și N-(2-mercapto-1H-benzo[d]imidazol-5-il) oleamidă. Detecția diferitelor substanțe de interes biomedical (CA15-3, CEA, HER-1, HER-2, Heregulin- $\alpha$ , 8-OHdG) a fost realizată prin utilizarea analizei stocastice pentru identificarea biomarkerilor specifici cancerului mamar din probe biologice. De o importanță deosebită a fost identificarea D-serinei și D-leucinei ca posibili biomarkeri în diagnosticarea precoce a cancerului mamar.



## **PERSPECTIVE ÎN DEZVOLTAREA ULTERIOARĂ**

În observarea și analizarea ulterioară a unor noi biomarkeri sau a unui panel de biomarkeri, pot fi propuse metode inovative de screening bazate pe senzori electrochimici, care pot utiliza materiale funcționale și electroactive ducând la analiza și răspunsul rapid, concis și corect în diagnosticarea precisă a anumitor afecțiuni din țesuturile tumorale. Prin diagnosticare precoce a diferitelor afecțiuni prin utilizarea screeningului populației cu sau fără factor de risc, detecția markerilor tumorali cu ajutorul senzorilor stocastici poate fi utilizată prin introducerea unui tratament personalizat.

Ca și perspectivă de viitor, se urmărește ca validarea senzorilor stocastici să fie făcută prin implementarea în unități medicale, laboratoare clinice și cabinete individuale pentru utilizarea lor ca și metode de screening rapid.

## ANEXA 1

### LISTĂ LUCRĂRI PREZENTATE LA CONFERINȚE

#### POSTER ȘI PREZENTARE ORALĂ

1. CARBON NANOPOWDER BASED STOCHASTIC SENSOR FOR ULTRASENSITIVE ASSAY OF CA 15-3, CEA AND HER2 IN WHOLE BLOOD authored by: ***Oana-Raluca Mușat***, *Raluca-Ioana Ștefan-van Staden*, *Damaris-Cristina Gheorghe*, *Ruxandra-Maria Ilie-Mihai*, *Jacobus Frederick van Staden*, presented at the XVIII th International Symposium PRIOCHEM “Priorities of Chemistry for a Sustainable Development” October 26-28, 2022.

## ANEXA 2

### ARTICOLE SI PUBLICATI:

1. **Oana-Raluca Musat** & Raluca-Ioana Stefan-van Staden (2022) Stochastic Sensors for the Enantioselective Determination of Serine in Blood for the Early Diagnosis of Breast Cancer, *Analytical Letters*, 55:13, 2124-2131, DOI: 10.1080/00032719.2022.2047999, **F.I.=2.267**.

2. Stefan-van Staden R.-I., **Musat Oana-Raluca**; Gheorghe, D.-C.; Ilie-Mihai, R.-M.; van Staden, J. (Koos) F. Carbon Nanopowder-Based Stochastic Sensor for Ultrasensitive Assay of CA 15-3, CEA and HER2 in Whole Blood. *Nanomaterials* 2022, 12, 3111. <https://doi.org/10.3390/nano12183111>, **F.I.=5.719**.

3. Raluca-Ioana Stefan-van Staden, **Oana-Raluca Musat**, Damaris-Cristina Gheorghe, Ruxandra-Maria Ilie-Mihai a,\*, Catalina Cioates Negut, Paula Sfirloaga, Ultrasensitive assay of HER1, HER2, and heregulin- $\alpha$  in whole blood, *Talanta Open* 6 (2022) 100151, received 6 June 2022; Received in revised form 7 September 2022; Accepted 14 September 2022, <https://doi.org/10.1016/j.talo.2022.100151>, S.I.= 1.9.

4. **Oana-Raluca Musat**, Ruxandra-Maria ILIE-MIHAI, Raluca-Ioana STEFAN-VAN STADEN, Determination of d-serine from whole blood samples using an electrochemical sensor based on zinc (ii) – 5(4-carboxyphenyl)-10,15,20- tris(4 phenoxyphenyl)porphyrine , *U.P.B. Sci. Bull.*, Series B, Vol. 84, Iss. 4, 2022 ISSN 1454-2331.

**F.I. cumulativ: 7.986**

### ARTICOLE TRIMISE SPRE PUBLICARE:

1. Ultrasensitive assay of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in whole blood using carbon nanotubes based stochastic microsensors, *Electrochem Comm*, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Oana-Raluca Musat.

2. Enantioanalysis of leucine in whole blood samples using enantioselective, stochastic sensors, *Chemosensors* Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Oana-Raluca Musat.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1]. *Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: Intl Agency for Research on Cancer, 2013, Available from.<http://globocan.iarc.fr>.*
- [2]. *Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J (2013). Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. Int J Cancer, 132(5):1133–45 <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.27711> PMID:22752881.*
- [3]. *Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 2004, 13(10):1558-68.*
- [4]. *Piccart-Gebhart M.J. New developments in hormone receptor-positive disease. The oncologist., 2011, 16:40-50.*
- [5]. *Leal M. F., Assumpção P. P., Smith M. C., Burbano R. R., Searching for Gastric Cancer Biomarkers Through Proteomic Approaches, J. Gastroenterol. Hepatol., vol.3, no.3, 2014, 989-995.*
- [6]. *Pankaj Taneja, Dejan Maglic, Fumitake Kai, Sinan Zhu, Robert D. Kendig Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. Clin Med Insights Oncol, 2010,4:15-34.*
- [7]. *Fisher B, Constantino JP, Wickerham DL. Tamoxifen for prevention of breast cancer report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. J Natl Cancer Inst, 1998, 90(18):1371-88.*
- [8]. *Slamon DJ, Clark GM et al. Human breast cancer correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/neu oncogene. Science, 1987, 235(4785):177-82.*
- [9]. *Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. Breast, 2008, 17(4):323–334.*

- [10]. *Assersohn L, Salter J, Powles TJ, A'Hern R, Makris A, Gregory RK, Chang J, Dowsett M*. Studies of the potential utility of Ki67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **2003**, 82:113-23.
- [11]. *Jones RL, Salter JA*. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer *Clin Cancer Res*, **2008**, 14:8019-26.
- [12]. *Uehara M, Kinoshita T, Hojo T, Akashi-Tanaka, Iwamoto E*. Long-term prognostic study of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15-3 (CA 15-3) in breast cancer. *Int J Clin Oncol*, **2008**, 13(5):447-51.
- [46]. *Fleissig A, Jenkins V, Catt S, Fallowfield L*. Multidisciplinary teams in cancer care: are they effective in the UK? *Lancet Oncol*, **2006**, 7:935-43.
- [65]. *Petrucelli N, Daly BM, Feldman LG*. BRCA1 and BRCA2 Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Gene Reviews*, **2007**, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
- [66]. *Welesh PL, King MC*. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer, *Hum Mol Genet*, **2001**, 10(7):705-13.
- [67]. *Uehara M, Kinoshita T, Hojo T, Akashi-Tanaka, Iwamoto E*. Long-term prognostic study of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15-3 (CA 15-3) in breast cancer. *Int J Clin Oncol*, **2008**, 13(5):447-51.
- [71]. *Pasaoglu G, Zamani A, Can G, Imecik O*. Diagnostic value of CEA, CA-19-9, CA 125 and CA 15-3 levels in malignant pleural fluids. *Eur J Gen Med.*, **2007**, 4(4):165–71.
- [72]. *Yamagata K, Izawa Y, Onodera D, Tagami M*, **2018**, Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry* 441(1-2):9-19.
- [75]. *Dr.Liz O’Riordan Professor Trisha Greenhalgh* – The Complete Guide to Breast Cancer. How to Feel Empowered and Take Control.
- [87]. *Jones RL, Salter JA*. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer *Clin Cancer Res*, **2008**, 14:8019-26.
- [88]. *Mastropasqua MG, Viale G*, **2017**, Clinical and pathological assessment of high-risk ductal and lobular breast lesions: What surgeons must know. *European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 43(2):278-284.

- [89]. Jager W, Eibner K, Loffler B, Gleixner S, et al. Serial CEA and CA 15-3 measurement during follow-up of breast cancer patients *Anticancer Res*, **2000**, 20(6):5179-28.
- [100]. Jo, Y.; Lee, J.H.; Cho, E.S.; Lee, H.S.; Shin, S.J.; Park, E.J.; Baik, S.H.; Lee, K.Y.; Kang, J. Clinical significance of early carcinoembryonic antigen change in patients with nonmetastatic colorectal cancer. *Front.Oncol.*, **2022**, 12, 739614.
- [101]. Goossens N., Nakagawa S., Sun X., Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation, *Translational Cancer Research*, **2015**, 4, 256–269.
- [107]. Blakeman V, Williams JL, Meng QJ, Streuli CH. Circadian clocks and breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **2016**. Sep 2, 18(1):89.
- [108]. Kollias J, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW - Clinical and histological predictors of contralateral breast cancer. *Eur JSurg Oncol*, **1999**, 25, 584-589.
- [112]. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, **2019**, Jan;69(1):7-34.
- [117]. Kroman N, Holtveg H, Wohlfahrt J, Jensen M-B, Mouridsen HT, Blichert-Toft M, et al. Effect of breastconserving therapy versus radical mastectomy on prognosis for young women with breast carcinoma. *Cancer*, **2004**;100: 68893.
- [126]. McGale P, Taylor C, Correa C, et al. EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: Meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet.*, **2014**;383:2127–2135.
- [131]. 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.
- [132]. Staden R (11 d.Hr.). „A strategy of DNA sequencing employing computer programs”. *Nucleic Acids Research*. 6 (7): 2601–10. doi:10.1093/nar/6.7.2601. PMC 327874 . PMID 461197.
- [133]. de Magalhães JP, Finch CE, Janssens G, **2010**, „Next-generation sequencing in aging research: emerging applications, problems, pitfalls and possible solutions”. *Ageing Research Reviews*. 9 (3): 315–323. doi:10.1016/j.arr.2009.10.006. PMC 2878865. PMID 19900591.

- [134].<sup>^</sup> *Hall N*, mai **2007**, „Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology”. *J. Exp. Biol.* 209 (Pt 9): 1518-1525. doi:10.1242/jeb.001370. PMID 17449817.
- [135].<sup>^</sup> *Church GM*, ianuarie **2006**, „Genomes for all”. *Sci. Am.* 294 (1): 46–54. doi:10.1038/scientificamerican0106-46. PMID 16468433.
- [136]. <sup>^</sup> *Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y*, 1 ianuarie **2012**, „A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and illumina MiSeq sequencers”. *BMC Genomics.* 13(1):341. doi:10.1186/1471-2164-13-341. PMC 3431227. PMID 22827831.
- [165]. *Huang YF, Chen SC, Chiang YS, Chen TH, Chiu KP*, **2012**, „Palindromic sequence impedes sequencing-by-ligation mechanism”. *BMC Systems Biology.* 6 Suppl 2: S10. doi:10.1186/1752-0509-6-S2-S10. PMID 23281822.
- [179]. *Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., and Harris, C. C.* Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*, **1994**, 54, 4855–4878.
- [180]. *Be´roud, C., and Soussi, T.* p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Research*, **1998**, 26, 200–204.
- [181]. *Gold P., Freedman S.O.* Demonstration of tumour specific antigens in human colon carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *Journal of Experimental Medicine*, **1965**, 121, 439-62.
- [185]. *Ribeiro-Silva A, Zamzelli Ramalho LN, Garcia SB, et al.* - Is p63 reliable indetecting microinvasion in ductal carcinoma in situ of the breast? *Pathol Oncol Res*, **2003**, 9:20–3.
- [210]. *Lyon, D.H., Francombe, M.A., Hasdell, D.A. & Lawson, K.*, **1992**, Guidelines for Sensory Analysis in Food Product Development and Quality Control.
- [211]. *Muñoz, A.M., Civille, G.V. & Carr, B.T.*, **1992**, Sensory Evaluation in Quality Control.
- [213]. *De Vos, E.* (2010) Selection and management of staff for sensory quality control. In Kilcast, D. (Eds.) *Sensory Analysis for Food and Beverage Quality Control* (pp. 17-36).

- [214]. "Stochastic Methods in Neuroscience", *C. Laing, G.J. Lord*, Oxford University Press, New York, **2010**.
- [217]. *Q Zhao, DA Jayawardhana, X Guan, Biophys J* 94, 1267-1275, **2008**.
- [221]. 21. A Aksimentiev, *JB Heng, G Timp, K. Schulten*, *Biophys J* 87, 2086-2097, **2004**.
- [229]. *Stefan-van Staden R. I., Popa-Tudor I., Ionescu-Tirgoviste C., Stoica R. A.*, Molecular recognition of pyruvic acid and L-lactate in early-diabetic stage, *J. Electrochem. Soc.*, vol.165, **2018**, B659-B664.
- [230]. *Gugoasa L. A., Stefan-van Staden R. I., Dima A., Visan C. A., Streinu-Cercel A., Biris A., Calenic B.*, Fast screening of biological fluids for cytokines and adipokines using stochastic sensing, *Microelectron. Eng.*, vol.148, **2015**, 64-69.
- [231]. *Ates B, Koytepe S., Ulu A., Gurses C., Thakur V. K.*, Chemistry, structures, and advanced applications of nanocomposites from biorenewable resources, *Chem. Rev.*, **2020**.
- [232]. *Wróblewska-Krepsztul J., Rydzkowski T., Michalska-Požoga I.; Thakur V. K.*, Biopolymers for biomedical and pharmaceutical applications: recent advances and overview of alginate electrospinning, *Nanomaterials*, vol.9, **2019**, 404.
- [233]. *Siwal S. S., Zhang Q., Sun C., Thakur V. K.*, Graphitic carbon nitride doped copper–manganese alloy as high–performance electrode material in supercapacitor for energy storage, *Nanomaterials*, vol.10, , no.1, **2020**, 2.
- [327]. *A. Valavanidis, T. Vlachogianni, C. Fiotakis*, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis, *J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 27, **2009**, 120-139, <https://doi.org/10.1080/10590500902885684>.
- [328]. *E.E.M.N. Eldin, M.Z. El-Readi, M.M.N. Eldein, A.A. Alfalki, M.A. Althubiti, A.A. Mirza*, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a discriminatory biomarker for early detection of breast cancer, *Clin. Breast Cancer* 19, **2019**, e385-e393, <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.12.013>.
- [329]. *J. Musarrat, J. Arezina-Wilson, A.A. Wani*, Prognostic and aetiological relevance of 8-hydroxyguanosine in human breast carcinogenesis, *Eur. J. Cancer* 32A, **1996**, 1209-1214, [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(96\)00031-7](https://doi.org/10.1016/0959-8049(96)00031-7).



- [330]. *K. Shimol, H. Kasai, N. Yokota, S. Toyokuni, N. Kinae*, Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine, *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 11, **2002**, 767-770.
- [331]. *D. Germadnik, A. Pilger, H.W. Rüdiger*, Assay for the determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by high performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B* 689, **1997**,399-403, [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(96\)00328-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00328-3).
- [332]. *J. Xu, J. Zhang, R. Zeng, L. Li, M. Li, D. Tang*, Target-induced photocurrent-polarity-switching photoelectrochemical aptasensor with gold nanoparticle-ZnIn<sub>2</sub>S<sub>4</sub> nanohybrids for the quantification of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, *Sens.Actuators B* 368, **2022**, 132141, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132141>.
- [333]. *J. Thangphatthanarungruang, C. Chotsuwan, S. Jampasa, W. Siangproh*, A new nanocomposite-based screen-printed graphene electrode for sensitive and selective detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, *FlatChem* 32, **2022**, 100335, <https://doi.org/10.1016/j.flatc.2022.100335>.
- [346]. *T. Fukushima, J. Kawai, K. Imai, T. Toyo'oka*, "Simultaneous determination of D- and L-Serine in rat brain microdialysis sample using a column-switching HPLC with fluorimetric detection", *Biomedical Chromatography*, vol.18, **2004**, pp. 813-819.
- [347]. *E.A.L.M. Biemans, N.M. Verhoeven-Duij, J. Gerrits, J.A.H.R. Claassen, H.B. Kuiperij, M. M. Verbeek*, "CSF D-Serine concentrations are similar in Alzheimer's disease, other dementias, and elderly controls", *Neurobiology of Aging*, vol.42, **2016**, pp. 213-216.
- [348] *S.L. Grant, Y. Shulman, P. Tibbo, D.R. Hampson, G.B. Baker*, "Determination of D-Serine and related neuroactive amino acids in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection", *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol.844, **2006**, pp. 278-282.
- [349]. *D. Koval, J. Jirásková, K. Stríšovský, J. Konvalinka, V. Kašička*, "Capillary electrophoresis method for determination Of D-Serine and its application for monitoring of serine racemase activity", *Electrophoresis*, vol.27, **2006**, pp. 2558-2566.

- [366]. *D. Vlascici, E. Fagadar-Cosma, I. Popa, V. Chiriac, M. Gil-Agusti*, “A novel sensor for monitoring of iron(III) ions based on porphyrins”, *Sensors (Basel)*, vol.12, **2012**, pp. 8193-8203.
- [367]. *C. Epuran, I. Fratilescu, A.M. Macsim, A. Lascu, C. Ianasi, M. Birdeanu, E. Fagadar-Cosma*, “Excellent cooperation between carboxyl-substituted porphyrins, k-carrageenan and AuNPs for extended application in CO<sub>2</sub> capture and manganese ion detection”, *Chemosensors*, vol.10, **2022**, 133. DOI: 10.3390/chemosensors10040133.
- [368]. *L. Sălăgeanu, D. Muntean, M. Licker, A. Lascu, D. Anghel, E. Fagadar-Cosma*, “Symmetrical and asymmetrical meso-substituted porphyrins and zn-metalloporphyrins in gold colloid environment. optical properties and evaluation of antibacterial activity”, *Farmacia*, vol.68, **2020**, pp. 288-298.
- [369]. *E. Fagadar-Cosma, D. Vlascici, M. Birdeanu, G. Fagadar-Cosma*, “Novel fluorescent pH sensor based on 5-(4-carboxy-phenyl)-10,15,20-tris(phenyl)-porphyrin”, *Arabian Journal of Chemistry*, vol.12, **2019**, pp. 1587-1594.
- [370]. *A.M. Iordache, R. Cristescu, E. Fagadar-Cosma, A.C.Popescu, A.A. Ciucu, S.M. Iordache, A. Balan, C. Nichita, I. Stamatin, D.B. Chrisey*, “Histamine detection using functionalized porphyrin as electrochemical mediator”, *Comptes Rendus Chimie*, vol.21, **2018**, pp. 270-276.
- [371]. *K. Nemčėková, J. Labuda*, “Advanced materials-integrated electrochemical sensors as promising medical diagnostics tools: A review”, *Materials Science and Engineering C*, vol.120, **2021**, 111751. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111751.
- [372]. *R.I. Stefan-van Staden, D.C. Gheorghe, V. Jinga, C.S. Sima, M. Geanta*, “Fast screening of whole blood and tumor tissue for bladder cancer biomarkers using stochastic needle sensors”, *Sensors*, vol.20, **2020**, 2420. DOI: 10.3390/s20082420.
- [373]. *O.R. Musat, R.I. Stefan-van Staden*, “Stochastic sensors for the enantioselective determination of serine in blood for the early diagnosis of breast cancer”, *Analytical Letters.*, vol.55, no. 13, **2022**, pp. 2124-2131.
- [374]. *R.I. Stefan, J.F. van Staden, H.Y. Aboul-Enein*, “Electrochemical sensors in Bioanalysis”, Taylor & Francisc, Routledge, USA, **2001**.
- [354]. *J.G. Pacheco, S.V. Marta, S.M. Freitas, H.P.A. Nouws, C. Delerue-Matos*, “Molecularly imprinted electrochemical sensor for the point-of-care detection of a

- breast cancer biomarker (CA 15-3) ”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol.256, **2018**, pp. 905-912.
- [355]. *J.G. Pacheco, P. Rebelo, M. Freitas, H.P.A.Nouws, C. Delerue-Matos*, “Breast cancer biomarker (HER2-ECD) detection using a molecularly imprinted electrochemical sensor”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol.273, **2018**, pp. 1008-1014.
- [356]. *L. Jing, C. Xie, Q. Li, M. Yang, S. Li, H. Li, F. Xia*, “Electrochemical Biosensors for the analysis of breast cancer biomarkers: from design to application”, *Analytical Chemistry*, vol.94, **2022**, pp. 269-296.
- [357]. *B. Mohan, S. Kumar, H. Xi, S.M. Z. Tao, T. Xing, H. You, Y. Zhang, P. Ren*, “Fabricated metal-organic frameworks (MOFs) as luminescent and electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection”, *Biosensors and Bioelectronics*, vol.197, **2022**, 113738. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113738.
- [358]. *V. Vongsouthi, J.H. Whitfield, P. Unichenko, J.A. Mitchell, B. Breithausen, O. Khersonsky, L. Kremers, H. Janovjak, H. Monai, H. Hirase, S.J. Fleishman, C. Henneberger, C.J. Jackson*, “A rationally and computationally designed fluorescent biosensor for d-serine”, *ACS Sensors*, vol.6, **2021**, pp. 4193-4205.
- [359]. *S. Moussa, M.R. Van Horn, A. Shah, L. Pollegioni, C.J. Thibodeaux, E.S. Ruthazer, J. Mauzeroll*, “A miniaturized enzymatic biosensor for detection of sensory-evoked d-serine release in the brain”, *Journal of the Electrochemical Society*, vol.168, **2021**, 025502. DOI:10.1149/1945-7111/abe348.
- [360]. *C. Cioates Negut, R.I. Stefan - van Staden, J.F. van Staden*, “Porphyrins-as active materials in the design of sensors. an overview”, *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, vol.9, **2020**, 051005. DOI:10.1149/2162-8777/ab9a5d.
- [361]. *R.I. Stefan-van Staden, J.F. van Staden*, “Dot microsensors based on zinc porphyrins and zinc phthalocyanine for the determination of indigo carmine”, *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, vol.9, **2020**, 041015. DOI:10.1149/2162-8777/ab902e.
- [362]. *M. Coros, S. Pruneanu, R.I. Stefan-van Staden*, “Recent progress in the graphene-based electrochemical sensors and biosensors”, *Journal of the Electrochemical Society*, vol.167, **2020**, 037528. DOI:10.1149/2.0282003JES.

- [363]. *R.I. Stefan-van Staden, I. Moldoveanu, C.S. Gavan*, “Pattern recognition of HER-1 in biological fluids using stochastic sensing”, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol.30, **2015**, pp. 283-285.
- [364]. *R.I. Stefan-van Staden, I.R. Comnea-Stancu, C.C. Surdu-Bob*, “Molecular screening of blood samples for the simultaneous detection of CEA, HER-1, NSE, CYFRA 21-1 using stochastic sensors”, *Journal of the Electrochemical Society*, vol.164, **2017**, B267. DOI:10.1149/2.1621706jes.

**SITE-URI INTERNET**

- [2].<http://www.esciencecentral.org/ebooks/cancer-treatment-strategies/cancer-targeting-strategies-revisited.php>