



UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ
ȘI TEHNOLOGIE "POLITEHNICA" DIN
BUCUREȘTI



ȘCOALA DOCTORALĂ DE INGINERIE
CHIMICĂ ȘI BIOTEHNOLOGII

TEZĂ DE DOCTORAT

O ABORDARE MODERNĂ ÎN
PATOLOGIE ȘI ANALIZA CLINICĂ

Doctorand: Eng. M.D. Alexandru-Adrian Bratei

Coordonatori: Prof. Dr. habil Raluca Ioana van Staden
Prof. Dr. habil Simona Gurzu

BUCUREȘTI
2024

Cuprins

Introducere	4
Analiza stocastică a biomoleculilor.....	5
Partea 1 - Senzori pentru detectarea biomarkerilor.....	10
I. Senzori bazați pe IN NB-GR și IQ NB-GR pentru cuantificarea proteinelor MMR și KRAS ...	10
II. Senzori bazați pe NSB-EGR și FHD/FTEX pentru cuantificarea proteinelor MMR și KRAS...	30
III. Senzori stochastici pentru cuantificarea catepsinei B, catepsinei D și proteinei p53	42
IV. Senzori pentru cuantificarea CA 19-9, CA 72-4, CA 125 și CEA.....	52
Partea 2- Aplicații biomedicale pentru senzorii stochastici dezvoltati	67
Appendix 1	84
PARTICIPĂRI LA CONFERINȚE NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE.....	84
Appendix 2	85
ARTICOLE PUBLICATE ÎN JURNALE PEER-REVIEWED	85
ARTICOLE TRIMISE SPRE PUBLICARE ÎN REVISTE ISI	86
Bibliografie selectivă	87

MULȚUMIRI

Aș dori să-mi exprim mulțumirile și profundele recunoștințe coordonatorilor de doctorat Prof. Dr. Habil. Raluca-Ioana van Staden și prof. dr. Habil. Simonei Gurzu pentru coordonarea deosebită, recomandările și sfaturile utile oferite pentru studiile de doctorat precum și pentru pregătirea tezei de doctorat.

Îmi exprim sincerele mulțumiri și deplinul respect familiei mele care mi-au oferit tot sprijinul, înțelegerea și puterea de a-mi finaliza studiile doctorale cu rezultate excelente.

Introducere

Diagnosticul anatomopatologic reunește o serie largă de specialități medicale atât chirurgicale, cât și clinice, fiind indispensabil în managementul pacienților cu leziuni neoplazice. Acest diagnostic se pune în principal în două moduri:

- Morfologic pe baza unor aspecte calitative, folosind microscopul optic;
- Molecular pe baza expresiei moleculare, folosind tehnici de imunohistochimie.

Analiza profilului molecular prin tehnici imunohistochimice are la baza folosirea de colorații speciale pe secțiuni tisulare pentru a evidenția prezența sau absența unui marker.

Totuși, aceste metode sunt limitate la nivelul țesutului tumoral fără a ține cont de efectul sistemic al prezenței tumorale. De asemenea, diagnosticul tumoral de certitudine se pune tot de către anatomopatolog pe baza analizei caracteristicilor celulare. Toate tehnicile actuale sunt costisitoare și necesită o durată îndelungată de timp, iar majoritatea folosesc material tisular obținut pe cale invazivă.

În contextul acestor deficite, în cadrul acestei lucrări s-a urmărit introducerea unei metode alternative care să vină cu un rol complementar pentru evaluarea caracteristicilor clinicopatologice și pentru depistarea precoce a proceselor neoplazice. Aceasta este metoda stocastică care permite evaluarea rapidă, cu costuri reduse, cu acuratețe și reproductibilitate excelentă, a nivelurilor biomarkerilor tumorali din principalele fluide biologice și anume din sânge, urină și salivă.

Cuantificarea nivelurilor unor biomarkeri folosiți în mod uzual în analiza imunohistochimică a leziunilor neoplazice vine ca o metodă complementară minim invazivă. Concentrațiile acestora din sânge, urină și salivă sunt în strânsă corelație cu biodinamica moleculară, cu procesele de transfer de masă și cu cinetica proceselor biochimice din cadrul căilor metabolice ale fiecărui biomarker. Adiacent nivelului bazal al biomarkerilor aferent turnover-ului celular, eliberarea de biomolecule în torentul sanguin este realizată fie de masa tumorală, fie de țesuturile adiacente netumorale ca efect al prezenței tumorii. Astfel, este de așteptat ca aceste nivele să depindă de caracteristicile clinicopatologice ale tumorii așa cum va fi prezentat detaliat în cadrul acestei lucrări.

Valorificarea acestei metode a fost realizată holistic, pornind de la dezvoltarea conceptuală a unor senzori stocastici, cu calibrarea și standardizarea acestora, urmată de aplicarea pe probe biologice pentru evaluarea prezenței și a concentrațiilor markerilor tumorali în cadrul acestora. S-a urmărit corelarea cu caracteristicile clinicopatologice pentru adenocarcinomul colorectal și adenocarcinom gastric, iar rezultatele obținute vor fi prezentate detaliat.

Analiza stocastică a biomoleculelor

Analiza stocastică reprezintă o tehnică electrochimică de detectare calitativă și de cuantificare a biomoleculelor din diverse fluide. Această metodă are la baza senzorii stocastici care vor fi detaliați în cadrul acestei lucrări.

Senzorii stocastici au fost inspirați din biologie unde s-a observat existența unor canale/pori care reacționează și răspund specific la existența în mediu a anumitor ioni sau biomolecule. Ca exemple se amintesc canalele de sodiu amilorid-sensibile care mediază gustul sărat și receptorii vaniloizi care mediază gustul iute. Pornind de la analiza interacțiunii acestor canale cu un anumit substrat, s-au dezvoltat până în prezent numeroși senzori capabili să detecteze și să cuantifice de la ioni mici la molecule organice și până la proteine și ADN.

Întrucât căile metabolice sunt intricate și interacțiunea canalului ca receptor cu biomolecula ca substrat are ca efect activarea anumitor căi biochimice în sistemele biologice, reproducerea în laborator a acestor senzori nu ar fi eficientă. Deficiențele acestui mecanism constă în:

- reproductibilitate scăzută datorită complexității sistemului;
- dificultăți în interpretarea rezultatelor, deoarece căile metabolice sunt strâns interconectate și un anumit substrat ar putea conduce simultan la activarea mai multor căi paralele;
- constrângeri relative la condițiile de lucru, deoarece acești senzori sunt proteine din punct de vedere structural și funcționează optim într-un interval restrâns de valori ale temperaturii și ale pH-ului.

Pornind de la aceste observații, folosirea în aceeași formă ca în sistemele biologice nu este fezabilă și a fost necesară o abordare conceptual chimico-matematică.

S-a pornit de la faptul că un canal prezintă 2 stări – starea activă când este legat substratul și cea inactivă când nu este legat substratul. Substratul se leagă necovalent la un situs din cadrul proteinei-por, iar acest aspect face ca legarea să fie reversibilă și să se stabilească un echilibru similar ca în cazul legării unei enzime la substrat ($S + P \rightleftharpoons S \cdot P$, unde S este substratul, P este proteina por (starea inactivă), $S \cdot P$ este complexul substrat-proteină care corespunde stării active).

Mai mult, echilibrul chimic este dinamic, fiind puternic influențat de concentrația substratului. Cu cât crește concentrația substratului, cu atât echilibrul va fi mai mult deplasat la dreapta, cu creșterea ponderii formei active a porului.

Porul trece în starea activă prin legarea eficientă a substratului succesiv unei ciocniri eficiente și revine la starea inactivă (fundamentală) prin dezlegarea de substrat. Astfel, fiecare por va exista în fiecare stare un anumit interval de timp.

Principiul biochimic al funcționării acestor canale are la bază activarea funcției de canal. Astfel, prin legarea substratului, canalul își modifică structurile terțiară și cuaternară, formându-se un canal deschis prin care au loc schimburi în general ionice în sensul gradientului electrochimic.

Intervalul de timp în care porul este în stare activă depinde de o serie de factori cum ar fi:

- tăria legăturii (un substrat legat mai slab de situsul de pe por, se va dezlega mai ușor și va exista un interval mai scurt în stare activă);
- geometria porului (o geometrie complexă ar putea favoriza părăsirea situsului);
- natura și geometria substratului (un substrat cu dimensiuni mai mari va reuși mai greu să ajungă la situsul de legare și va sta legat un interval mai mic).

Intervalul de timp în care porul este în stare inactivă depinde de:

- localizarea situsului în cadrul porului (un situs localizat mai profund este mai greu accesibil pentru substrat și astfel va dura mai mult până va avea loc o ciocnire eficientă);
- geometria situsului de legare al substratului (o geometrie complexă ar putea îngreuna accesul la situsul de legare al substratului);
- diametrul mediu al porului până la nivelul situsului (cu cât diametrul este mai mare, cu atât substratul va avea acces mai ușor);
- concentrația substratului (cu cât concentrația este mai mare, cu atât vor exista mai multe ciocniri și va crește probabilitatea unei ciocniri eficiente, deci va scădea durata stării inactivă).

Printre factorii care influențează ambii timpi se amintesc temperatura și pH-ul. Influența temperaturii se resimte atât în posibilitatea de denaturare termică a componentelor proteice din cadrul porului și substratului, cât și în modificarea vitezei aferente mișcării browniene a moleculelor. Influența pH-ului constă în modificarea încărcării electrice a diverselor secvențe de aminoacizi din structura porului și a substratului, cu alterarea structurilor terțiară și cuaternară.

Fiind vorba de un sistem cu număr foarte de mare molecule, pentru o abordare mai corectă din punct de vedere matematic, este necesară o analiză a distribuției stărilor active și inactivă. Cel mai ușor, aceasta se poate face după criteriul temporal, respectiv după criteriul spațial.

Analiza distribuției după criterii de timp se face la nivel de canal urmărind timpul în care substratul este legat la por – timpul cât porul este în formă activă (t_a), respectiv timpul în care substratul nu este legat la por – timpul cât porul este în formă inactivă (t_i). Se poate defini astfel probabilitatea ca un canal să fie în stare activă (respectiv în stare inactivă) ca fiind raportul dintre t_a (respectiv t_i) și timpul total unui ciclu ($t_a + t_i$). Cele două stări sunt alternative și succesive, însă durata fiecărei stări este variabilă. Din aceste considerente, se ia valoarea medie pentru fiecare.

Așa cum s-a analizat anterior, valoarea duratei stării active depinde de natura substratului și de structura porului în timp valoarea duratei stării inactive depinde de localizarea situsului, geometria porului și invers proporțional de concentrația substratului.

Analiza criteriului spațial vizează distribuția canalelor/porilor și ține cont și de numărul și accesibilitatea lor. În sistemele biologice, canalele sunt de natură proteică și se afla distribuite în cadrul membranei celulare de natură lipidică. Membranele celulare au fost intens studiate și apreciate pentru caracteristica lor de mozaic fluid. Altfel spus, molecule lipidice și proteice din cadrul acesteia se mișcă liber, putând executa mișcări de translație (astfel repartiția în suprafață a structurilor proteice este uniformizată), de rotație (nu influențează repartiția canalelor/porilor) și de flip-flop (mai mult caracteristice pentru moleculele lipidice, practic ne semnificative pentru structurile proteice).

Mișcările de translație sunt mult mai lente decât mișcarea browniană a biomoleculelor în cadrul unui fluid, ceea ce face ca adiacent unui canal să se găsească un număr similar de biomolecule. Totuși, ar trebui luat în calcul și gradul de deformare al suprafeței totale, deoarece în cadrul unei plicaturări accentuate cum se întâlnește în structurile epiteliale din tractul digestiv, accesul va fi mult mai ușor pentru canalele de la suprafață comparativ cu cele din profunzime. În funcție de cât de profund se găsește un canal, acesta poate ajunge chiar să aibă o pondere ne semnificativă. Pentru a depăși aceste impedimente, se poate lucra cu caracteristicile medii ale structurilor proteice de tip canal/por.

În cadrul unei suprafețe totale restrânse, singurul element care ar influența puternic răspunsul ar fi reprezentat de numărul de canale. Cu cât sunt mai multe canale, cu atât va fi mai mare probabilitatea unei ciocniri eficiente.

Cele două criterii sunt interconectate întrucât cu cât numărul de canale este mai mare, va crește valoarea duratei medii de inactivitate pentru un canal, deoarece numărul mediu de biomolecule adiacente unui canal va fi practic mai mic și astfel probabilitatea unei ciocniri eficiente va fi redusă.

Pentru a valorifica principiile acestei metode și pentru a o putea utiliza în condiții de laborator, o serie de modificări ar trebui făcute în paralel cu urmărirea caracteristicilor din sistemele biologice. Astfel se vor defini și descrie senzorii stocastici care ar ține practic de domeniul electrochimiei analitice.

Prima oară trebuie căutat un sistem echivalent membranelor biologice care susțin acești pori. Astfel este necesară prezervarea funcției de susținere și să se asigure o distribuție uniformă a structurilor de detecție. În mod ideal, ar trebui depășite impedimente care depind de temperatură și pH, deoarece acestea ar putea influența decisiv numărul de utilizări ale unui senzor. Astfel alegerea unei matrici biochimice ar trebui evitată. Optim se va alege o matrice rezistentă sau foarte puțin influențată de factori externi. Un exemplu exploatat în această lucrare este cel al unei matrici pe bază de carbon în forma alotropică de grafenă. Grafena este o variantă a grafitului cu aranjament bidimensional-planar în care atomii de carbon sunt dispuși în continuare într-o rețea de tip de

hexagonal, cu mențiunea că acesta reprezintă un conductor excelent de căldură și curent electric. Acesta e un suport inert din punct de vedere chimic, astfel că impedimentul reprezentat de influența pH-ului este depășit, iar tăria legăturilor este crescută astfel că în condiții de laborator, efectul temperaturii este minimizat, practic nesemnificativ. Inerția chimică contribuie și la creșterea numărului de utilizări succesive în diverse fluide.

Următorul pas ar fi să se identifice o structură echivalentă a porului pentru care să se mențină principiul de funcționare. În sistemele biologice, gradientul electrochimic este dat de încărcarea electrică de o parte și de alta a membranei și este dat de ionii existenți în mediul intracelular și extracelular. În cazul utilizării unei matrice de grafenă, componenta de ioni intracelulari nu mai este o opțiune, iar gradientul electrochimic ar putea fi conservat prin aplicarea din exterior a unei surse de curent.

Trecerea ionilor prin aceste structuri echivalente de por ar putea duce la contaminarea matricei și de aceea este preferabil ca aceștia să poată fi eliminați cu ușurință între utilizări succesive. În cazul trecerii unui ion mare, acesta este mai greu eliminabil și de aceea, speciile care ar fi preferabil să treacă ar fi electronii sau ionii mici.

Pentru a evita impedimentele reprezentate de influența pH-ului și temperaturii, acest echivalent ar trebui să asocieze de asemenea o inerție chimică și termică crescute. Astfel, o structură proteică este de asemenea de evitat, însă alte structuri fezabile nu ar putea prezenta modificări de conformație.

Prin combinarea celor menționate mai sus, se poate concluziona că este necesară o moleculă ciclică, cu ciclu mic, inertă chimic și termic în condiții de laborator. Întrucât aceasta ar schimba proprietățile matricei de grafenă, ea poartă numele de modificador. Astfel de modifikatori ar putea fi reprezentați de protoporfirine, de ciclodextrine sau de eteri ciclici.

Controlul numărului de astfel de structuri poroase pentru trecerea curentului electric se realizează prin alegerea unui raport masic optimizat între matrice și modificador.

Acest amestec ar trebui introdus într-un suport care să asigure suprafața de contact cu fluidul din care se vor detecta și cuantifica analiții. În cadrul acestei lucrări, amestecul va fi introdus într-un vârf de micropipetă, iar conectarea la sursa de curent electric extern se va face printr-un fir de argint.

Principiul de funcționare al unui astfel de senzor se bazează pe influența existenței unui anumit analit din fluidul de analizat asupra curentului electric ce trece prin echivalentul de por. Astfel când în soluție se trece un curent electric continuu la potențial fixat, trecerea este neîntreruptă prin por, însă dacă analitul se fixează la modificador, acesta ar bloca trecerea curentului electric prin scăderea conductanței și s-ar înregistra o întrerupere a fluxului.

Valoarea timpului acestui blocaj este dată de însumarea timpilor de difuziune prin matrice la por, de legare la por și de difuziune înapoi în fluidul de analizat, și este puternic influențată de natura și dimensiunea analitului. Cu cât caracteristicile geometrice ale biomoleculei sunt mai complexe și cu cât dimensiunea este mai mare, cu atât accesul și blocarea porilor vor fi mai limitate. Cum fiecare moleculă este unică din punct de vedere structural, s-ar putea conchide ca felul cum influențează valoarea acestor timpi este unic și el. Astfel, timpul de blocaj al trecerii curentului electric este ca o semnătură a fiecărei molecule și se notează t_{off} . Între două blocaje succesive, intervine probabilitatea unei alte ciocniri eficiente pentru a putea intra în canalul din matrice către por. Altfel spus, cu cât este mai mare concentrația unei specii, cu atât crește probabilitatea unei ciocniri eficiente, iar durata dintre două blocaje este mai mică, practic invers proporțională cu concentrația. Acest timp dependent de concentrație dintre două blocaje succesive se notează t_{on} .

Pe baza celor menționate mai sus, o biomoleculă s-ar putea detecta în mediu pe baza valorii lui t_{off} , iar pe baza valorii lui t_{on} , se poate calcula concentrația.

Mai mult, cum fiecare moleculă se identifică și cuantifică raportat la t_{off} , mai mulți analiți pot fi determinați simultan atâta timp cât ei au valori suficient de distanțate între ele ale lui t_{off} pentru ca, pe cale experimentală, ei să poată fi evaluați separat. De asemenea, în cazul analizei simultane a mai multor analiți, este necesar un timp mai mare de măsurare pentru ca fiecare analit să aibă ocazia probabilistic să intre în por și să i se poată determina valoarea lui t_{on} .

Cum fluidele biologice conțin o multitudine de posibili analiți, unii cu proprietăți structurale destul de similare, procesul de selecție trebuie să fie foarte bine reglat. Aceasta se poate face prin alegerea matricei (astfel încât prin porii săi să încapă analitul), modificatorului (astfel încât să se poată lega de analit) și potențialului (să fie suficient de puternic pentru a mișca proteina în gradient electrochimic).

Celula electrochimică este alcătuită din senzorul propriu-zis care a fost descris și detaliat mai sus, dintr-un electrod de referință – ales de speța a doua pentru stabilitate, format dintr-un fir de Ag acoperit cu un strat de clorură de argint – și un contraelectrod (fir de Pt). Prin introducerea senzorului, electrodului de referință și contraelectrodului în soluția de analizat, se poate obține o diagramă amperometrică (în care să se măsoare intensitatea curentului electric care trece prin pori în funcție de timp). Din această diagramă se pot obține valorile lui t_{off} și ale lui t_{on} , din care se pot identifica și analitul și concentrația acestuia.

Partea 1 - Senzori pentru detectarea biomarkerilor

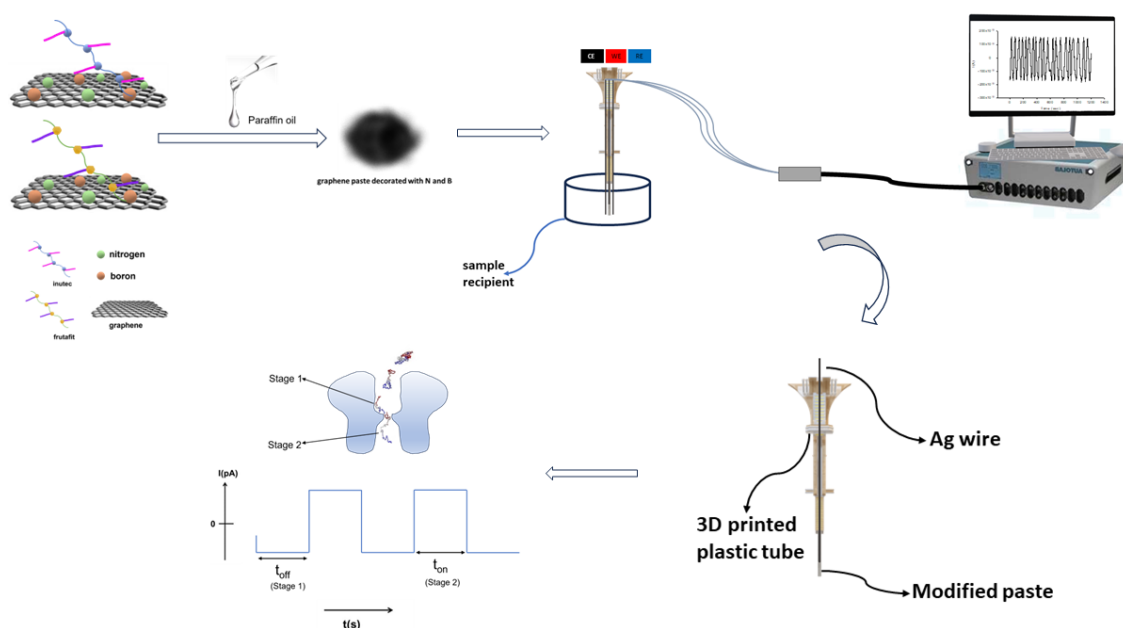
În această lucrare, cuantificarea în probe biologice a urmărit treisprezece biomarkeri cunoscuți a fi asociați cu adenocarcinoamele gastrice și colorectale, și anume maspin, MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, KRAS, CA 72-4, CA 19-9, CEA, CA125, p53, cathepsina B și cathepsina D. S-au găsit corelații detaliate cu caracteristicile clinicopatologice ale pacienților din baza de date pentru primii șase biomarkeri.

I. Senzori bazați pe IN NB-GR și IQ NB-GR pentru cuantificarea proteinelor MMR și KRAS

1. Partea experimentală

1.1. Proiectarea microsenzorilor stocastici

Cei doi microsenzori stocastici au fost proiectați după cum urmează: 50 μ L de soluție IN (10 \cdot 3mol L \cdot 1) s-au adăugat la 50mg pastă de grafen decorată cu N și B (NB-GR) (realizat prin amestecarea fizică a pulberii NB-GR și a uleiului de parafină până când s-a obținut o pastă omogenă); S-au adăugat 50 μ L de soluție IQ (10 \cdot 3mol L \cdot 1) la 50 mg pastă de grafen decorată cu N și B (NB-GR) (obținută prin amestecarea fizică a pulberii NB-GR și a uleiului de parafină până la obținerea unei paste omogene) (Schema 1).

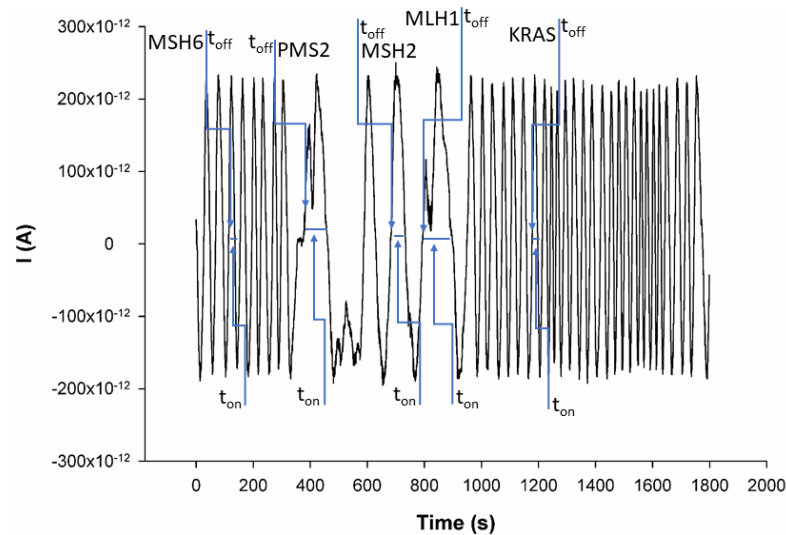


Schema 1. Proiectarea microsenzorului stocastic. Principiul dezvoltării curente.

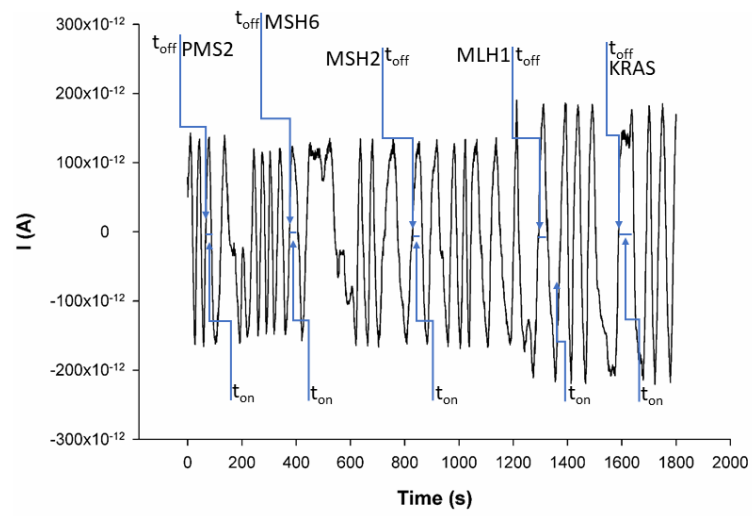
Fiecare pastă a fost plasată într-un tub imprimat 3D cu diametrul intern de $20\mu\text{m}$; un fir de Ag a făcut legătura între pastă și circuitul extern. Înainte și după fiecare măsurătoare, microsenzorii au fost curățați cu apă deionizată. Când nu au fost utilizați, microsenzorii stocastici au fost păstrați într-un loc uscat, la temperatura camerei.

1.2. Metoda stocastică

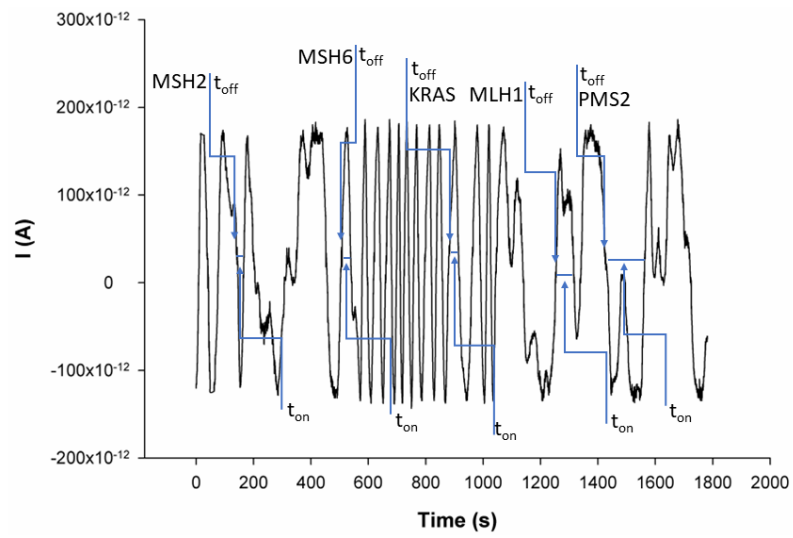
Metoda stocastică a folosit tehnica cronoamperometrică efectuată la 125 mV vs Ag/AgCl . Pe baza semnăturilor (valorilor t_{off}) ale MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS, acești biomarkeri au fost recunoscuți în probele biologice. Pentru calibrarea celor doi microsenzori stocastici au fost utilizate o serie de soluții care conțin diferite concentrații de MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS. Ecuațiile de calibrare obținute pentru biomarkerii utilizând fiecare dintre cei doi microsenzori stocastici s-au bazat pe determinarea valorii t_{on} (citită între două valori consecutive de t_{off}); Parametrii a , și b din ecuația de calibrare $1/t_{\text{on}} = a + b \times \text{Conc. biomarker}$ au fost determinați folosind metoda regresiei liniare. Pentru screening-ul probelor biologice, cum ar fi sânge integral, urină, saliva și țesut tumoral, biomarkerii au fost recunoscuți pe baza semnăturii lor (valori t_{off}) (Figurile 1 și 2, Schema 1), valorile tonelor au fost citite și introduse în ecuația de calibrare pentru determinarea concentrației de MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în proba biologică.



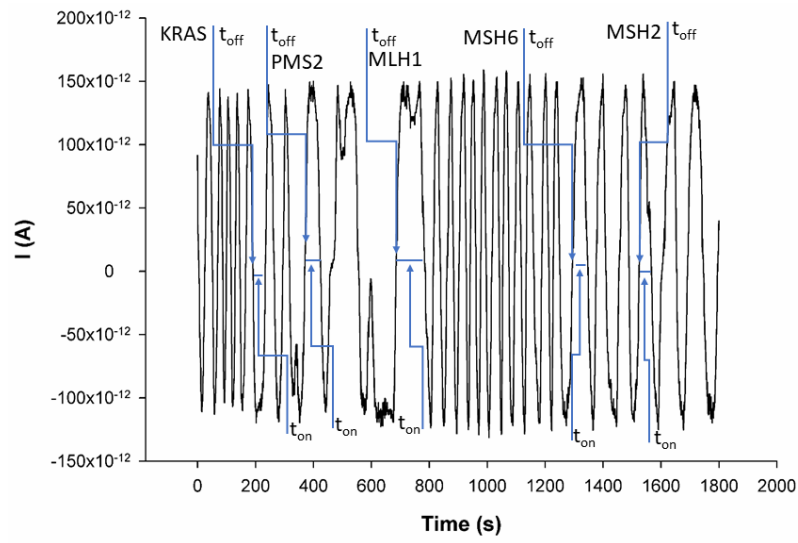
(A)



(b)

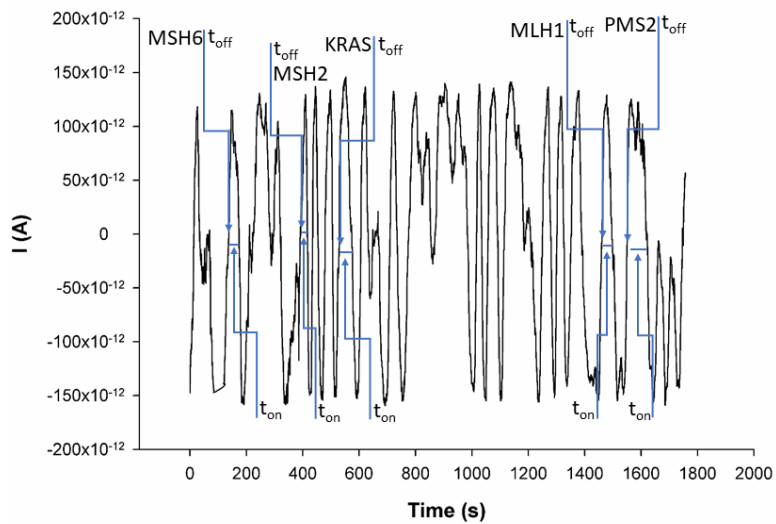


(c)

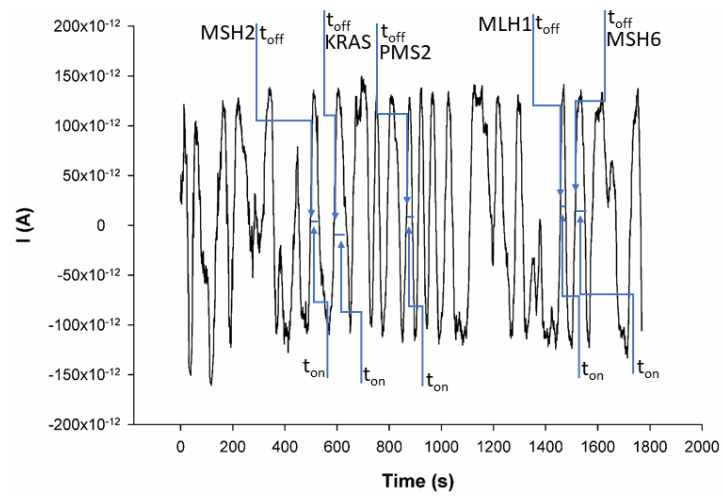


(d)

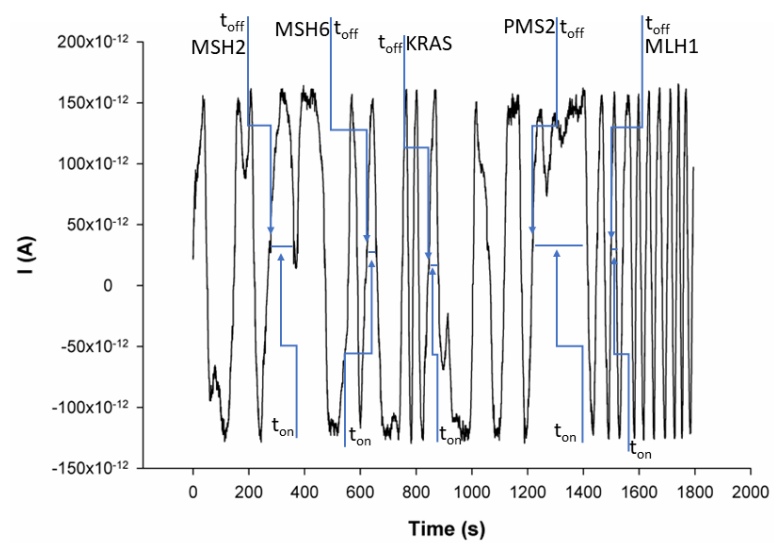
Figura 1.Diagrame tipice obținute prin screening (a) sânge integral, (b) saliva, (c) urină și (d) țesuturi tumorale cu microsenzorul stocastic bazat pe IN/GR-BN.



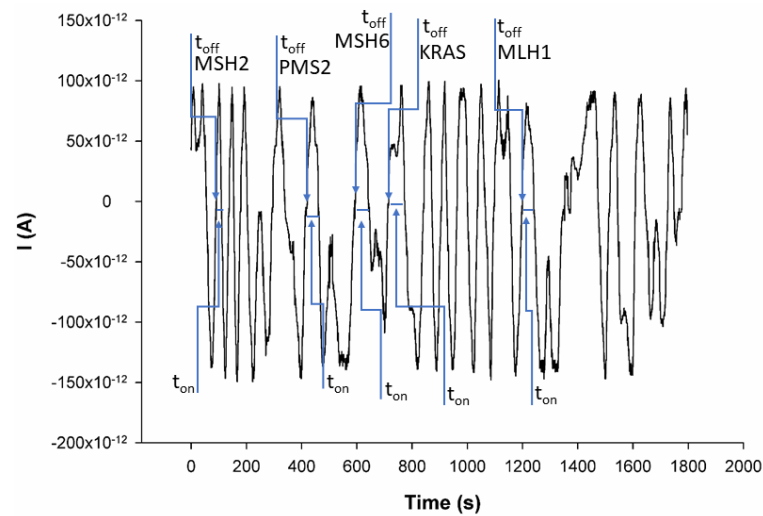
(A)



(b)



(c)



(d)

Figura 2.Diagrame tipice obținute prin screening (a) sânge integral, (b) saliva, (c) urină și (d) țesuturi tumorale cu microsenzorul stocastic bazat pe IQ/GR-BN.

2. Rezultate și discuții

2.1. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici

Caracteristicile de răspuns pentru microsenzorii stocastici propuși utilizați pentru testarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS sunt prezentate în Tabelul 1. Diferitele semnături (valori toff) înregistrate pentru MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și ale KRAS a favorizat analiza lor simultană în probele biologice. Graficele de calibrare sunt prezentate în figurile S1 și S2.

Cele mai largi intervale liniare de concentrație pentru testarea MLH1 și MSH6 au fost obținute atunci când s-a folosit microsenzorul stocastic bazat pe IN, în timp ce cele mai largi intervale de concentrație liniare pentru analiza PMS2 și KRAS au fost obținute folosind microsenzorul stocastic bazat pe IQ. Modificatorul pastei de grafen dopat cu NB (IN, IQ) nu a influențat nici domeniul liniar de concentrație, nici limita de determinare atunci când a fost utilizat pentru testarea MSH2. Pentru testarea MLH1 și MSH6, cea mai inferioară limită de determinare a fost obținută atunci când a fost utilizat microsenzorul stocastic bazat pe IN, în timp ce pentru testarea PMS2, cea mai inferioară limită de determinare a fost obținută atunci când a fost utilizat microsenzorul stocastic bazat pe IQ. Modificatorul (IN, IQ) nu a influențat valoarea limitei de determinare pentru analiza KRAS.

Tabelul 1.Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici utilizați pentru testarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS.

Stochastic microsenzor bazat pe GR-NB și	Semnătură, t_{off} (s)	Interval liniar de concentrație (g mL ⁻¹)	Ecuatii de calibrare; coeficientul de corelare, r^*	Sensibilitate (s ⁻¹ μg ⁻¹ ml)	LOQ (fg mL ⁻¹)
MLH1					
ÎN	1.6	$3,10 \times 10^{-16}$ - $3,00 \times 10^{-6}$	$1/t_{on}=0,13+0,13 \times C$; $r=0,9997$	0,13	0,31
IQ	1.2	$3,20 \times 10^{-11}$ - $3,20 \times 10^{-6}$	$1/t_{on}=0,04+3,73 \times 10^{-2} \times C$; $r=0,9788$	$3,73 \times 10^{-2}$	$3,20 \times 10^4$
MSH2					
ÎN	1.4	$1,00 \times 10^{-15}$ - $1,00 \times 10^{-5}$	$1/t_{on}=0,16+3,65 \times 10^{-2} \times C$; $r=0,9985$	$3,65 \times 10^{-2}$	1.00
IQ	1.4	$1,00 \times 10^{-15}$ - $1,00 \times 10^{-5}$	$1/t_{on}=0,04+8,46 \times 10^{-3} \times C$; $r=0,9478$	$8,46 \times 10^{-3}$	1.00
MSH6					
ÎN	1.2	$2,30 \times 10^{-15}$ - $2,30 \times 10^{-7}$	$1/t_{on}=0,03+2,14 \times C$; $r=0,9959$	2.14	2.30
IQ	2.4	$2,70 \times 10^{-9}$ - $2,70 \times 10^{-7}$	$1/t_{on}=0,03+1,07 \times C$; $r=0,9996$	1.07	$2,70 \times 10^6$
PMS2					
ÎN	1.9	$2,70 \times 10^{-9}$ - $2,70 \times 10^{-5}$	$1/t_{on}=0,03+1,62 \times 10^{-2} \times C$; $r=0,9883$	$1,62 \times 10^{-2}$	$2,70 \times 10^6$
IQ	1.8	$2,70 \times 10^{-15}$ - $2,70 \times 10^{-10}$	$1/t_{on}=0,03+3,44 \times 10^2 \times C$; $r=0,9435$	$3,44 \times 10^2$	2,70
KRAS					
ÎN	1.0	$2,20 \times 10^{-15}$ - $2,20 \times 10^{-6}$	$1/t_{on}=0,32+2,67 \times C$; $r=0,9987$	2,67	2.20
IQ	1.6	$2,20 \times 10^{-15}$ - $2,20 \times 10^{-5}$	$1/t_{on}=0,04+1,56 \times 10^{-2} \times C$; $r=0,9981$	$1,56 \times 10^{-2}$	2.20

*<C> - concentrație = μg mL⁻¹; <ton> = s; LOQ - limită de cuantificare

Toți senzorii au prezentat o sensibilitate ridicată pentru testarea simultană a MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în soluții sintetice și în probe de sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral. Nu s-au înregistrat modificări ale valorilor caracteristicilor de răspuns atunci când microsenzorii stocastici au fost caracterizați în sânge integral, saliva, urină și țesuturi tumorale. S-au înregistrat sensibilități ridicate pentru ambii senzori atunci când au fost utilizați pentru testarea proteinelor de reparare a nepotrivirii și KRAS. În comparație cu senzorii propuși mai devreme pentru testarea simultană a MMP și KRAS [23, 24], microsenzorii stocastici propuși au furnizat limite inferioare de determinare pentru analiza MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS și intervale de concentrație liniare mai largi pentru test. de MLH1, MSH2 și MSH6.

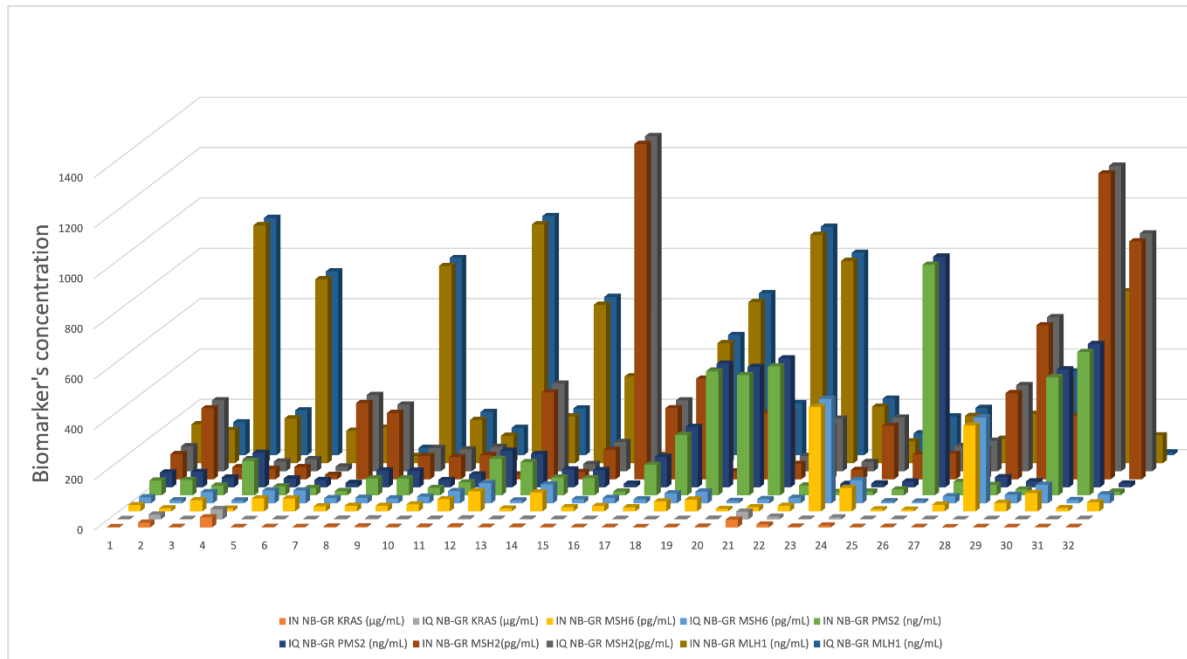
Au fost efectuate studii de reproductibilitate pentru fiecare dintre cei doi microsenzori stocastici. În acest sens, au fost fabricați 10 microsenzori stocastici de fiecare tip urmând procedura prezentată în paragraful Design Sensor. Fiecare dintre senzori au fost evaluați în același mod, iar sensibilitățile au fost determinate și comparate atunci când au fost scufundate în fiecare dintre soluțiile proteinelor de reparare a nepotrivirii și KRAS. Valorile RSD (%) înregistrate pentru sensibilități au fost mai mici de 0,21% când au fost testați microsenzorii bazați pe IQ și mai puțin de 0,10% când au fost testați microsenzorii stocastici bazați pe IN. Aceste valori au dovedit reproductibilitatea designului microsenzorilor stocastici.

Stabilitatea fiecărui microsenzor stocastic a fost verificată după cum urmează: 30 de microsenzori stocastici de fiecare tip au fost stocați așa cum este descris în paragraful Proiectarea microsenzorilor stocastici. În fiecare zi, un nou microsenzor stocastic a fost scos din depozit și scufundat în soluții care conțineau proteine de reparare nepotrivate și KRAS la concentrații diferite; sensibilitățile fiecărei măsurători au fost păstrate pentru comparație după ce întregul lot de microsenzori stocastici a fost consumat în 30 de zile. Rezultatele înregistrate la sfârșitul perioadei au arătat stabilitatea ridicată a microsenzorilor stocastici în timp deoarece variația sensibilităților în timp a fost mai mică de 0,08%, în ciuda modulatorului (IN, IQ) utilizat pentru proiectarea microsenzorilor stocastici.

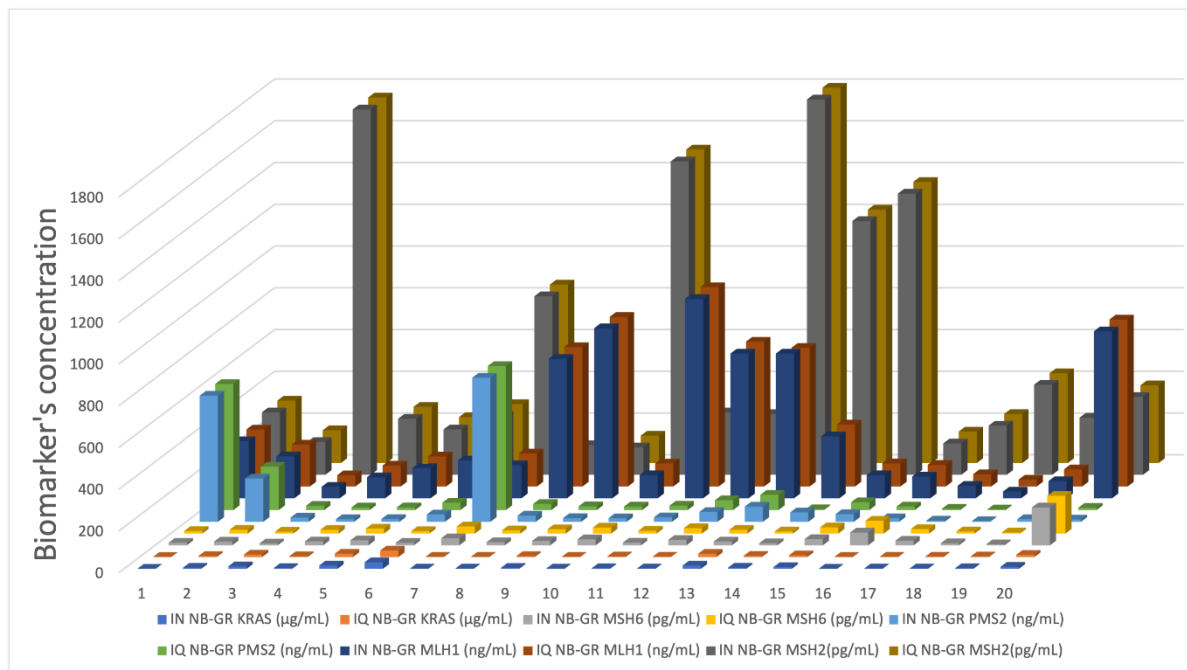
2.2. Determinarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în probele biologice

Mai mult de 100 de seturi de probe biologice: sânge integral, salivă, urină și țesuturi tumorale au fost analizate folosind microsenzorii stocastici propuși. Exemple de diagrame obținute sunt prezentate în Figurile 1 și 2. După identificarea fiecărei proteine de reparare a nepotrivirii și a KRAS, concentrația acestora a fost determinată în mod corespunzător cu procedura descrisă în paragraful Metoda Stochastică.

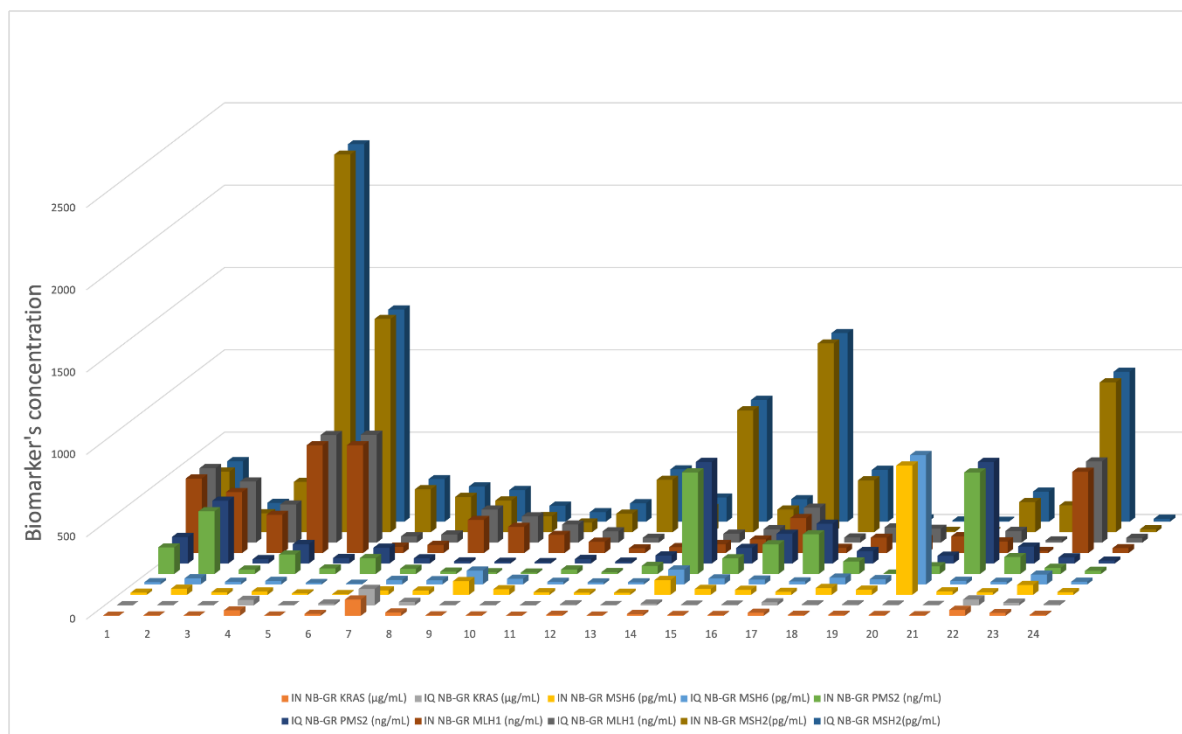
Rezultatele prezentate în Figura 3 demonstrează buna corelație dintre concentrația obținută pentru MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în probele de sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral.



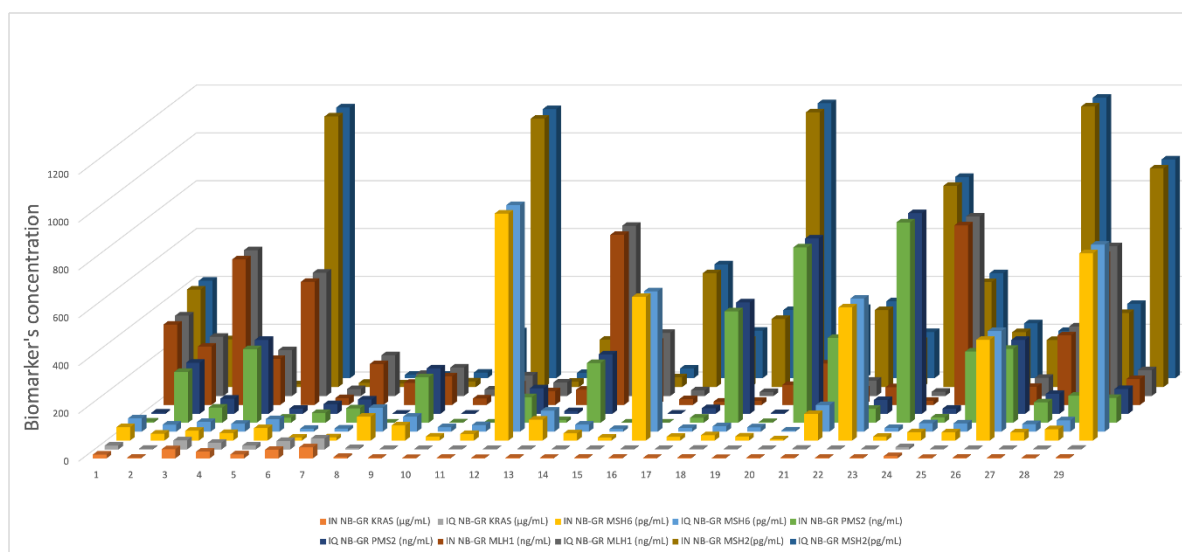
(A)



(b)



(c)



(d)

Figura 3. Determinarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în (a) sânge integral, (b) salivă, (c) urină și (d) probe de țesut tumoral utilizând microsenzorii stocastici bazați pe GR-NB și, respectiv, IN, IQ.

A fost efectuat și un test Student t pereche la nivelul de încredere de 99,00%, pentru care valoarea tabelată a fost 4,13. Toate valorile obținute – atunci când rezultatele microsenzoriului stocastic bazat pe IN au fost comparate cu microsenzoriul stocastic bazat pe IQ, pentru testul t au fost mai mici de 3,00, dovedind că nu există o diferență semnificativă între rezultatele obținute folosind cei doi microsenzori stocastici.

Validarea ulterioară a fost efectuată prin efectuarea de teste de recuperare a MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în probe de sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral folosind cei doi microsenzori stocastici bazați pe IN și IQ. Au fost determinate cantitățile inițiale de MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în probele de sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral, iar după aceea, în fiecare tip de probă, cantități diferite – de la cantități foarte mici la cantități mai mari (calculate pentru a fi montate în intervalul de concentrație de lucru al fiecăruia dintre senzori) au fost adăugate probelor și au fost efectuate noi măsurători. Cantitatea adăugată a fost comparată cu cantitatea găsită de MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în probele de sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2. Recuperarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS din probe biologice

(N = 10).

Microsenzori stocastici bazati pe GR-NB și	% de recuperare				
	MLH-1	MSH-2	MSH-6	PMS-2	KRAS
	Tot sângele				
ÎN	99,10±0,01	99,18±0,02	99,98±0,01	99,54±0,02	98,95±0,02
IQ	99,17±0,03	99,12±0,02	99,95±0,04	99,00±0,03	99,83±0,05
	Salivă				
ÎN	99,10±0,01	99,25±0,02	99,97±0,02	99,48±0,02	99,97±0,02
IQ	98,96±0,04	99,15±0,06	99,12±0,05	98,99±0,03	98,90±0,02
	Urină				
ÎN	98,91±0,02	99,32±0,02	99,15±0,01	98,93±0,02	99,54±0,03
IQ	98,23±0,04	98,95±0,02	99,00±0,05	98,91±0,03	98,93±0,03
	Țesut tumoral				
ÎN	99,99±0,01	99,97±0,03	99,91±0,02	99,99±0,03	99,96±0,01
IQ	99,35±0,04	99,23±0,02	99,49±0,01	99,53±0,02	99,81±0,05

Testele de recuperare efectuate arată valori mari pentru recuperări (toate mai mari de 98,00%) cu RSD (%) foarte scăzută, mai mici de 0,10%, când au fost efectuate 10 măsurători. În consecință, au fost obținute o acuratețe și precizie ridicate atunci când senzorii stocastici propuși au fost utilizați pentru screening-ul probelor biologice.

Tabelele 3, 4, 5 și 6 au prezentat rezultatele obținute folosind microsenzorii propuși și ELISA (metoda standard utilizată pentru testarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS).

Tabelul 3. Compararea datelor obținute folosind microsenzorii stocastici și kiturile ELISA pentru determinarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în sângele integral (N=10).

Probă Nu.	Metoda bazata pe	MLH1, ng mL-1	MSH2, pg mL-1	MSH6, pg mL-1	PMS2, ng mL-1	KRAS, μg mL-1
1	GR-NB-IN	157,00±0,01	99,43±0,01	24,24±0,02	58,86±0,01	1,63±0,01
	GR-NB-IQ	155,43±0,03	100,28±0,02	24,96±0,03	58,79±0,01	1,60±0,02
	ELISA	155,12±0,43	99,12±0,23	25,00±0,67	58,00±0,98	1,62±0,22
2	GR-NB-IN	131,00±0,02	282,18±0,04	12,35±0,03	61,00±0,03	19,14±0,02
	GR-NB-IQ	132,00±0,07	282,00±0,03	12,00±0,04	61,20±0,01	19,19±0,01
	ELISA	132,12±0,54	281,97±0,87	11,97±0,65	60,87±0,32	18,97±0,44
3	GR-NB-IN	943,21±0,02	48,32±0,02	44,90±0,03	39,00±0,02	2,02±0,02
	GR-NB-IQ	945,45±0,04	48,15±0,03	44,80±0,01	38,24±0,01	1,97±0,02
	ELISA	945,99±0,43	48,00±0,76	44,12±0,54	38,00±0,65	1,95±0,33
4	GR-NB-IN	178,00±0,02	38,97±0,04	11,61±0,02	137,30±0,01	40,96±0,01
	GR-NB-IQ	178,15±0,02	41,40±0,03	11,21±0,04	136,95±0,03	40,18±0,02
	ELISA	177,00±0,33	38,00±0,27	11,50±0,97	136,00±0,55	39,00±0,65
5	GR-NB-IN	730,63±0,02	48,48±0,02	51,53±0,01	34,97±0,02	1,49±0,02
	GR-NB-IQ	731,28±0,02	48,56±0,08	51,48±0,04	34,15±0,01	1,67±0,01
	ELISA	730,00±0,32	48,00±0,28	52,40±0,75	34,00±0,58	1,50±0,22
6	GR-NB-IN	129,07±0,01	19,02±0,03	51,51±0,02	29,57±0,02	2,02±0,01
	GR-NB-IQ	129,28±0,03	18,18±0,03	51,20±0,01	29,14±0,02	1,97±0,03
	ELISA	129,00±0,54	17,33±0,38	51,00±0,39	29,00±0,27	2,00±0,25
7	GR-NB-IN	140,29±0,01	303,13±0,02	21,00±0,02	17,40±0,01	1,70±0,04
	GR-NB-IQ	141,00±0,02	302,97±0,04	20,20±0,02	17,17±0,04	1,79±0,02
	ELISA	140,00±0,55	302,00±0,48	20,25±0,30	17,90±0,38	1,70±0,22
8	GR-NB-IN	29,75±0,05	265,00±0,02	22,30±0,01	67,02±0,05	3,12±0,01
	GR-NB-IQ	29,00±0,02	263,63±0,04	22,19±0,07	67,00±0,04	3,42±0,02
	ELISA	29,00±0,43	262,90±0,76	22,00±0,55	66,76±0,50	4,00±0,53
9	GR-NB-IN	783,62±0,02	92,57±0,02	20,10±0,03	66,12±0,04	4,10±0,02

	GR-NB-IQ	784,02±0,03	92,20±0,03	22,03±0,02	67,00±0,02	4,20±0,01
	ELISA	784,00±0,25	92,00±0,57	20,00±0,39	67,40±0,70	3,80±0,43
10	GR-NB-IN	172,00±0,03	87,20±0,02	27,05±0,01	29,29±0,04	2,25±0,02
	GR-NB-IQ	172,04±0,04	88,05±0,02	27,93±0,02	29,54±0,03	2,32±0,03
	ELISA	171,60±0,55	87,50±0,54	27,00±0,87	29,00±0,27	2,00±0,32
11	GR-NB-IN	108,78±0,03	96,96±0,04	48,79±0,05	50,97±0,02	2,87±0,04
	GR-NB-IQ	109,32±0,04	96,12±0,02	48,56±0,03	52,51±0,03	2,98±0,01
	ELISA	108,00±0,33	96,00±0,30	48,00±0,44	50,15±0,28	2,68±0,53
12	GR-NB-IN	950,17±0,02	19,60±0,02	80,37±0,03	145,30±0,02	4,11±0,02
	GR-NB-IQ	948,78±0,03	19,32±0,03	79,98±0,02	144,97±0,02	4,12±0,03
	ELISA	948,00±0,55	19,20±0,38	79,00±0,57	144,00±0,48	4,25±0,27
13	GR-NB-IN	629,17±0,02	28,92±0,04	75,51±0,04	71,28±0,03	3,23±0,02
	GR-NB-IQ	629,49±0,02	29,15±0,04	75,15±0,03	71,03±0,04	3,21±0,01
	ELISA	630,00±0,68	28,50±0,50	75,00±0,20	72,00±0,54	3,50±0,30
14	GR-NB-IN	345,02±0,03	116,30±0,04	16,92±0,02	68,28±0,04	2,21±0,02
	GR-NB-IQ	345,15±0,02	117,17±0,03	16,84±0,03	68,30±0,02	2,19±0,03
	ELISA	345,00±0,70	116,00±0,43	16,00±0,28	68,00±0,29	2,10±0,54
15	GR-NB-IN	477,82±0,02	400,15±0,02	39,97±0,01	240,02±0,01	1,53±0,03
	GR-NB-IQ	477,03±0,04	400,11±0,02	39,40±0,02	239,42±0,02	1,50±0,02
	ELISA	477,50±0,60	400,00±0,28	39,00±0,28	239,40±0,38	1,50±0,17
16	GR-NB-IN	643,77±0,03	30,52±0,04	47,00±0,05	491,40±0,02	2,15±0,01
	GR-NB-IQ	640,27±0,05	31,24±0,04	47,15±0,02	491,92±0,02	2,15±0,07
	ELISA	640,00±0,28	30,30±0,53	47,00±0,21	490,90±0,86	2,00±0,26
17	GR-NB-IN	207,12±0,03	263,12±0,08	9,95±0,02	478,20±0,01	3,09±0,03
	GR-NB-IQ	207,93±0,01	263,01±0,06	10,13±0,03	478,00±0,02	3,05±0,04
	ELISA	207,00±0,65	262,80±0,43	10,00±0,28	477,75±0,60	3,00±0,38
18	GR-NB-IN	907,93±0,02	61,15±0,02	17,19±0,02	512,27±0,01	31,21±0,04
	GR-NB-IQ	906,95±0,04	61,20±0,04	17,20±0,01	512,04±0,02	30,94±0,02
	ELISA	906,00±0,49	61,00±0,54	17,00±0,29	512,25±0,37	30,60±0,20
19	GR-NB-IN	804,60±0,01	209,00±0,03	22,14±0,01	38,15±0,02	11,19±0,02
	GR-NB-IQ	803,92±0,03	210,21±0,01	22,09±0,02	38,83±0,03	11,92±0,03
	ELISA	803,00±0,43	208,95±0,21	22,00±0,27	38,20±0,65	11,00±0,27
20	GR-NB-IN	224,97±0,01	37,19±0,04	415,32±0,04	13,50±0,02	2,94±0,01

	GR-NB-IQ	225,07±0,02	37,37±0,02	414,14±0,03	13,13±0,04	2,95±0,03
	ELISA	224,25±0,28	37,00±0,27	413,20±0,54	13,00±0,28	2,55±0,78
Test t student pentru GR-NB-IN		1,87	1.19	1.23	2.01	1,98
Testul t student pentru GR-NB-IQ		1,77	1.09	1.14	2.16	2.03

Tabelul 4. Comparația datelor obținute folosind microsenzorii stocastici și kiturile ELISA pentru determinarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în urină (N=10).

Probă Nu.	Metoda bazata pe	MLH1, ng mL-1	MSH2, pg mL-1	MSH6, pg mL-1	PMS2, ng mL-1	KRAS, μg mL-1
1	GR-NB-IN	452,30±0,02	367,24±0,01	13,57±0,02	161,29±0,03	0,78±0,03
	GR-NB-IQ	453,01±0,03	367,47±0,03	13,14±0,02	161,32±0,02	0,78±0,01
	ELISA	452,00±0,21	366,80±0,38	13,20±0,54	161,37±0,54	0,70±0,15
2	GR-NB-IN	370,95±0,04	114,98±0,04	37,17±0,01	380,96±0,04	1,76±0,01
	GR-NB-IQ	370,14±0,02	115,08±0,01	37,21±0,02	380,65±0,02	1,74±0,03
	ELISA	368,90±0,76	115,45±0,55	36,90±0,85	380,00±0,22	1,69±0,50
3	GR-NB-IN	231,47±0,04	306,01±0,01	15,38±0,02	26,00±0,03	1,61±0,03
	GR-NB-IQ	232,10±0,05	305,87±0,02	15,36±0,03	26,32±0,01	1,64±0,01
	ELISA	230,90±0,80	305,70±0,75	15,30±0,29	27,00±0,40	1,60±0,25
4	GR-NB-IN	653,01±0,04	2293,04±0,01	20,80±0,02	118,00±0,03	32,95±0,03
	GR-NB-IQ	655,01±0,02	2293,00±0,03	20,03±0,03	118,30±0,01	33,00±0,01
	ELISA	655,00±0,50	2290,60±0,50	19,90±0,90	118,00±0,20	32,00±0,75
5	GR-NB-IN	655,03±0,01	1289,04±0,03	8,49±0,02	33,94±0,02	1,62±0,04
	GR-NB-IQ	655,00±0,02	1295,03±0,02	8,48±0,03	33,74±0,02	1,54±0,02
	ELISA	654,80±0,40	1290,00±0,40	8,50±0,21	33,00±0,75	1,50±0,21
6	GR-NB-IN	38,42±0,03	259,14±0,03	3,85±0,03	95,97±0,03	11,12±0,04
	GR-NB-IQ	38,80±0,02	260,32±0,02	3,80±0,01	95,79±0,02	11,48±0,03
	ELISA	37,90±0,26	258,90±0,43	3,80±0,20	95,00±0,24	11,50±0,20
7	GR-NB-IN	49,73±0,03	214,32±0,02	27,03±0,03	31,20±0,07	98,98±0,03
	GR-NB-IQ	50,02±0,04	214,12±0,02	27,14±0,02	31,13±0,03	98,14±0,01
	ELISA	50,00±0,21	213,70±0,05	27,20±0,30	31,78±0,70	99,17±0,30

8	GR-NB-IN	200,93±0,01	192,04±0,01	25,00±0,01	13,15±0,02	20,20±0,02
	GR-NB-IQ	201,00±0,02	192,30±0,04	25,84±0,03	13,90±0,03	19,18±0,03
	ELISA	200,26±0,43	192,00±0,23	25,07±0,54	13,00±0,38	18,97±0,21
9	GR-NB-IN	159,16±0,02	97,27±0,01	83,76±0,03	10,15±0,04	1,94±0,02
	GR-NB-IQ	158,95±0,03	96,95±0,02	83,14±0,01	9,97±0,05	1,92±0,01
	ELISA	158,06±0,54	96,89±0,32	82,78±0,76	9,85±0,23	1,90±0,21
10	GR-NB-IN	110,12±0,01	58,03±0,02	34,22±0,02	8,41±0,03	1,72±0,02
	GR-NB-IQ	110,34±0,02	58,40±0,01	34,18±0,01	8,41±0,02	1,81±0,08
	ELISA	110,05±0,23	57,92±0,43	34,98±0,45	7,54±0,21	1,70±0,34
11	GR-NB-IN	68,39±0,02	111,98±0,03	15,00±0,05	27,31±0,02	0,80±0,02
	GR-NB-IQ	68,40±0,03	112,12±0,02	15,15±0,04	27,30±0,01	0,78±0,01
	ELISA	68,00±0,56	112,89±0,45	15,20±0,23	26,90±0,56	0,70±0,13
12	GR-NB-IN	212,03±0,01	1146,12±0,02	29,30±0,02	179,95±0,02	3,71±0,02
	GR-NB-IQ	212,30±0,04	1146,03±0,02	30,92±0,03	179,19±0,02	3,53±0,01
	ELISA	212,67±0,65	1146,47±0,26	28,47±0,65	178,98±0,43	3,80±0,24
13	GR-NB-IN	31,09±0,03	314,99±0,03	18,12±0,02	241,75±0,01	18,03±0,02
	GR-NB-IQ	31,23±0,02	314,92±0,02	18,23±0,03	241,23±0,03	18,01±0,03
	ELISA	31,78±0,30	313,87±0,43	18,50±0,28	240,95±0,54	17,90±0,43
14	GR-NB-IN	92,48±0,03	20,05±0,08	40,99±0,01	75,32±0,02	5,62±0,02
	GR-NB-IQ	93,50±0,01	21,40±0,02	41,07±0,02	75,78±0,01	5,60±0,02
	ELISA	92,77±0,23	20,19±0,23	39,95±0,29	74,90±0,39	4,98±0,23
15	GR-NB-IN	84,03±0,04	7,30±0,02	31,42±0,05	2,32±0,05	6,01±0,02
	GR-NB-IQ	83,80±0,01	7,40±0,02	30,98±0,03	2,20±0,02	5,98±0,01
	ELISA	82,98±0,43	7,60±0,32	29,97±0,54	2,67±0,21	5,45±0,23
16	GR-NB-IN	102,14±0,03	5,60±0,01	785,03±0,05	47,00±0,03	3,94±0,02
	GR-NB-IQ	102,30±0,02	5,48±0,03	785,00±0,03	46,42±0,01	3,53±0,02
	ELISA	101,95±0,32	5,50±0,38	784,97±0,45	45,76±0,67	3,50±0,23
17	GR-NB-IN	70,83±0,03	183,15±0,02	21,52±0,03	616,71±0,02	2,33±0,01
	GR-NB-IQ	70,96±0,01	183,05±0,03	21,05±0,03	616,03±0,03	2,34±0,04
	ELISA	71,90±0,54	182,90±0,32	21,00±0,23	616,23±0,43	2,50±0,21
18	GR-NB-IN	492,95±0,02	911,05±0,01	59,78±0,02	36,80±0,01	16,06±0,02
	GR-NB-IQ	493,19±0,03	910,02±0,02	60,15±0,01	36,75±0,02	17,03±0,02
	ELISA	495,00±0,34	912,78±0,23	58,76±0,36	36,37±0,21	17,00±0,54

19	GR-NB-IN	29,03±0,03	18.30±0.02	16,28±0,02	18,12±0,01	6,01±0,01
	GR-NB-IQ	29,98±0,01	18,43±0,03	16,32±0,03	18,97±0,03	5,94±0,02
	ELISA	29,56±0,21	17,94±0,43	16,00±0,21	19,14±0,43	5,87±0,23
20	GR-NB-IN	81,97±0,03	136,98±0,04	36,02±0,01	94,38±0,03	3,40±0,01
	GR-NB-IQ	82,83±0,01	137,47±0,03	35,64±0,03	94,62±0,02	3,41±0,02
	ELISA	82,70±0,56	137,23±0,56	35,23±0,21	94,12±0,04	3,50±0,43
Test t student pentru GR-NB-IN		1.21	2.14	1,79	1,90	2.46
Testul t student pentru GR-NB-IQ		1,65	2.03	2.05	1,76	2.20

Tabelul 5. Comparația datelor obținute folosind microsenzorii stocastici și kiturile ELISA pentru determinarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în salivă (N=10).

Probă Nu.	Metoda bazata pe	MLH1, ng mL-1	MSH2, pg mL-1	MSH6, pg mL-1	PMS2, ng mL-1	KRAS, μg mL-1
1	GR-NB-IN	273,47±0,02	299,03±0,01	12,58±0,01	604,40±0,04	1,12±0,03
	GR-NB-IQ	272,97±0,03	299,00±0,02	12,47±0,03	604,02±0,03	1,13±0,01
	ELISA	272,76±0,34	298,65±0,46	12,35±0,34	603,98±0,32	1,10±0,32
2	GR-NB-IN	200,84±0,03	157,00±0,01	17,97±0,01	207,47±0,01	5,60±0,01
	GR-NB-IQ	200,94±0,02	157,12±0,03	18,50±0,03	207,93±0,02	5,40±0,02
	ELISA	200,52±0,43	156,21±0,43	18,20±0,76	207,00±0,21	6,02±0,32
3	GR-NB-IN	55,02±0,01	1750,43±0,03	9,15±0,01	20,47±0,02	12,47±0,03
	GR-NB-IQ	54,12±0,02	1751,23±0,02	9,28±0,03	20,48±0,03	12,31±0,01
	ELISA	54,45±0,21	1748,98±0,32	10,05±0,21	21,06±0,55	12,12±0,44
4	GR-NB-IN	100,87±0,02	268,43±0,03	18,84±0,01	12,94±0,01	4,32±0,02
	GR-NB-IQ	100,49±0,03	269,21±0,01	18,32±0,03	12,70±0,02	4,55±0,01
	ELISA	100,22±0,45	270,00±0,32	18,00±0,21	12,20±0,32	5,00±0,23
5	GR-NB-IN	143,97±0,02	217,32±0,03	23,97±0,03	13,51±0,01	16,23±0,01
	GR-NB-IQ	144,12±0,02	220,23±0,02	24,14±0,02	13,12±0,03	16,59±0,02
	ELISA	142,67±0,33	220,76±0,54	23,34±0,17	12,90±0,23	16,12±0,45
6	GR-NB-IN	181,14±0,03	281,94±0,01	12,13±0,01	35,51±0,01	32,00±0,01
	GR-NB-IQ	180,93±0,02	282,00±0,02	12,10±0,02	35,42±0,03	31,64±0,02

	ELISA	180,23±0,45	281,56±0,45	12,00±0,54	34,98±0,65	30,76±0,65
7	GR-NB-IN	158,43±0,02	855,43±0,02	34,00±0,02	690,57±0,01	1,98±0,02
	GR-NB-IQ	158,50±0,01	855,07±0,03	34,12±0,03	690,03±0,02	1,97±0,02
	ELISA	157,32±0,54	854,65±0,23	34,23±0,27	691,22±0,54	2,25±0,32
8	GR-NB-IN	668,00±0,02	142,03±0,02	15,17±0,04	30,02±0,08	2,03±0,01
	GR-NB-IQ	668,26±0,03	140,95±0,02	15,74±0,02	29,47±0,03	2,02±0,01
	ELISA	668,43±0,52	137,98±0,65	16,04±0,55	29,05±0,43	2,00±0,43
9	GR-NB-IN	814,93±0,02	131,20±0,07	21,04±0,02	18,03±0,02	5,09±0,01
	GR-NB-IQ	813,02±0,03	130,95±0,02	21,03±0,03	18,12±0,03	5,12±0,02
	ELISA	813,00±0,49	129,67±0,35	20,97±0,44	17,96±0,32	5,67±0,13
10	GR-NB-IN	110,93±0,01	1501,03±0,01	29,12±0,02	17,17±0,03	1,93±0,03
	GR-NB-IQ	110,48±0,03	1502,04±0,02	29,09±0,03	17,02±0,01	1,89±0,01
	ELISA	109,98±0,45	1503,03±0,76	28,97±0,34	16,94±0,43	1,70±0,23
11	GR-NB-IN	955,16±0,03	299,03±0,02	13,12±0,04	21,43±0,02	3,43±0,01
	GR-NB-IQ	955,32±0,01	298,96±0,01	13,70±0,02	21,15±0,03	3,50±0,02
	ELISA	954,98±0,44	298,20±0,34	13,56±0,45	20,67±0,56	4,02±0,23
12	GR-NB-IN	693,43±0,03	290,94±0,04	26,29±0,01	47,29±0,05	2,39±0,03
	GR-NB-IQ	694,00±0,02	291,90±0,03	26,17±0,03	47,15±0,03	2,40±0,02
	ELISA	693,96±0,54	290,45±0,55	27,99±0,43	47,20±0,24	2,78±0,43
13	GR-NB-IN	664,00±0,02	1798,02±0,01	18,60±0,01	72,95±0,01	16,16±0,03
	GR-NB-IQ	664,32±0,03	1798,21±0,03	18,18±0,02	73,12±0,03	16,28±0,02
	ELISA	664,87±0,58	1799,65±0,87	19,08±0,23	72,02±0,23	16,00±0,56
14	GR-NB-IN	297,14±0,01	1215,70±0,02	10,29±0,01	45,12±0,01	6,03±0,01
	GR-NB-IQ	297,13±0,02	1214,28±0,03	10,30±0,02	45,45±0,03	6,10±0,01
	ELISA	298,08±0,43	1215,66±0,56	9,89±0,38	45,34±0,65	7,04±0,55
15	GR-NB-IN	110,98±0,03	1346,87±0,01	30,02±0,01	37,00±0,01	8,92±0,03
	GR-NB-IQ	111,12±0,02	134,96±0,02	29,90±0,02	37,51±0,02	8,64±0,02
	ELISA	110,97±0,43	135,00±0,80	30,07±0,06	37,39±0,34	8,50±0,21
16	GR-NB-IN	104,07±0,02	150,13±0,04	61,32±0,02	17,25±0,05	1,30±0,01
	GR-NB-IQ	104,02±0,03	150,27±0,03	61,63±0,02	17,15±0,03	1,27±0,02
	ELISA	103,98±0,45	150,33±0,65	62,09±0,55	18,02±0,23	2,00±0,45
17	GR-NB-IN	59,87±0,01	235,20±0,01	22,35±0,05	5,98±0,08	2,21±0,04
	GR-NB-IQ	59,13±0,02	234,97±0,02	21,94±0,07	6,52±0,02	2,18±0,03

	ELISA	59,21±0,43	235,02±0,34	22,07±0,43	6,33±0,39	2,76±0,43
18	GR-NB-IN	32,14±0,02	431,27±0,01	10,47±0,03	3,31±0,03	2,37±0,01
	GR-NB-IQ	32,97±0,03	430,12±0,03	10,23±0,02	3,25±0,01	2,41±0,02
	ELISA	33,00±0,56	429,98±0,78	11,05±0,04	3,20±0,34	2,50±0,12
19	GR-NB-IN	82,28±0,02	273,40±0,01	5,20±0,01	12,90±0,01	3,43±0,01
	GR-NB-IQ	82,16±0,03	277,32±0,02	5,43±0,02	12,80±0,02	3,57±0,03
	ELISA	81,80±0,55	276,54±0,48	5,10±0,54	13,07±0,32	4,06±0,65
20	GR-NB-IN	800,10±0,03	373,21±0,01	181,02±0,04	11,11±0,02	10,32±0,01
	GR-NB-IQ	799,98±0,02	372,19±0,02	181,13±0,03	11,12±0,02	10,95±0,02
	ELISA	800,20±0,34	371,87±0,45	182,02±0,56	11,98±0,43	11,00±0,54
Test t student pentru GR-NB-IN		2.12	2.19	1,96	1,56	1,67
Testul t student pentru GR-NB-IQ		1,87	2.02	1,98	2.04	1,70

Tabelul 6. Comparația datelor obținute folosind microsenzorii stocastici și kiturile ELISA pentru determinarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în țesuturile tumorale (N=10).

Probă Nu.	Metoda bazata pe	MLH1, ng mL-1	MSH2, pg mL-1	MSH6, pg mL-1	PMS2, ng mL-1	KRAS, μg mL-1
1	GR-NB-IN	335,98±0,08	408,13±0,02	55,97±0,03	5,40±0,03	16,05±0,03
	GR-NB-IQ	336,48±0,02	407,93±0,02	55,98±0,02	5,47±0,02	16,14±0,02
	ELISA	335,22±0,43	407,20±0,54	56,32±0,54	5,40±0,23	16,00±0,22
2	GR-NB-IN	243,95±0,01	200,19±0,01	29,00±0,03	212,98±0,03	3,28±0,01
	GR-NB-IQ	248,00±0,02	198,35±0,01	29,18±0,01	213,58±0,03	3,25±0,01
	ELISA	247,90±0,65	198,20±0,58	28,85±0,34	212,50±0,56	3,20±0,29
3	GR-NB-IN	608,68±0,03	17,12±0,02	41,00±0,02	63,63±0,01	38,29±0,03
	GR-NB-IQ	609,84±0,02	17,84±0,02	40,58±0,03	63,60±0,01	38,17±0,01
	ELISA	609,25±0,44	17,00±0,58	40,20±0,87	64,00±0,54	38,55±0,32
4	GR-NB-IN	192,92±0,01	11,72±0,05	32,00±0,02	308,02±0,08	28,08±0,01
	GR-NB-IQ	192,37±0,02	11,68±0,04	32,91±0,03	309,10±0,04	28,12±0,03
	ELISA	192,50±0,22	11,00±0,65	32,00±0,78	308,10±0,44	28,00±0,54
5	GR-NB-IN	515,13±0,04	1131,84±0,03	51,94±0,02	20,97±0,05	16,70±0,02

	GR-NB-IQ	515,43±0,03	1131,97±0,01	52,42±0,01	21,20±0,05	16,30±0,04
	ELISA	515,20±0,70	1130,20±0,54	52,00±0,34	20,20±0,44	16,00±0,78
6	GR-NB-IN	28,93±0,04	17,98±0,02	12,49±0,01	41,02±0,04	35,70±0,02
	GR-NB-IQ	29,20±0,01	17,53±0,02	12,23±0,03	40,98±0,03	36,00±0,03
	ELISA	28,00±0,40	17,23±0,67	12,57±0,87	40,10±0,50	35,97±0,23
7	GR-NB-IN	171,04±0,04	14,94±0,03	13,93±0,03	60,34±0,02	46,23±0,02
	GR-NB-IQ	171,00±0,02	14,82±0,01	13,30±0,01	59,98±0,01	46,15±0,04
	ELISA	170,00±0,27	15,00±0,76	14,50±0,24	60,00±0,54	45,90±0,38
8	GR-NB-IN	92,40±0,03	14,87±0,03	99,87±0,03	1,05±0,02	5,69±0,01
	GR-NB-IQ	92,47±0,03	14,14±0,03	100,01±0,04	1,06±0,03	5,63±0,02
	ELISA	91,90±0,37	14,00±0,55	99,00±0,34	1,00±0,13	5,00±0,34
9	GR-NB-IN	119,57±0,02	24,07±0,01	62,95±0,01	190,27±0,02	2,21±0,01
	GR-NB-IQ	119,37±0,03	24,00±0,03	63,14±0,03	190,37±0,08	2,45±0,02
	ELISA	120,00±0,35	23,23±0,76	62,20±0,55	190,00±0,59	2,00±0,32
10	GR-NB-IN	27,00±0,01	194,37±0,08	17,03±0,01	1,71±0,03	1,70±0,02
	GR-NB-IQ	27,27±0,03	196,04±0,03	18,60±0,01	1,13±0,04	1,73±0,01
	ELISA	26,80±0,24	193,90±0,28	16,90±0,28	2,00±0,27	1,60±0,54
11	GR-NB-IN	85,47±0,02	1123,00±0,02	27,73±0,04	1,16±0,02	2,25±0,03
	GR-NB-IQ	86,00±0,04	1124,95±0,04	27,94±0,02	1,15±0,01	2,20±0,03
	ELISA	85,00±0,43	1125,04±0,43	27,00±0,21	1,20±0,20	2,00±0,44
12	GR-NB-IN	57,12±0,02	22,56±0,02	949,30±0,01	107,21±0,01	1,72±0,03
	GR-NB-IQ	57,03±0,03	22,39±0,03	947,93±0,03	106,96±0,02	1,71±0,02
	ELISA	56,32±0,87	22,78±0,43	946,20±0,28	105,99±0,43	1,60±0,43
13	GR-NB-IN	63,70±0,01	198,43±0,02	87,70±0,02	11,61±0,02	2,35±0,01
	GR-NB-IQ	63,43±0,04	199,03±0,01	87,73±0,01	11,58±0,02	2,38±0,01
	ELISA	63,50±0,40	198,21±0,43	86,60±0,43	11,00±0,21	2,00±0,20
14	GR-NB-IN	711,67±0,05	83,92±0,01	30,21±0,01	250,01±0,01	2,12±0,01
	GR-NB-IQ	711,93±0,02	83,50±0,02	29,50±0,03	249,09±0,01	2,11±0,01
	ELISA	711,00±0,32	83,00±0,54	29,40±0,65	248,00±0,20	2,50±0,32
15	GR-NB-IN	263,90±0,02	40,97±0,04	12,75±0,02	244,07±0,01	4,12±0,01
	GR-NB-IQ	264,05±0,01	40,95±0,03	11,19±0,04	244,95±0,03	4,10±0,04
	ELISA	263,00±0,23	39,80±0,25	11,20±0,28	243,55±0,43	4,00±0,26
16	GR-NB-IN	750,62±0,01	439,15±0,03	35,29±0,02	21,87±0,03	9,47±0,03

	GR-NB-IQ	750,94±0,03	439,24±0,01	35,43±0,03	21,92±0,03	9,42±0,03
	ELISA	748,20±0,32	438,20±0,23	34,70±0,21	22,00±0,43	9,20±0,23
17	GR-NB-IN	109,47±0,03	229,84±0,02	34,69±0,02	298,00±0,02	1,91±0,02
	GR-NB-IQ	109,10±0,02	229,61±0,01	34,68±0,03	298,98±0,01	1,89±0,02
	ELISA	109,23±0,43	229,00±0,29	34,21±0,49	297,54±0,28	1,52±0,21
18	GR-NB-IN	76,00±0,03	197,02±0,01	421,21±0,04	309,04±0,03	2,42±0,01
	GR-NB-IQ	76,43±0,03	197,98±0,03	420,98±0,03	309,10±0,02	2,40±0,02
	ELISA	75,07±0,38	196,98±0,42	420,00±0,43	308,75±0,21	2,20±0,15
19	GR-NB-IN	291,47±0,04	1173,29±0,03	34,22±0,03	85,64±0,04	2,34±0,01
	GR-NB-IQ	291,32±0,02	1172,98±0,02	31,86±0,04	83,24±0,02	2,31±0,02
	ELISA	290,98±0,34	1171,00±0,48	32,50±0,54	82,90±0,57	2,00±0,14
20	GR-NB-IN	107,98±0,02	914,37±0,08	782,93±0,02	104,14±0,08	3,39±0,01
	GR-NB-IQ	108,45±0,01	915,05±0,02	781,97±0,02	103,95±0,02	3,43±0,02
	ELISA	106,50±0,36	914,00±0,38	780,80±0,68	103,20±0,58	3,20±0,18
Test t student pentru GR-NB-IN		2.12	1,98	2.03	1.05	2.20
Testul t student pentru GR-NB-IQ		1.13	1,97	2.40	1,70	1,67

Testul t efectuat pentru fiecare dintre rezultatele obținute folosind fiecare dintre microsenzori versus ELISA, la un nivel de încredere de 99,00%, a arătat că nu există o diferență semnificativă între rezultatele obținute folosind microsenzorii stocastici și ELISA.

Prin compararea rezultatelor obținute în această lucrare cu rezultatele obținute anterior [23, 24] folosind senzori stocastici, intervalele de concentrație de lucru sunt mai largi, iar limitele de determinare sunt mult mai mici favorizând identificarea și cuantificarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, și KRAS în probele de sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral, într-un stadiu foarte incipient, exact când sunt eliberate în organism.

II. Senzori bazați pe NSB-EGR și FHD/FTEX pentru cuantificarea proteinelor MMR și KRAS

1. **Partea experimentală**

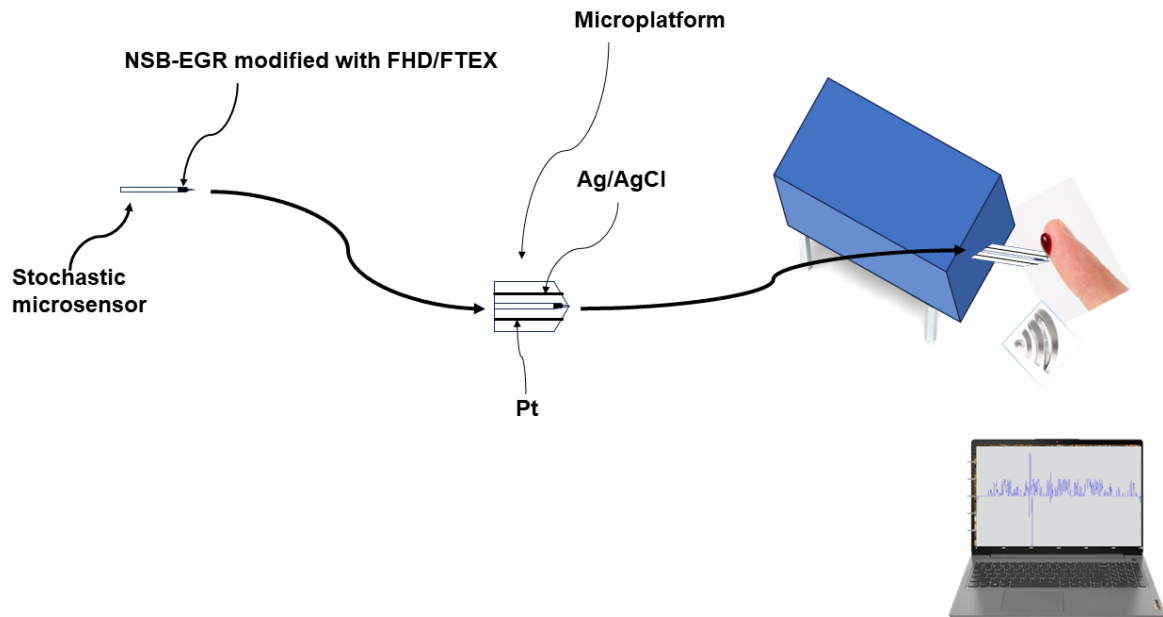
1.1. *Materiale și reactivi*

Frutafit HD și frutafit TEX au fost achiziționate de la Sensus (Roosendaal, Olanda). MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS au fost achiziționate de la Sigma Aldrich (Milwaukee, SUA); uleiul de parafină a fost achiziționat de la Fluka (Buchs, Elveția). Pentru prepararea tamponului fosfat s-au folosit fosfat monosodic și fosfat disodic, pH=7,5. Apa deionizată obținută dintr-un sistem Millipore Direct-Q 3 a fost utilizată pentru prepararea tuturor soluțiilor de la 10⁻²² la 10⁻² g mL⁻¹ ordin de mărime. Azot (9,3%) și Bor (2,4%) - grafen dopat (NB-DG) a fost furnizat de Institutul Național de Cercetare și Dezvoltare Tehnologii Izotopice și Moleculare, Cluj-Napoca, România în cadrul grantului Ministerului Cercetării, Inovării și Digitalizare, CNCS/CCCDI – UEFISCDI, număr proiect PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0006.

1.2. *Proiectarea microplatformelor combinate*

Proiectarea microsenzorilor stocastici: 50 μL de FHD și respectiv FTEX (10⁻³mol L⁻¹), fiecare au fost adăugate la 50 mg de pastă de grafen dopat (NSB-EGR) (obținută prin amestecarea pulberii NSB-EGR cu ulei de parafină). Fiecare dintre paste a fost plasată în minituburi imprimare 3D cu diametrul intern de 20μm; un fir de Ag a făcut legătura între pastă și circuitul extern.

Microsenzorul stocastic a fost integrat într-o microplatformă împreună cu contraelectrodul (sârmă de platină) și electrodul de referință (electrodul Ag/AgCl) (Schema 1).

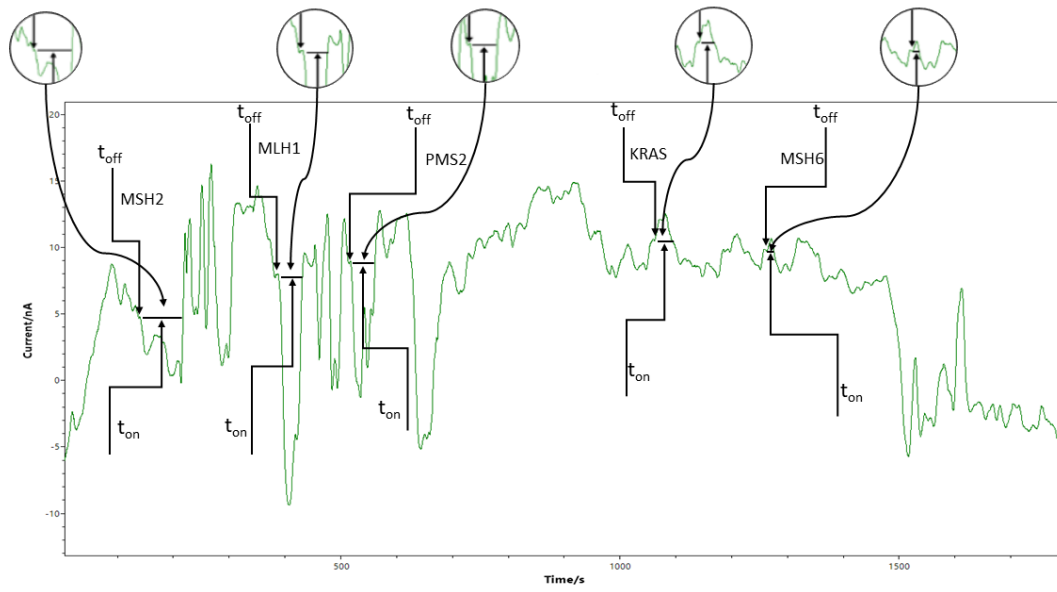


Schema 1. Proiectarea microsenzorului stocastic și a microplatformei de măsurare utilizate în analiza simultană a MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și a KRAS în sângele integral, urină, salivă și țesuturi tumorale.

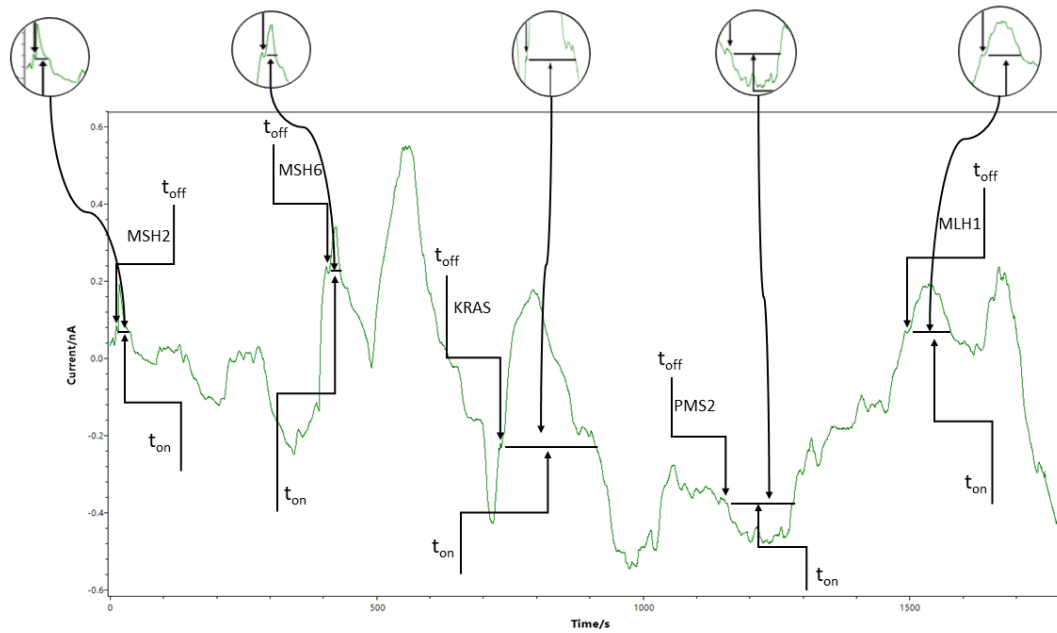
Înainte și după fiecare măsurătoare s-a efectuat curățarea cu apă deionizată și uscare moale cu hârtie adsorbantă. Când nu au fost folosite, microplatformele au fost păstrate la loc uscat, la temperatura camerei.

1.3. Metoda stocastică

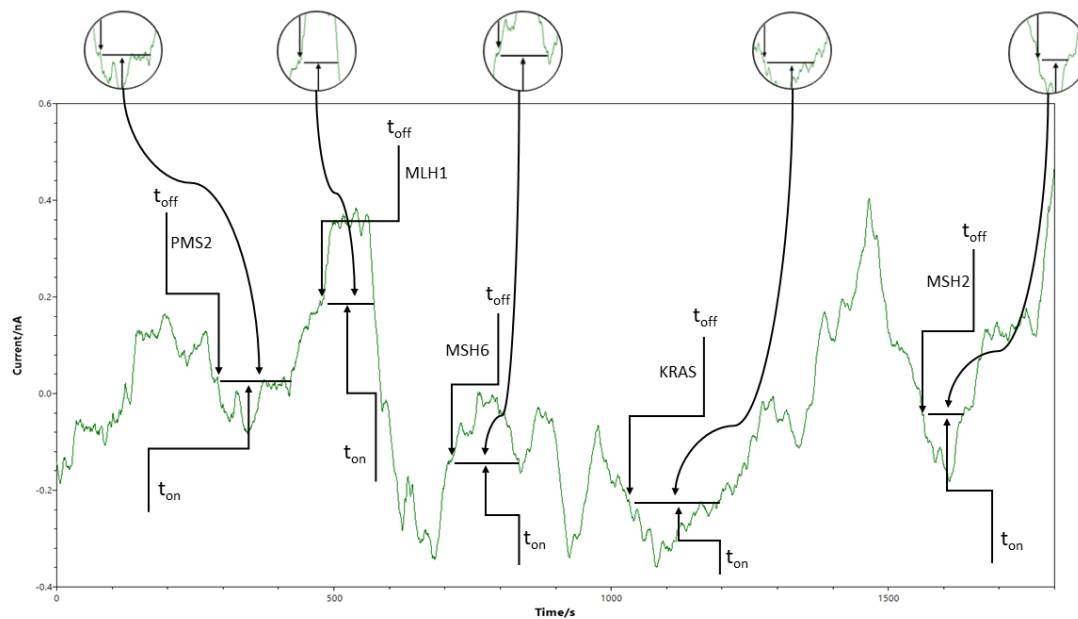
Cronoamperometria a fost folosită pentru toate măsurătorile. S-a aplicat un potențial de 125 mV față de Ag/AgCl și au fost înregistrate diagrame (Figurile 1 și 2). Semnăturile (valorile toff) ale MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS au fost identificate în diagrame și au servit ca elemente de recunoaștere pentru biomarkeri. Valorile tonelor servite pentru toate măsurătorile cantitative. Pentru calibrarea microplatformelor au fost utilizate serii de soluții de MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS (cu diferite concentrații). Ecuțiile de calibrare obținute pentru biomarkerii utilizând fiecare dintre cele două microplatforme s-au bazat pe determinarea valorii ton (citită între două valori consecutive de toff); Parametrii a , și b din ecuația de calibrare $1/\text{ton} = a + b \times \text{Conc. biomarker}$ au fost determinați folosind metoda regresiei liniare. Pentru screening-ul sângelui integral, urinei, salivei și țesutului tumoral, biomarkerii au fost recunoscuți pe baza semnăturii lor (valorile toff) (Figurile 1 și 2), valorile ton au fost citite și introduse în ecuația de calibrare pentru determinarea concentrația de MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în sângele integral, urină, salivă și țesutul tumoral.



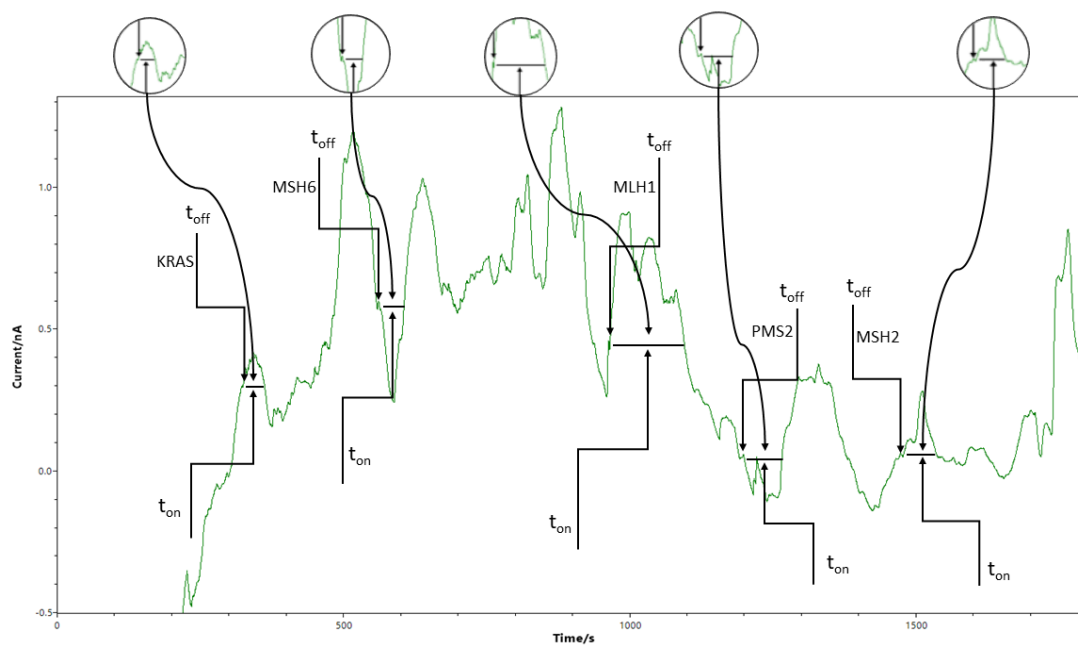
(A)



(b)

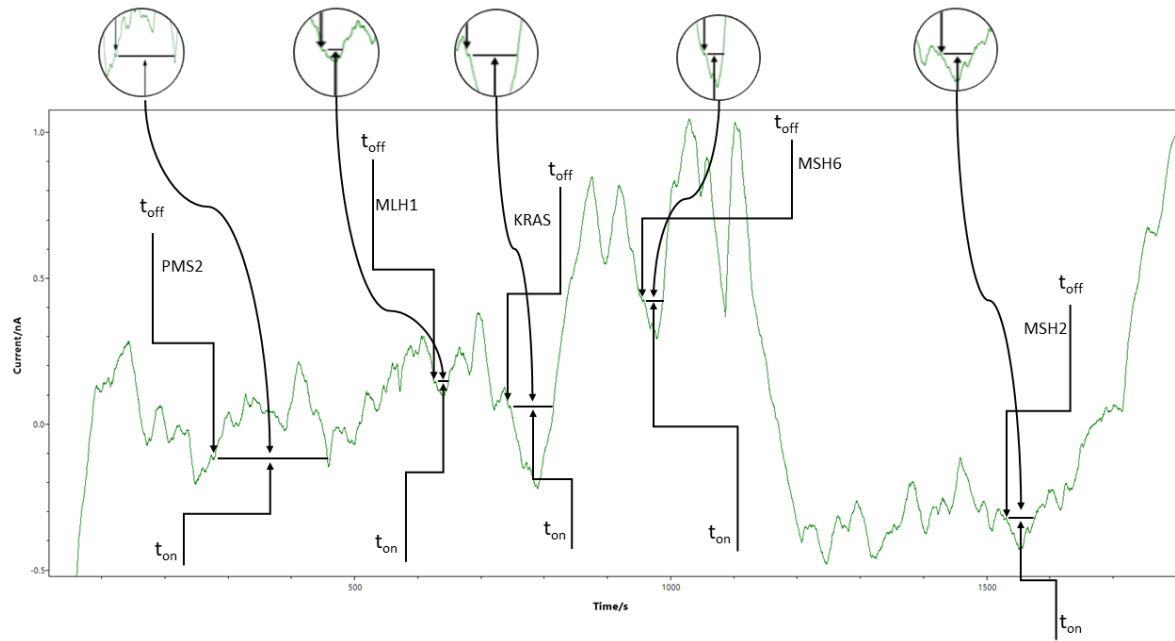


(c)

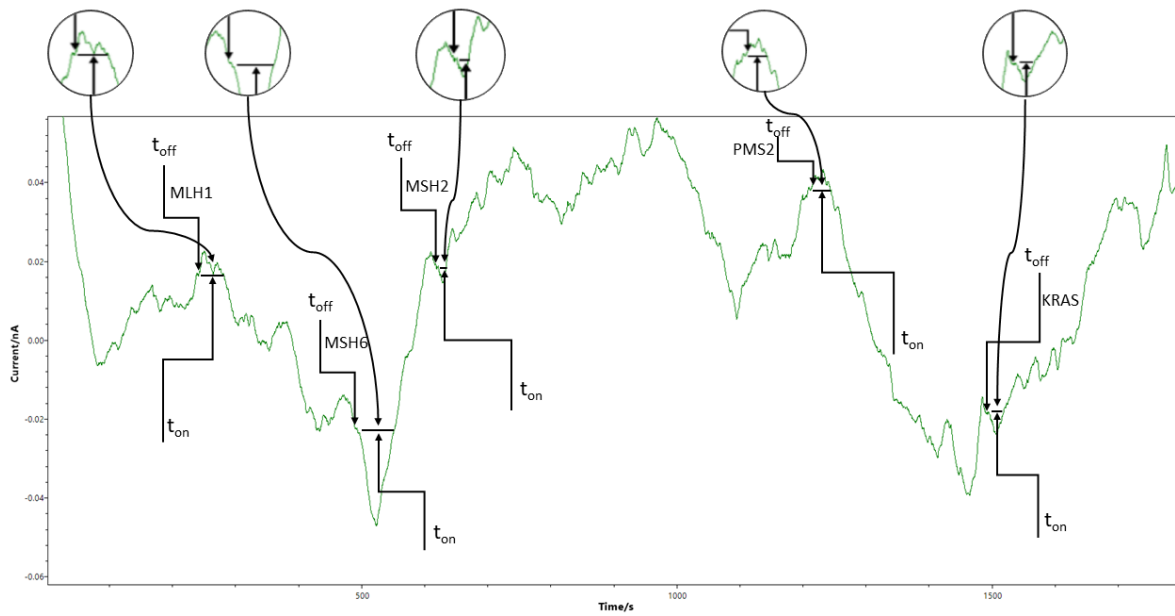


(d)

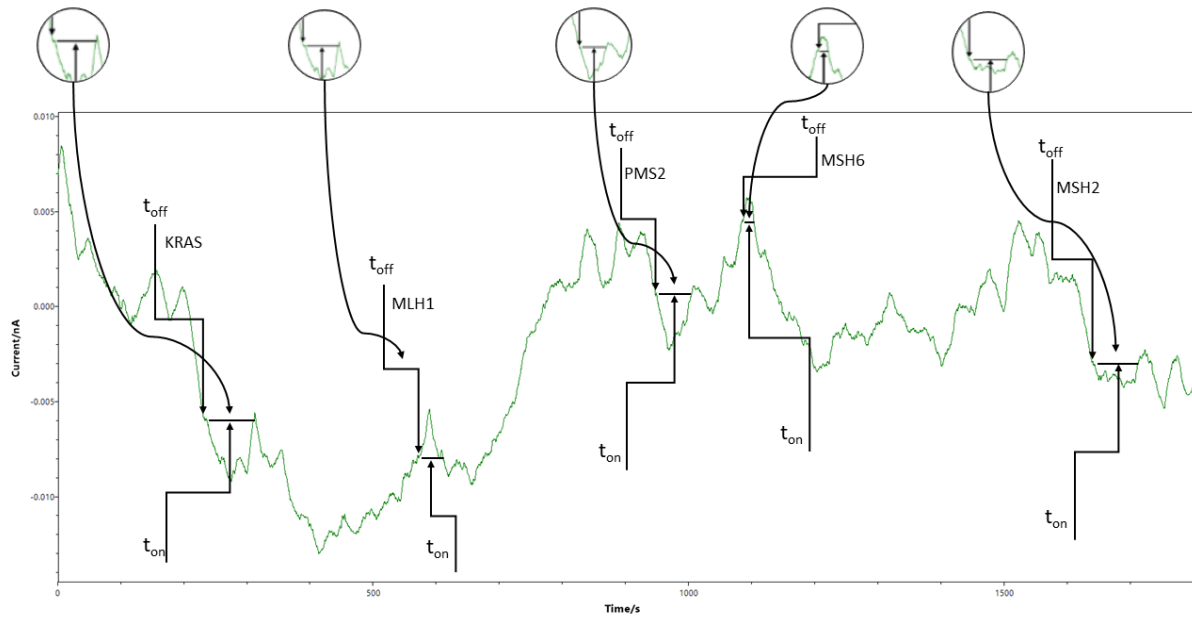
Figura 1. Diagrame tipice obținute prin screening (a) sânge integral, (b) saliva, (c) urină și (d) țesuturi tumorale cu microplataforma bazată pe FHD/NSB-EGR.



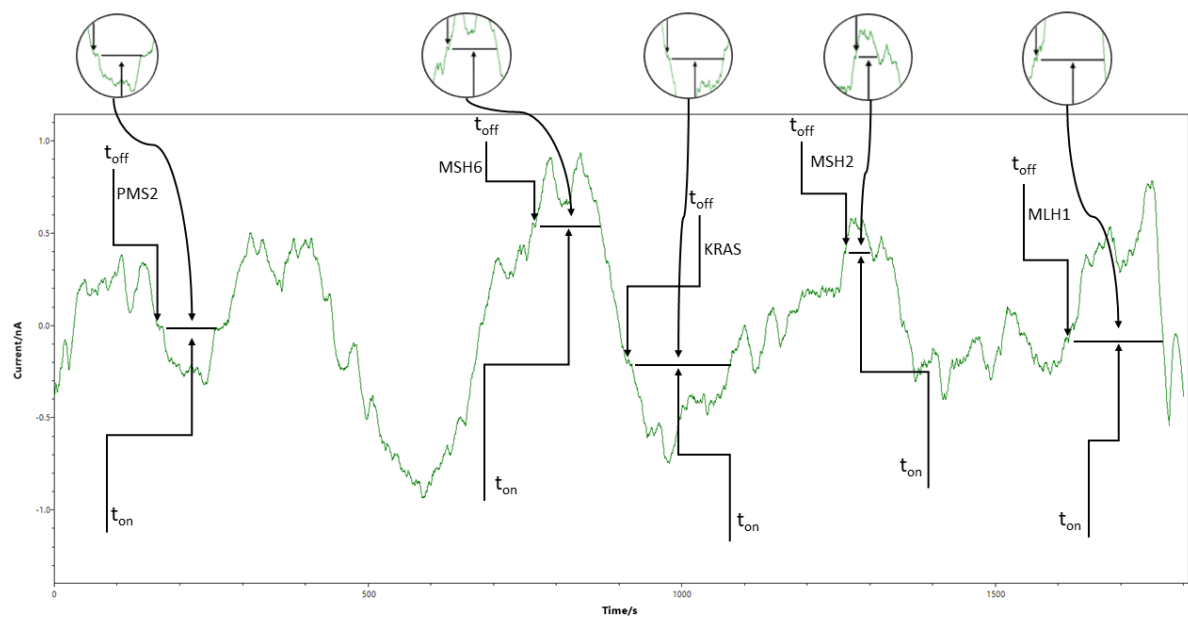
(A)



(b)



(c)



(d)

Figura 2. Diagrame tipice obținute prin screening (a) sânge integral, (b) saliva, (c) urină și (d) țesuturi tumorale cu microplataforma bazată pe FTEX/NSB-EGR.

2. Caracteristicile de răspuns ale microplatformelor combinate

Modul stocastic a fost aplicat pentru a determina toate caracteristicile de răspuns ale microplatformelor combinate propuse. Au fost obținute semnături diferite pentru MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS, atunci când a fost utilizată aceeași microplatformă, demonstrând că se poate realiza o recunoaștere moleculară fiabilă (Tabelul 1).

Caracteristicile de răspuns ale microplatformelor combinate propuse, cum ar fi sensibilitatea, intervalul de concentrație liniar, limita de determinare, au fost determinate pentru ambele microplatforme combinate (Tabelul 1). Limitele inferioare de determinare – de fg mL⁻¹ au fost obținute cu ajutorul microplatformelor combinate.

Pentru testarea MLH1, cea mai mare sensibilitate a fost înregistrată atunci când a fost utilizat FTEX în proiectarea microplatformei combinate, în timp ce cel mai larg interval de concentrație liniară a fost înregistrată atunci când a fost utilizată microplataforma combinată bazată pe FHD.

Pentru testarea MSH2, cea mai largă gamă de concentrații liniare a fost înregistrată atunci când a fost utilizată microplataforma combinată bazată pe FTEX, în timp ce limita cea mai inferioară de determinare și cea mai mare sensibilitate au fost înregistrate când microplataforma combinată bazată pe FHD a fost utilizată pentru testarea MSH2.

Cea mai joasă limită de determinare obținută pentru analiza MSH6, precum și cea mai largă gamă liniară de concentrație și cea mai mare sensibilitate au fost raportate pentru microplataforma combinată bazată pe FTEX.

Cel mai larg interval de concentrație liniară și cea mai mare sensibilitate pentru analiza PMS2 au fost obținute atunci când a fost utilizată microplataforma combinată bazată pe FHD.

Pentru testarea KRAS, cel mai larg interval de concentrație liniar a fost înregistrat când a fost utilizată microplataforma combinată bazată pe FHD, iar cea mai mare sensibilitate a fost obținută atunci când a fost utilizată microplataforma combinată bazată pe FTEX.

Tabelul 1.Caracteristicile de răspuns ale miniplatformelor utilizate pentru testarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS.

Microplatformă combinată bazată pe NSB-EGR și	Semnătură t_{off} (s)	Interval liniar de concentrație (g mL ⁻¹)	Ecuții de calibrare; coeficientul de corelare, r*	Sensibilitate (s ⁻¹ μg ⁻¹ ml)	LOQ (fg mL ⁻¹)
MLH1					
FHD	1.2	3.20×10 ⁻¹⁶ -3.20×10 ⁻⁵	1/t _{ton} =0.11+2.06×10 ⁻² ×C; r=0.9995	2.06×10 ⁻²	0.32
FTEX	2.1	3.20×10 ⁻¹⁵ -3.20×10 ⁻⁶	1/t _{ton} =0.05+1.03×10 ⁻¹ ×C; r=0.9902	1.03×10 ⁻¹	3.20
MSH2					
FHD	2.0	1.00×10 ⁻¹⁵ -1.00×10 ⁻⁹	1/t _{ton} =0.06+2.33×10 ² ×C; r=0.9994	2.33×10 ²	1.00
FTEX	1.1	1.00×10 ⁻¹⁴ -1.00×10 ⁻⁵	1/t _{ton} =0.10+37.56×C; -2r=0.9979	37.56	10.00
MSH6					
FHD	1.8	2.30×10 ⁻⁹ -2.30×10 ⁻⁵	1/t _{ton} =0.16+1.02×10 ⁻² ×C; r=0.9947	1.02×10 ⁻²	2.30×10 ⁶
FTEX	3.4	2.30×10 ⁻¹⁵ -2.30×10 ⁻⁶	1/t _{ton} =0.11+5.91×10 ⁻³ ×C; r=0.9907	5.91×10 ⁻³	2.30
PMS2					
FHD	1.4	2.70×10 ⁻¹⁵ -2.70×10 ⁻⁵	1/t _{ton} =0.15+1.71×10 ⁴ ×C; r=0.9996	1.71×10 ⁴	2.70
FTEX	2.5	2.70×10 ⁻¹⁵ -2.70×10 ⁻⁶	1/t _{ton} =0.09+2.00×10 ⁻² ×C; r=0.9949	2.00×10 ⁻²	2.70
KRAS					
FHD	1.6	2.20×10 ⁻¹⁵ -2.20×10 ⁻⁵	1/t _{ton} =0.06+9.50×10 ⁻³ ×C; r=0.9976	9.50×10 ⁻³	2.20
FTEX	1.3	2.20×10 ⁻¹⁵ -2.20×10 ⁻⁶	1/t _{ton} =0.13+2.89×10 ³ ×C; r=0.9967	2.89×10 ³	2.20

*<C> - concentrație = μg mL⁻¹; <t_{ton}> = s; LOQ - limită de cuantificare

Au fost efectuate studii de reproductibilitate și stabilitate pentru fiecare tip de microplatformă combinată. Zece microplatforme combinate bazate pe FHD și, respectiv, pe FTEX, au fost proiectate în conformitate cu procedura descrisă mai sus. Au fost efectuate măsurători ale sensibilităților pentru fiecare microplatformă combinată și au fost efectuate calcule de %, RSD. Valorile pentru %, RSD ale sensibilităților calculate au fost mai mici de 0,27% pentru microplatforma combinată bazată pe FHD, în timp ce atunci când a fost utilizat FTEX, au fost înregistrate valori RSD mai mici de 0,12%, dovedind reproductibilitatea designului microplatformelor combinate. Sensitivitățile celor 20 de microplatforme

combinat au fost verificate în continuare timp de 30 de zile pentru a stabili stabilitatea acestora în timp; pentru toate microplatformele combinate testate, %, valori RSD mai mici de 0,51% au fost înregistrate pe parcursul celor 30 de zile. Variația înregistrată pentru măsurătorile efectuate folosind ambele microplatforme atunci când sunt utilizate pentru testarea simultană a MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și a KRAS în probele de sânge integral, urină, salivă și țesut, nu a depășit 0,10.

3. Bioanaliza MMR: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS, folosind microplatforme combinate

Microplatformele combinate propuse au fost utilizate pentru bioanaliza a 300 de probe de sânge integral, salivă, urină și țesuturi tumorale de la pacienți confirmați cu cancer colorectal. Diagramele au fost înregistrate (Figurile 1 și 2) și utilizate pentru recunoașterea moleculară a MMR și KRAS, de asemenea, pe baza semnăturilor lor (valorile t_{off}). După identificarea fiecăruia dintre MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS, concentrația lor a fost determinată în mod corespunzător cu procedura descrisă în paragraful Metoda stocastică.

O corelație foarte bună între rezultatele obținute folosind microplatforma combinată bazată pe FHD și utilizarea microplatformei combinate bazată pe FTEX (Figura 3) s-a obținut pentru toate probele: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în sânge integral, salivă, urină și probe de țesut tumoral.

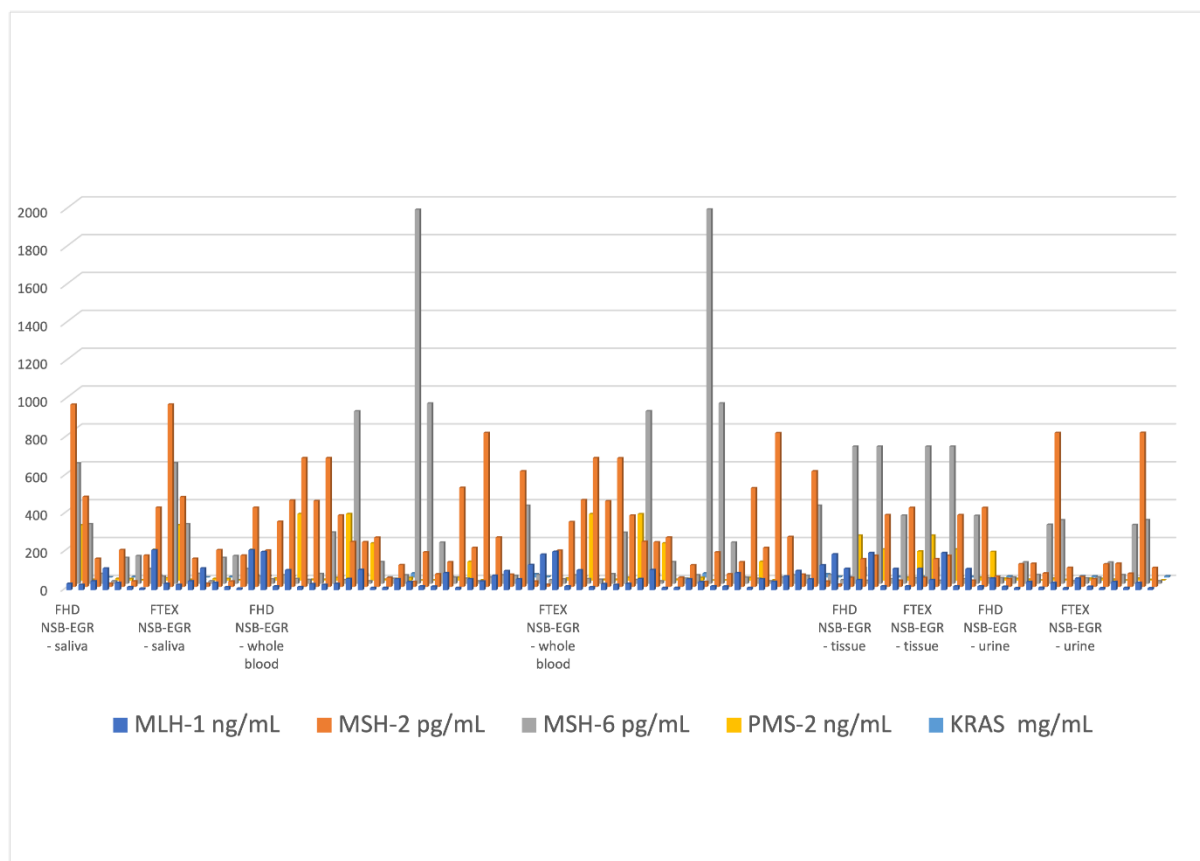


Figura 3. Determinarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în (a) sânge integral, (b) salivă, (c) urină și (d) probe de țesut tumoral utilizând microplatforme combinate bazate pe FHD/NSB-EGR și pe FTEX/NSB-EGR.

masa 2 Valorile medii %, RSD înregistrate pentru determinarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în probele biologice.

Microplatformă combinată bazată pe NSB-EGR și		%, RSD									
		FHD NSB-EGR					FTEX NSB-EGR				
Biomarker		MLH-1	MSH-2	MSH-6	PMS-2	KRAS	MLH-1	MSH-2	MSH-6	PMS-2	KRAS
Fluid biologic	Salivă	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03
	Sânge integral	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02
	Țesut	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02
	Urină	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02

Valorile %, RSD asociate cu Figura 3 sunt prezentate în Tabelul 2. Valorile determinate au arătat o reproductibilitate ridicată a măsurătorilor efectuate cu microplataforma combinată.

Testul t Student pereche a fost efectuat la un nivel de încredere de 99,00% pentru toți biomarkerii: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS. Valorile calculate pentru testul t au fost mai mici de 3,21 (valoarea tabelată la nivelul de încredere de 99,00% este 4,13), dovedind că nu există o diferență semnificativă între rezultatele obținute folosind cele două microplataforme combinate bazate pe FHD și pe FTEX. În afară de testul t, au fost efectuate teste de recuperare ale MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS pentru probe de sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral. A fost efectuată o examinare inițială pentru a determina cantitățile de MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS din sânge integral, salivă, urină și probe de țesut tumoral. Zece cantități diferite de MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS au fost adăugate la probele reale și au fost determinate concentrațiile finale. Cantitățile adăugate de MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în probele de sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral au fost comparate cu cantitățile găsite. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabel 2. Recuperarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS din sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral (N = 10).

Combi-nați microplataforma bazată pe NSB- EGR și	Recuperare, %				
	MLH-1	MSH-2	MSH-6	PMS-2	KRAS
	Sânge integral				
FHD	99,99±0,02	99,96±0,01	99,83±0,02	99,87±0,02	99,95±0,02
FTEX	99,95±0,03	99,47±0,01	99,91±0,01	99,87±0,03	99,96±0,02
	Salivă				
FHD	99,21±0,03	99,21±0,02	99,88±0,01	99,12±0,03	99,77±0,04
FTEX	99,77±0,05	99,30±0,01	99,90±0,02	95,43±0,04	99,43±0,02
	Urină				
FHD	99,00±0,02	99,20±0,04	99,11±0,02	99,12±0,02	99,18±0,04
FTEX	99,11±0,04	99,22±0,02	99,05±0,01	99,08±0,03	99,21±0,02
	Țesut tumoral				
FHD	98,90±0,03	98,60±0,03	98,77±0,02	98,90±0,03	98,73±0,01
FTEX	99,00±0,02	98,75±0,04	98,97±0,01	99,00±0,02	98,78±0,02

Testele de recuperare efectuate arată valori mari pentru recuperări (toate mai mari de 98,50%) cu RSD (%) foarte scăzută, mai mici de 0,06%, când au fost efectuate 10 măsurători. În consecință, au fost obținute o acuratețe și precizie ridicate atunci când microplatformele combinate propuse au fost utilizate pentru bioanaliza probelor.

Comparativ cu rezultatele obținute pentru testarea KRAS și MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, [25, 26] folosind senzori stocastici, intervalele de concentrație de lucru sunt mai largi, iar limitele de determinare sunt mult mai mici, favorizând identificarea și cuantificarea MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 și KRAS în probele de sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral, într-un stadiu foarte incipient al cancerului de colon.

III. Senzori stocastici pentru cuantificarea catepsinei B, catepsinei D și proteinei p53

1. Partea experimentală

1.1. Reactivi și materiale

Cathepsine B, D, proteina p53, Mn(OAP)Cl, nanopulbere de diamant și soluția tampon (pH=7,50) au fost cumpărate de la Sigma-Aldrich, în timp ce uleiul de parafină a fost cumpărat de la Fluka. Nanopulbere de grafen a fost achiziționată de la SkySpring Nanomaterials, Inc., Houston, SUA. Pentru toate preparatele soluțiilor a fost folosită apă deionizată. Soluții de catepsină B, catepsină D și p53 având concentrații diferite au fost obținute folosind metoda diluției în serie.

1.2. Construcția microsenzorilor stocastici

Pentru a forma o pastă omogenă, uleiul de parafină a fost adăugat la nanopulberea de diamant. La pasta de diamant omogenă s-a adăugat o soluție de 1×10^{-3} mol L⁻¹ Mn(OAP)Cl într-un raport de 1:1 (w:V; mg:μL) pentru a da pasta modificată pentru construcția Microsenzor stocastic Mn(OAP)Cl/nDP.

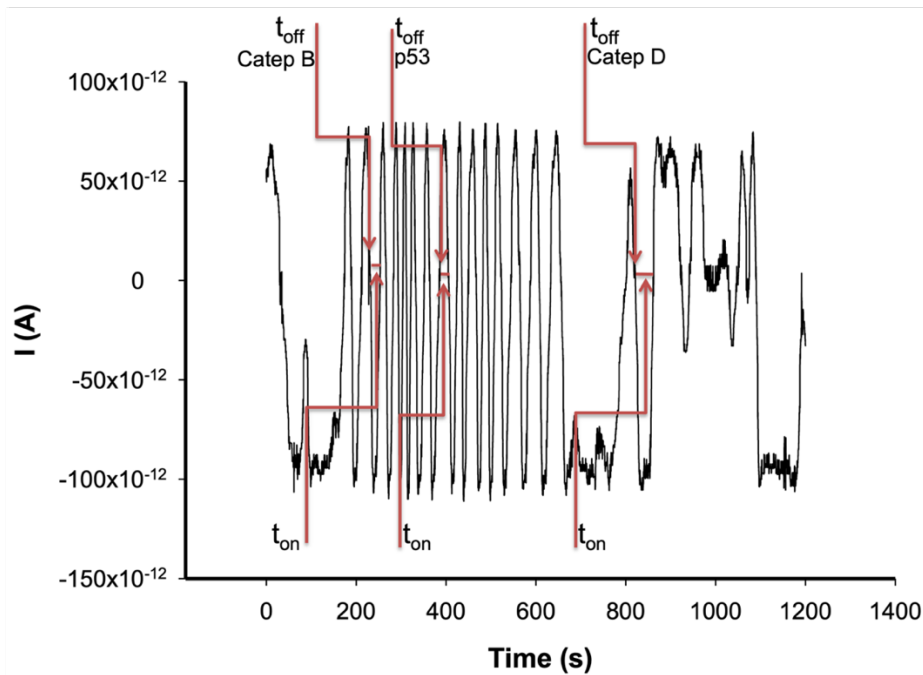
Pentru construirea microsenzorului stocastic Mn(OAP)Cl/nGR, ulei de parafină a fost adăugat la nanopulberea de grafen pentru a forma o pastă omogenă de grafen. La grafenul omogen lipiți o soluție de Mn(OAP)Cl (1×10^{-3} mol L⁻¹) a fost adăugat la pasta omogenă într-un raport de 1:1 (w:V; mg:μL) pentru a obține partea activă a Mn(OAP)Cl /nGR microsenzor stocastic.

O imprimantă 3D a fost folosită pentru a obține microtuburi 3D din plastic. Aceste paste au fost plasate în microtuburi imprimate. Un fir de Ag a fost folosit ca contact între pasta modificată și circuitul extern. Senzorii au fost depozitați în locuri întunecate, la temperatura camerei.

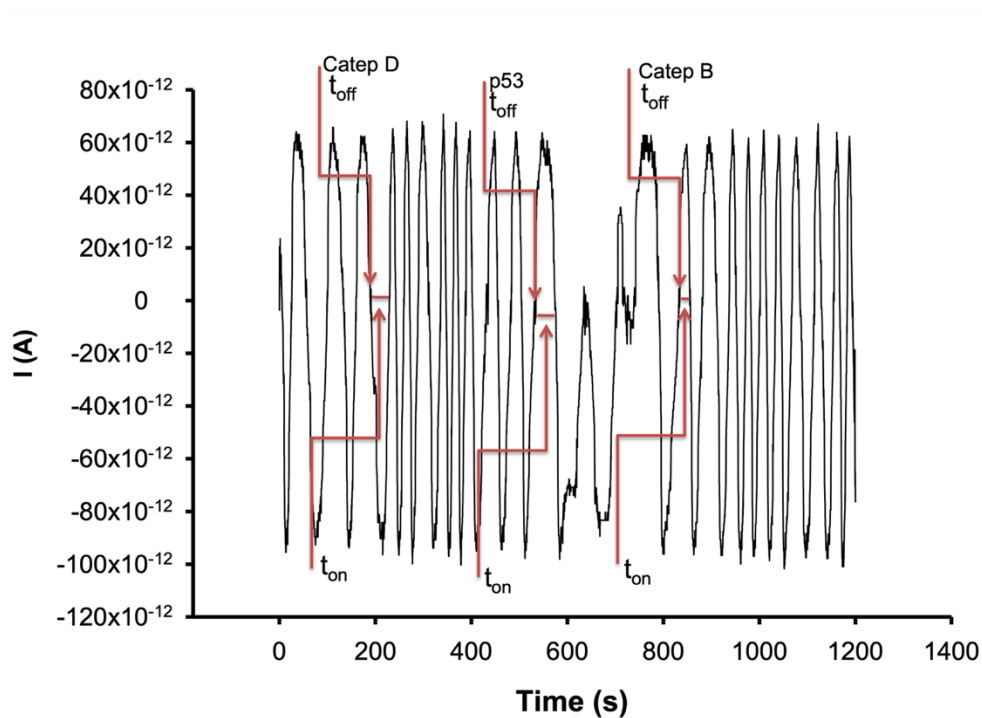
1.3. Metoda stocastică

Când se aplică potențialul de 125 mV vs Ag/AgCl (tehnica cronoamperometrică), variația curentului va da valori de t_{off} cunoscute sub numele de semnături ale analitului - deoarece acestea apar atunci când biomarkerii intră în canal (curent scade la zero), blocându-l până când molecula intră înăuntru, iar acestea sunt specifice fiecărui biomarker; valorile tonelor sunt măsurate în timpul celei de-a doua etape, când biomarkerul suferă procese de legare și redox în interiorul canalului (valoarea sa este măsurată între două valori t_{off}) (Figurile 1 și 2). În consecință, semnătura (valoarea t_{off}) este un parametru calitativ utilizat în recunoașterea moleculară și diferențierea biomarkerilor, în timp ce valoarea tonei este un parametru de cuantificare, utilizat pentru determinarea concentrațiilor biomarkerilor, în conformitate cu ecuația: $1/tonă. = a + b \times C_{biomarker}$, unde $C_{biomarker}$ este concentrația

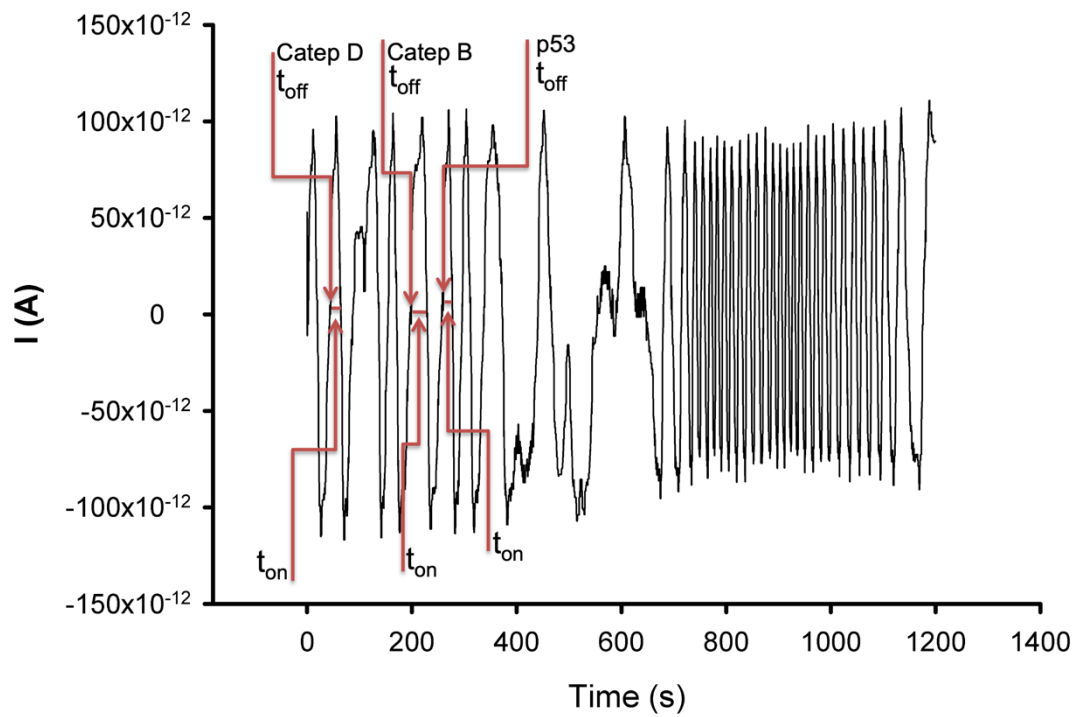
biomarkerului. Parametrii ecuațiilor de calibrare pentru fiecare biomarker, folosind cei doi microsenzori stocastici bazați pe $Mn(OAP)Cl/nDP$ și pe $Mn(OAP)Cl/nGr$ au fost obținute prin metoda regresiei liniare. Concentrațiile necunoscute ale biomarkerilor au fost obținute prin inserarea valorilor tonelor obținute din diagrame (Figurile 1 și 2) în ecuațiile de calibrare ale fiecărui microsenzor, pentru fiecare dintre biomarkeri.



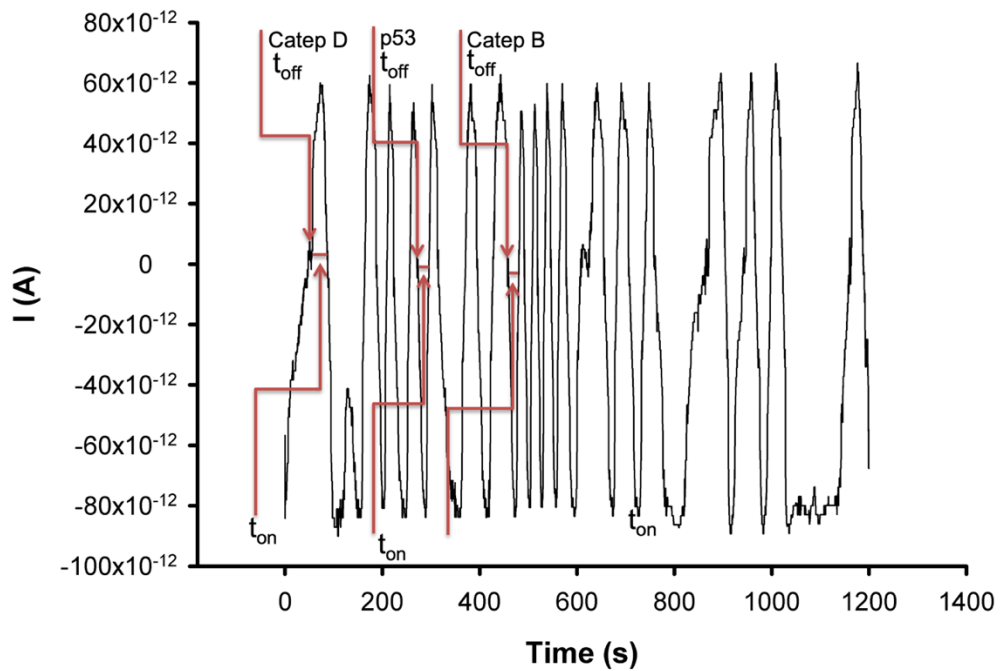
a)



b)

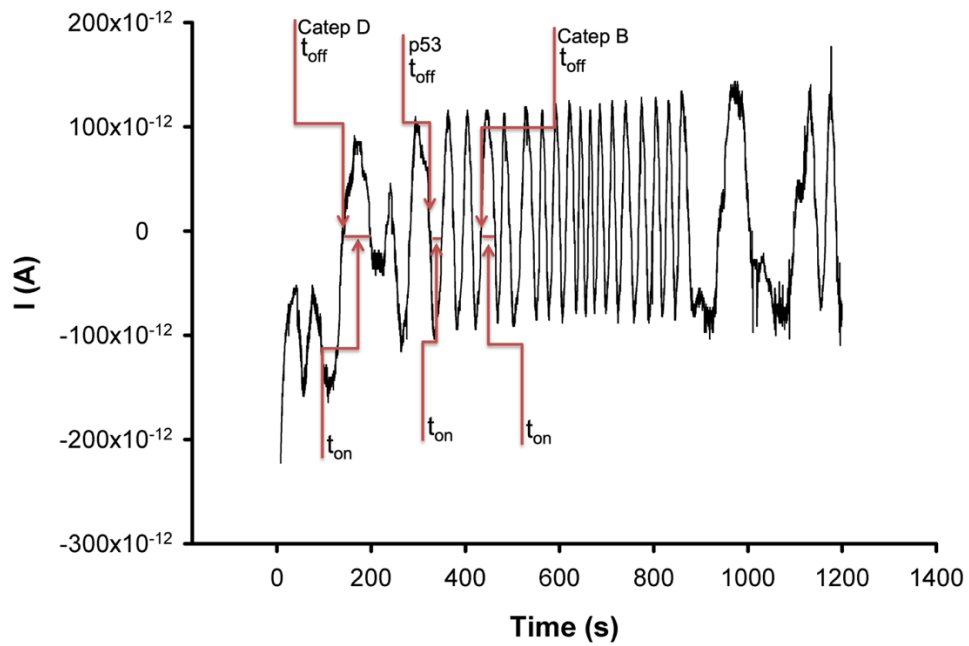


c)

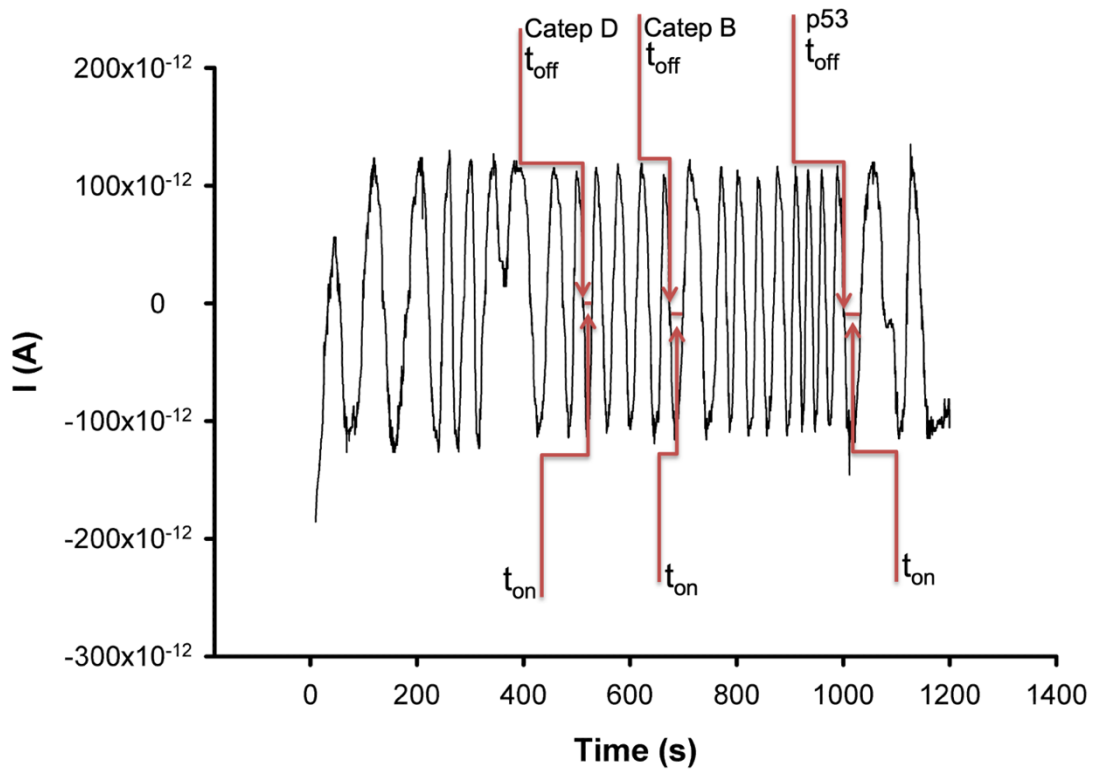


d)

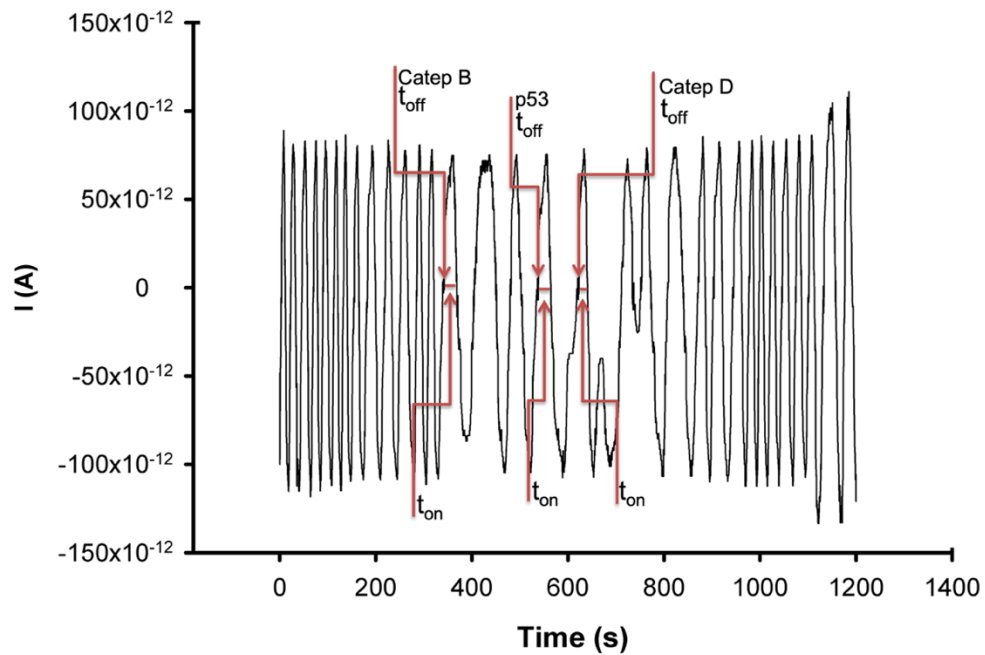
Figura 1. Diagrame obținute pentru screening, folosind microsenzori stocastici bazați pe Mn(OAP)Cl/nDP, a (a) salivei, (b) sângelui integral, (c) țesutului tumoral și (d) urinei.



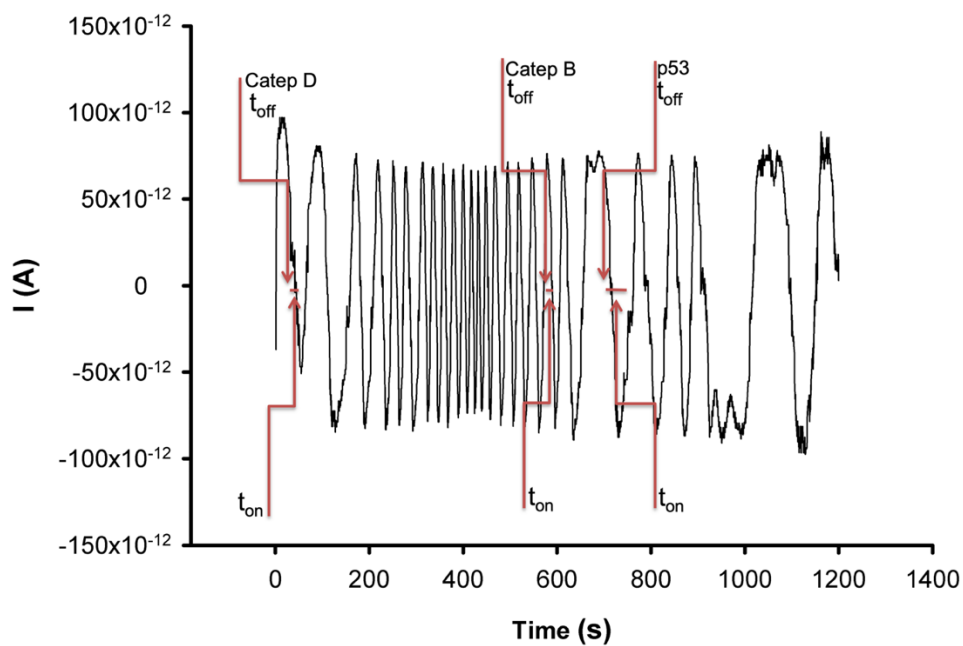
A)



b)



c)



d)

Figura 2. Diagrame obținute pentru screening, folosind microsenzorii stocastici bazați pe Mn(OAP)Cl/nGr, a (a) saliva, (b) sângelui integral, (c) țesutului tumoral și (d) urinei cu microsenzorul stocastic bazat pe Mn(OAP)Cl/nGr.

2. Rezultate și discuții

2.1. Morfologia suprafețelor active ale microsenzorilor stocastici

Figura 3 prezintă analiza calitativă obținută prin microscopia electronică cu scanare. După cum se poate observa din Figura 3 (a), analiza morfologică arată că materialul este omogen în cazul pastei pe bază de pulbere de nanodiamond (nDP). În cazul utilizării pastei pe bază de pulbere de nanografen (nGr), se poate observa că aceasta conține goluri extinse între foile de grafen.

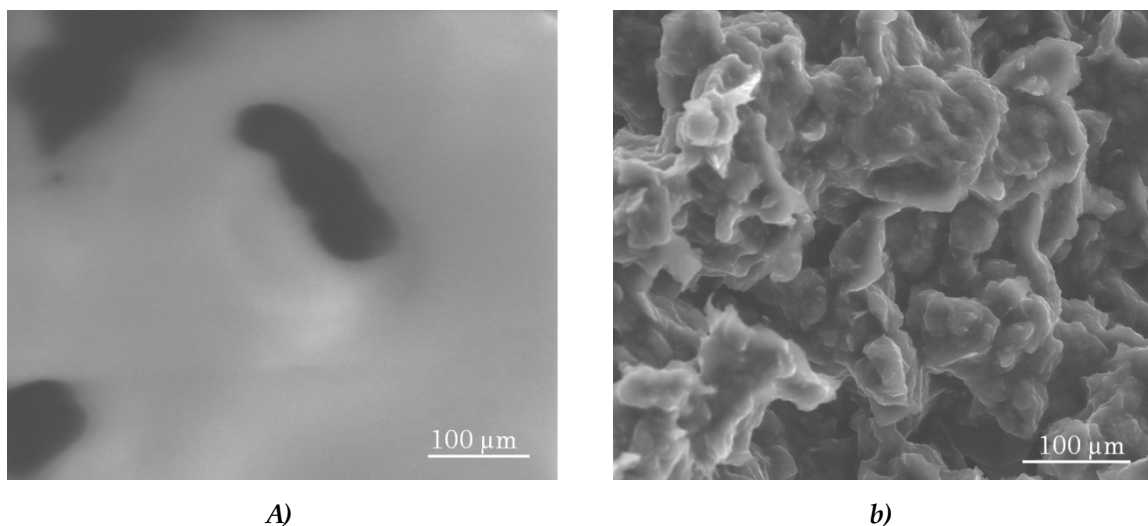


Figura 3. Imagini SEM pentru suprafața activă a (a) Mn(OAP)Cl/nDP și a Mn(OAP)Cl/nGr.

De asemenea, în ambele imagini se observă canalele – necesare pentru obținerea semnalului stocastic.

2.2. Caracteristicile de răspuns ale celor doi microsenzori stocastici utilizați pentru testarea p53, catepsina B și catepsina D

Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici utilizați pentru determinarea simultană a catepsinei B, catepsinei D și p53.

Microsenzor stocastic	Biomarker	Semnătură t_{off} (s)	Ecuția de calibrare*, r	Sensibilitate s-1 g-1 ml	Limita de cuantificare (g ml-1)	Interval liniar de concentrație (g ml-1)
Mn(OAP)Cl/nDP	Cathepsin B	1.0	$1/t_{on}=0.04+2.50 \times 10^4 C$ $r=0.9999$	2.50×10^4	7.00×10^{-15}	7.00×10^{-15} - 7.00×10^{-6}
	Cathepsin D	1.8	$1/t_{on}=0.03+5.99 \times 10^3 C$ $r=0.9943$	5.99×10^3	2.50×10^{-15}	2.50×10^{-15} - 2.50×10^{-6}

	p53	1.6	$1/t_{on}=0.05+1.95 \times 10^4 C$ $r=0.9971$	1.95×10^4	2.56×10^{-12}	2.56×10^{-12} - 5.00×10^{-6}
Mn(OAP)Cl/nGr	Cathepsin B	1.4	$1/t_{on}=0.07+2.35 \times 10^4 C$ $r=0.9898$	2.35×10^4	7.00×10^{-15}	7.00×10^{-15} - 7.00×10^{-15}
	Cathepsin D	1.0	$1/t_{on}=0.07+2.76 \times 10^6 C$ $r=0.9936$	2.76×10^6	2.50×10^{-13}	2.50×10^{-13} - 2.50×10^{-8}
	p53	1.8	$1/t_{on}=0.03+7.94 \times 10^4 C$ $r=0.9955$	7.94×10^4	1.28×10^{-11}	1.28×10^{-11} - 1.00×10^{-6}

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

Au fost înregistrate valori diferite pentru semnături pentru cei trei biomarkeri atunci când a fost utilizat același microsenzor, dovedind că recunoașterea moleculară și diferențierea catepsinei D, catepsinei B și p53 pot fi efectuate folosind cei doi microsenzori stocastici. Au fost obținute limite de determinare foarte scăzute (cea mai mică concentrație din intervalul de concentrație liniară): pentru analiza catepsinei B s-a obținut un ordin de mărime de fg mL⁻¹, pentru analiza catepsinei D, ordinul de magnitudine cel mai mic (fg mL⁻¹) a fost obținut atunci când microsenzorul bazat pe Mn(OAP)Cl/nDP s-a folosit, în timp ce limita inferioară de determinare pentru analiza p53 a fost de pg mL⁻¹, când microsenzorul se bazează pe Mn(OAP)Cl/nDP. În timp ce pentru testarea catepsinei D și p53 nu a fost determinată nicio diferență în ordinea mărimii pentru sensibilitatea celor doi microsenzori, pentru analiza catepsinei D, cea mai mare sensibilitate a fost obținută utilizând senzorul bazat pe Mn(OAP)Cl/nGr.

Au fost efectuate studii de reproductibilitate și stabilitate pentru fiecare microsenzor stocastic. În acest sens, zece microsenzori stocastici de fiecare tip au fost proiectați corespunzător cu metoda descrisă mai sus, iar valorile sensibilităților au fost înregistrate și comparate timp de 30 de zile. Pentru reproductibilitatea designului, în comparație pentru fiecare tip de microsenzori, sensibilitățile, au fost următoarele %, RSD obținute: 0,06% pentru microsenzorul stocastic bazat pe Mn(OAP)Cl/nDP și 0,10% pentru microsenzor. pe baza Mn(OAP)Cl/nGr, sensibilitățile fiind măsurate pentru fiecare dintre microsenzori imediat după prepararea pastei modificate. Valorile obținute au confirmat reproductibilitatea designului celor două tipuri de microsenzori stocastici.

Pentru determinarea stabilității lor în timp, determinarea sensibilității pentru toți microsenzorii a fost efectuată în fiecare zi. Pentru microsenzorii stocastici pe bază de Mn(OAP)Cl/nDP, valorile %, RSD obținute au fost de 0,13%, în timp ce pentru microsenzorii stocastici pe bază de Mn(OAP)Cl/nGr s-a determinat o valoare de 0,11%. Aceste rezultate au demonstrat o bună stabilitate în timp a pastelor modificate și a microsenzorilor stocastici.

Valorilor semnăturilor biomarkerilor/substanțelor din probele biologice li se acordă selectivitatea microsenzorilor stocastici; diferențele dintre semnături au dovedit selectivitatea acestora. Au fost verificate selectivitatea față de CEA, CA72-4, leucină, serină, glutamina; toate semnăturile obținute

pentru aceste substanțe au fost diferite unele de altele și mai mari de 2,0, dovedind selectivitatea microsenzorilor stocastici propuși.

3. Recunoașterea moleculară, diferențierea și cuantificarea catepsinei B, catepsinei D și p53 în probele biologice

Modul stocastic descris mai sus a fost utilizat pentru recunoașterea moleculară și cuantificarea celor trei biomarkeri. Sângele integral, saliva, urină și țesuturile tumorale de la pacienții confirmați cu cancer colorectal/gastric au fost examinate fără nicio prelucrare și au fost analizate diagrame (Figurile 1 și 2). Metoda standard de adăugare - când s-au adăugat cantități cunoscute de catepsină B, catepsină D și p53 la cele patru tipuri de probe biologice și metoda de comparare urmată de o analiză student-t-test când au fost comparate rezultatele obținute folosind cei doi microsenzori stocastici, au fost utilizați pentru validarea microsenzorilor stocastici propuși.

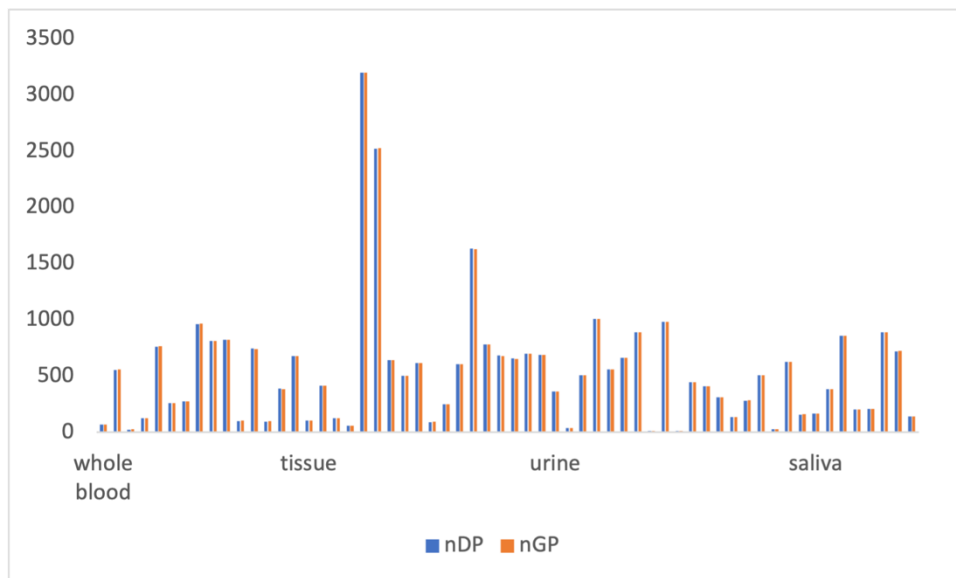
Pentru metoda de adăugare standard, determinarea catepsinei B, catepsinei D și p53 au fost efectuate înainte și după adăugarea cantităților cunoscute din fiecare dintre biomarkeri în sângele integral, urină, salivă și țesutul tumoral; cantitățile determinate de biomarkeri obținuți după adăugarea unor cantități cunoscute de biomarkeri au fost comparate cu cantitatea inițială găsită în probele biologice (Tabelul 2).

Masa 2.Recuperarea catepsinei B, catepsinei D și p53 din sânge integral, salivă, urină și probe de țesut tumoral (N = 10).

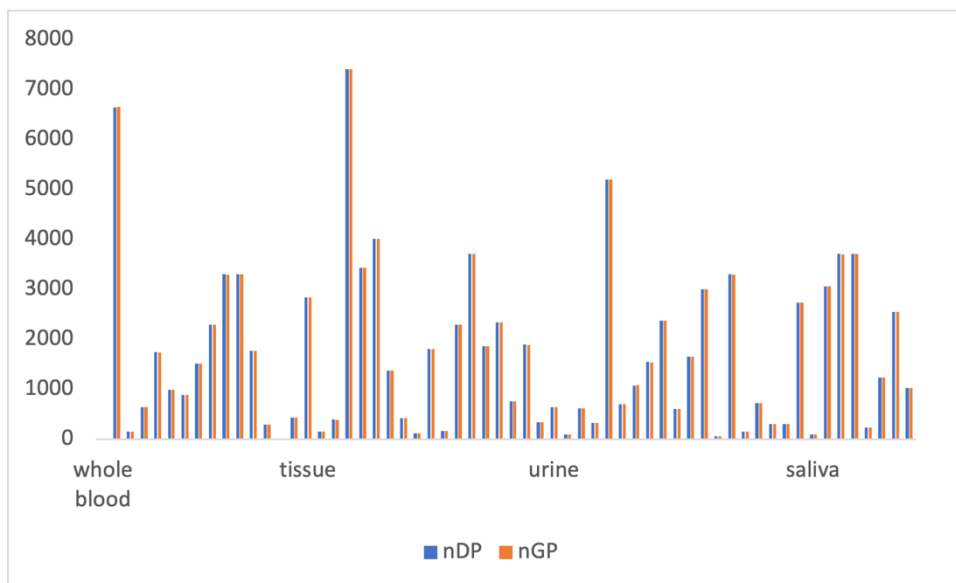
Microsenzori stocastici	Recuperare, %		
	Cathepsin B	Cathepsin D	P53
Tot sângele			
Mn(OAP)CI/nDP	99,14±0,01	99,97±0,01	99,95±0,02
Mn(OAP)CI/nGr	99,23±0,02	99,96±0,03	99,99±0,01
Salivă			
Mn(OAP)CI/nDP	99,54±0,04	99,88±0,02	99,47±0,02
Mn(OAP)CI/nGr	99,11±0,08	99,76±0,03	99,97±0,05
Urină			
Mn(OAP)CI/nDP	98,95±0,03	99,15±0,04	99,23±0,04
Mn(OAP)CI/nGr	99,06±0,05	98,99±0,03	99,14±0,07
Țesut tumoral			
Mn(OAP)CI/nDP	98,47±0,06	98,12±0,02	99,00±0,04
Mn(OAP)CI/nGr	98,98±0,08	98,21±0,03	98,99±0,03

Testele de recuperare efectuate arată că biomarkerii: catepsina D și B, precum și p53, pot fi determinați cu precizie în probele biologice: sânge integral, saliva, urină și țesuturi tumorale.

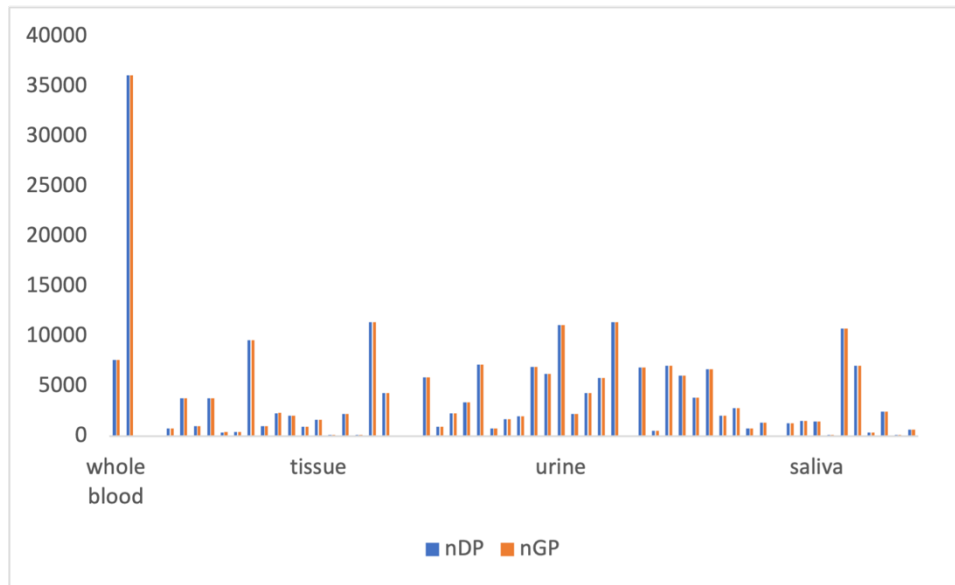
Nivelurile celor trei biomarkeri au fost evaluate în probele biologice folosind ambii microsenzori stocastici (Figura 4).



A)



b)



c)

Figura 4. Comparație între rezultatele obținute cu cei doi microsenzori stocastici bazați pe Mn(OAP)Cl/nDP și Mn(OAP)Cl/nGr pentru analiza a) p53, b) Catepsinei B și c) Catepsinei D, în sângele integral, țesut, urină și salivă.

Figura 4 a arătat o corelație foarte bună între rezultatele obținute folosind microsenzorii stocastici bazați pe Mn(OAP)Cl/nDP și Mn(OAP)Cl/nGr. Un test t student a fost efectuat la un nivel de încredere de 99,00% (valoarea tabelată este 4,13). Valorile obținute pentru testul pereche – student-t au fost 2,19 pentru catepsina D, 1,12 pentru catepsina B și 1,93 pentru p53. Valorile obținute pentru testul student-t au fost mai mici de 4,13, demonstrând că nu există o diferență semnificativă între rezultatele obținute folosind cei doi microsenzori stocastici bazați pe Mn(OAP)Cl/nDP și Mn(OAP)Cl/nGr pentru analiza catepsinei B, catepsinei D și p53. În consecință, microsenzorii stocastici propuși pot fi validați pentru recunoașterea moleculară, diferențierea și testarea pentru catepsina B, catepsina D și p53 în probele de sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral.

IV. Senzori pentru cuantificarea CA 19-9, CA 72-4, CA 125 și CEA

1. Partea experimentală

1.1. Reactivi și materiale

Cei patru biomarkeri (CA 19-9, CA 72-4, CA 125 și CEA) și soluția tampon de fosfat (pH=7,50) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich, în timp ce uleiul de parafină a fost achiziționat de la Fluka. Pentru prepararea soluțiilor de biomarkeri a fost utilizată metoda diluției în serie.

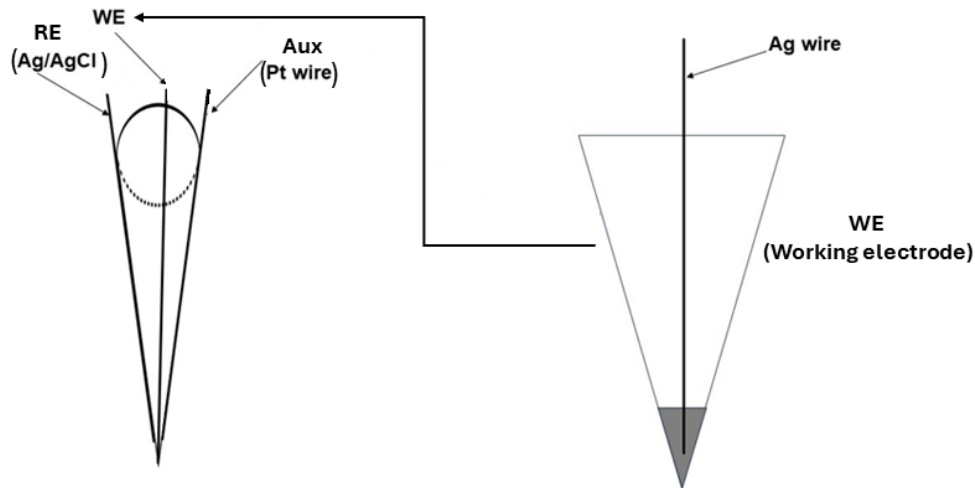
1.2. Sinteza grafenelor decorate cu bor și azot

Probele de grafen au fost obținute prin exfolierea electrochimică a tijelor de grafit, scufundate în electrolitul corespunzător (100 ml). Pentru prima probă (NBGr-1), electrolitul a conținut 0,1 mol L⁻¹ sulfat de amoniu, 0,1 mol L⁻¹ acid boric și 0,05 mol L⁻¹ NaCl. Pentru a doua probă (NBGr-2) electrolitul a fost făcut din 0,05 mol L⁻¹ sulfat de amoniu, 0,1 mol L⁻¹ acid boric și 0,05 mol L⁻¹ NaCl. Tijele de grafit au fost conectate la sistemul de exfoliere (sistem de casă) și s-a aplicat o tensiune constantă de 12 V timp de aproximativ 4 ore între anod și catod. Pulberea neagră rezultată din exfolierea anodului și depusă la fundul celulei a fost colectată prin decantare și spălată temeinic cu apă dublu distilată (10 L). Apoi, pulberea a fost dispersată prin ultrasunete timp de 30 de minute în 125 ml apă și filtrată pe hârtie cu bandă albă pentru a îndepărta particulele mari. Ultimul pas a fost uscarea prin liofilizare. Ambele pulberi de grafen: NBGr-1 și NBGr-2 au fost utilizate în construcția microsenzorilor stocastici pentru testarea simultană a CA 19-9, CA 72-4, CA 125 și CEA în probe biologice.

1.3. Proiectarea microsenzorilor stocastici

Microsenzorii stocastici 3D cu două ace au fost proiectați după cum urmează: fiecare dintre pulberile: NBGr-1 și NBGr-2 au fost amestecate cu ulei de parafină până s-a obținut o pastă omogenă. Fiecare dintre paste a fost amestecată cu o soluție de 10⁻³ mol L⁻¹ de oleamidă N-(2-mercapto-1 H-benzo[d]imidazol-5-il). Microconuri 3D cu un diametru interior de 10 μm au fost imprimate în laboratorul nostru folosind o imprimantă 3D Stratasys Objet 24 care utilizează tehnologia PolyJet pentru construcția incrementală a modelelor tridimensionale printr-un proces strat cu strat. Materialul folosit în acest studiu este Vero White Plus, care este un polimer ferm alb opac. Materialul suport cunoscut sub numele de FullCure 705 este un fotopolimer pe bază de acril cu o consistență asemănătoare gelului. Are proprietățile de a fi ușor de spălat și non-toxic. Precizia imprimantei a fost măsurată la 0,1 mm. Intervalul de temperatură în timpul funcționării a fost înregistrat ca 18–25 °C, în timp ce intervalul de umiditate relativă a fost măsurat ca 30–70%. Durata necesară pentru imprimarea microconurilor 3D a fost de 2 ore. Modelul de polimer lucios a fost fabricat și poziționat într-o orientare

verticală pe masa de imprimare pentru a minimiza utilizarea materialului suport. Diametrul suprafeței electrodului de lucru a fost măsurat la 10 μm . Pastele modificate au fost plasate în microconuri 3D (diametrul intern 10 μm) special concepute pentru microsenzorii stocastici 3D cu ac (Schema 1).



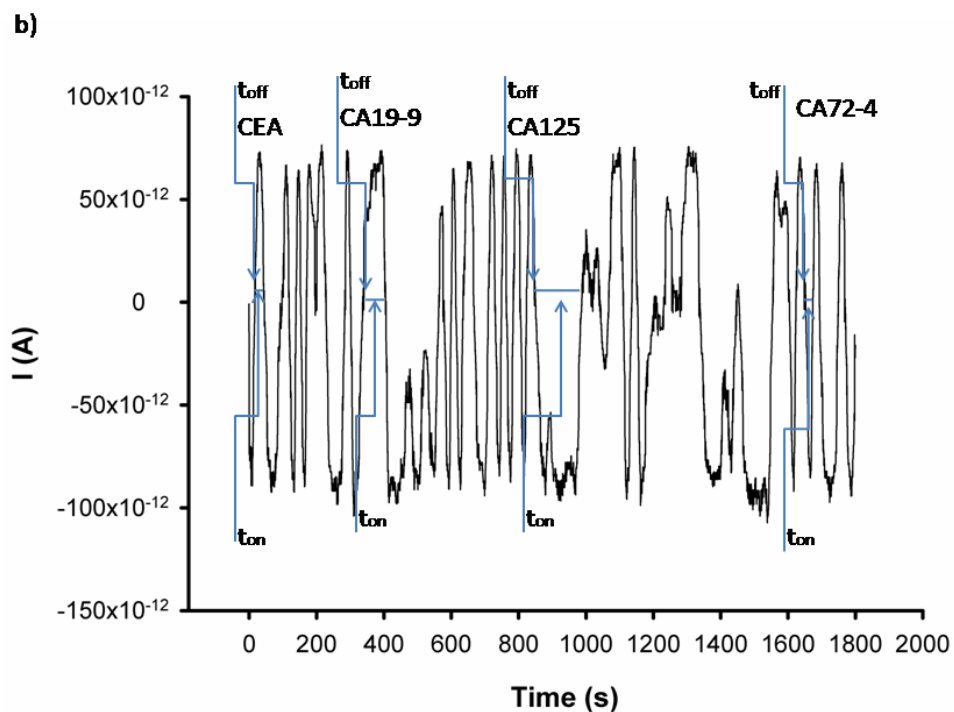
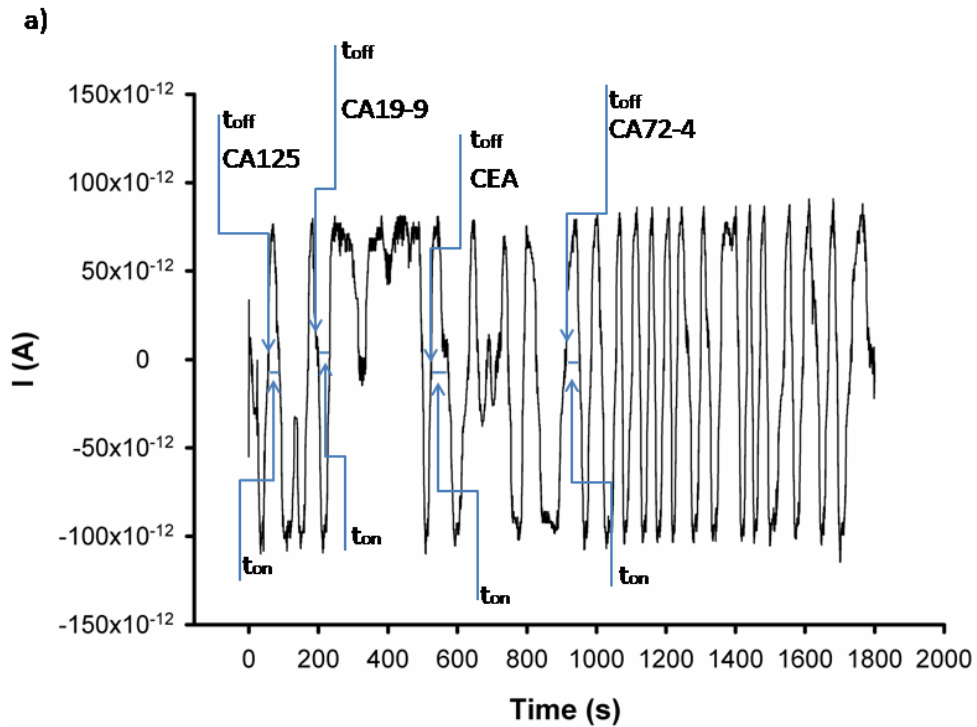
Schema 1. Designul microsenzorului stocastic 3D cu ac. (WE este electrodul de lucru).

În plus, electrodul de lucru (WE) a fost plasat într-un con care conține și electrodul de referință (sârmă Ag/AgCl) și electrodul auxiliar (sârmă Pt) (Schema 1). Când nu erau folosiți, microsenzorii cu ac au fost păstrați în locuri uscate, la temperatura camerei.

1.5. Metoda stocastică

Metoda stocastică implică efectuarea măsurătorilor de t_{on} și t_{off} la o tensiune constantă (125 mV față de Ag/AgCl) prin utilizarea unei metode cronoamperometrice. După efectuarea unei analize amănunțite a potențialelor cuprinse între 0 și 500 mV, a fost ales un potențial de 125 mV. Această valoare specifică a fost determinată pentru a produce semnături lizibile (valori t_{off}) care ar putea fi interpretate în mod consecvent și precis. Valorile timpilor t_{off} – denumiți și ca semnături ale biomarkerilor (în funcție de valorile lor, biomarkerii sunt recunoscuți în diagrame) au fost utilizați pentru identificarea celor patru biomarkeri (CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125) și valorile t_{on} (care se citesc între două semnături) au fost utilizate pentru determinarea concentrației fiecăruia dintre biomarkeri folosind ecuația de calibrare $1/t_{on} = a + b \times C_{\text{biomarker}}$, unde $C_{\text{biomarker}}$ este concentrația biomarkerilor determinată folosind microsenzorii stocastici cu ac 3D propuși: CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125, așa cum se vede în figurile 1 și 2. Parametrul cunoscut sub numele de „ t_{off} ” denotă durata necesară pentru ca biomarkerul să intre în canal. Este denumită în mod obișnuit semnătura biomarkerului și este indicată vizual pe diagrame folosind eticheta „ t_{off} ”. Semnătura are o importanță

semnificativă în analiza calitativă, deoarece este strâns asociată cu identificarea moleculară a biomarkerilor. Fiecare analit generează o semnătură distinctă (t_{off}) care este afectată de factori precum dimensiunea, forma, stereogeometria, capacitatea de desfășurare și viteza atunci când traversează canalul sau porul. În consecință, este rar ca doi analiți să prezinte semnături identice.



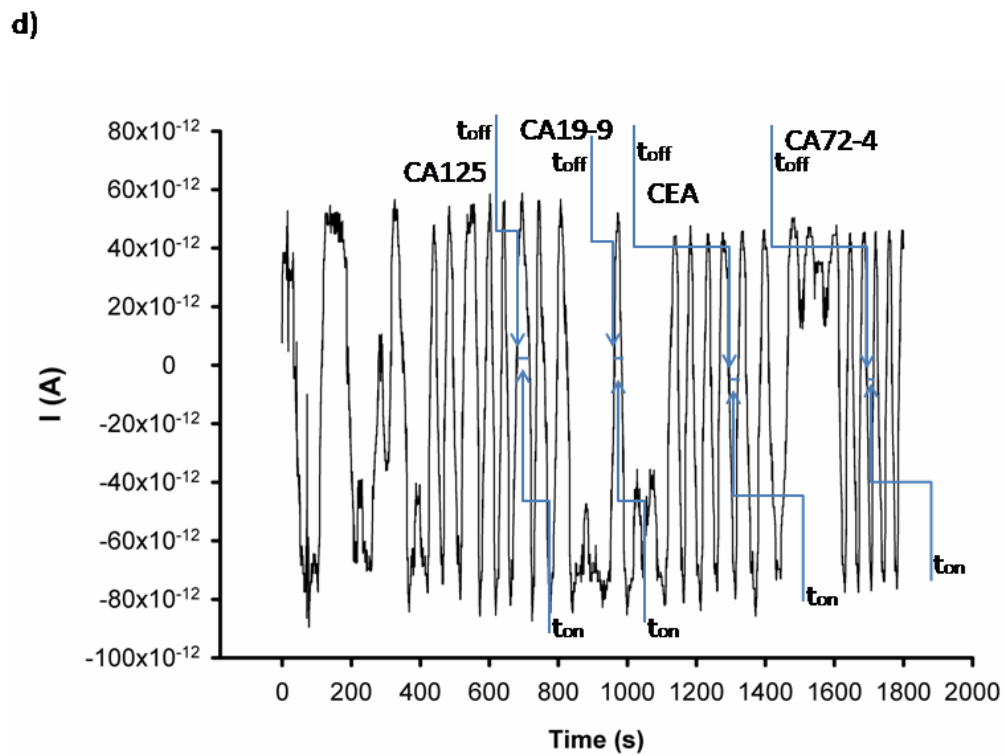
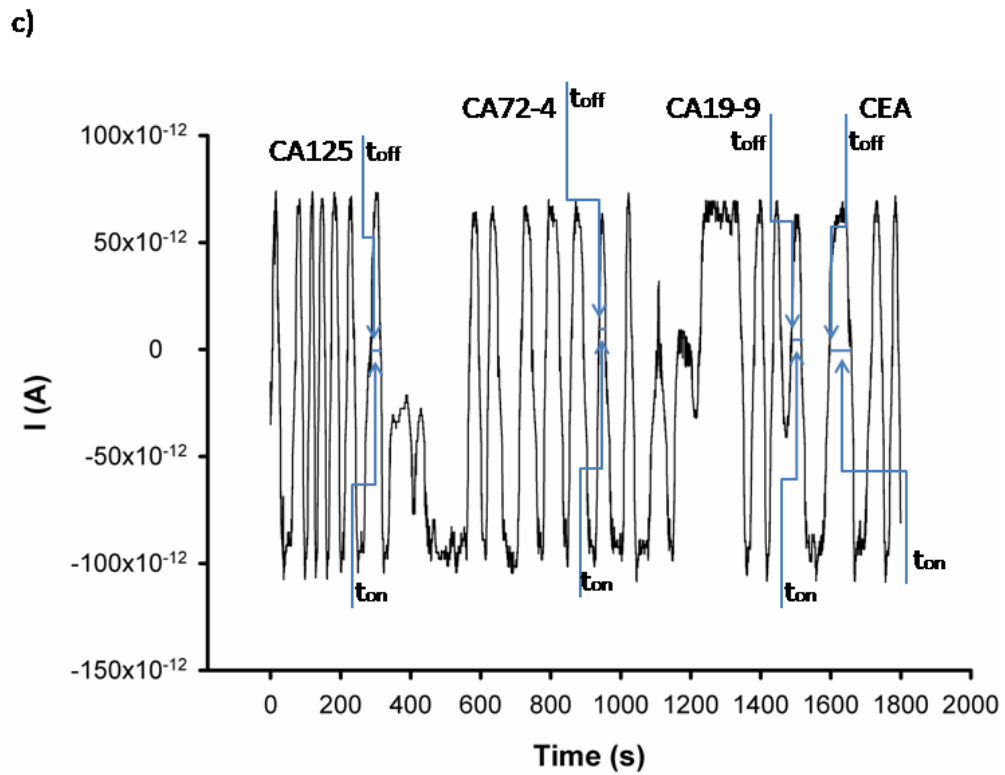
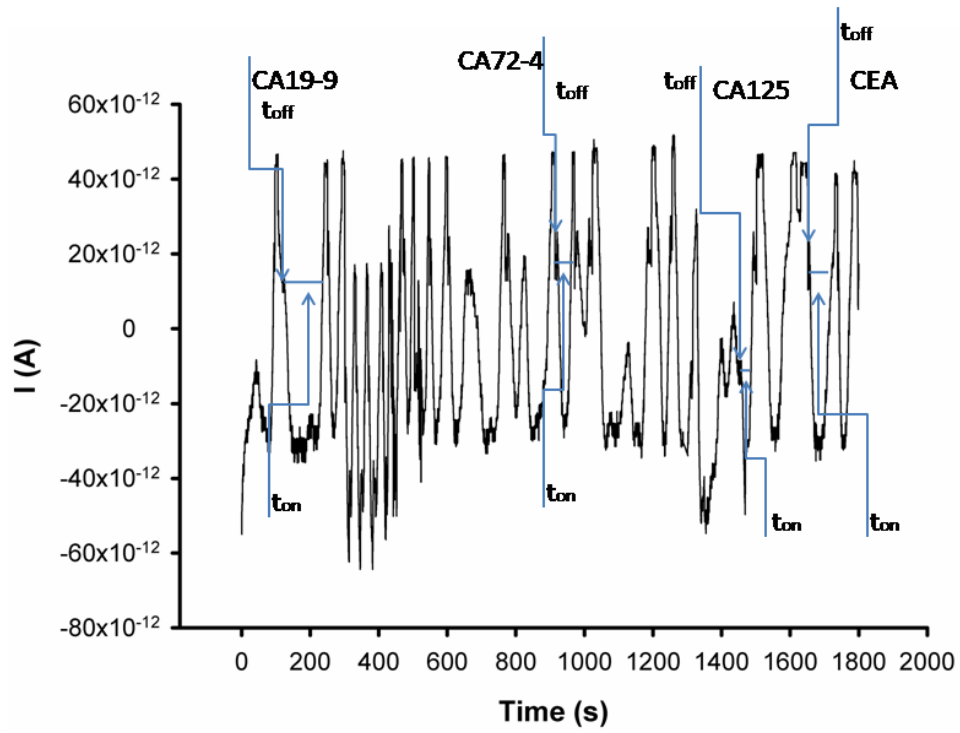
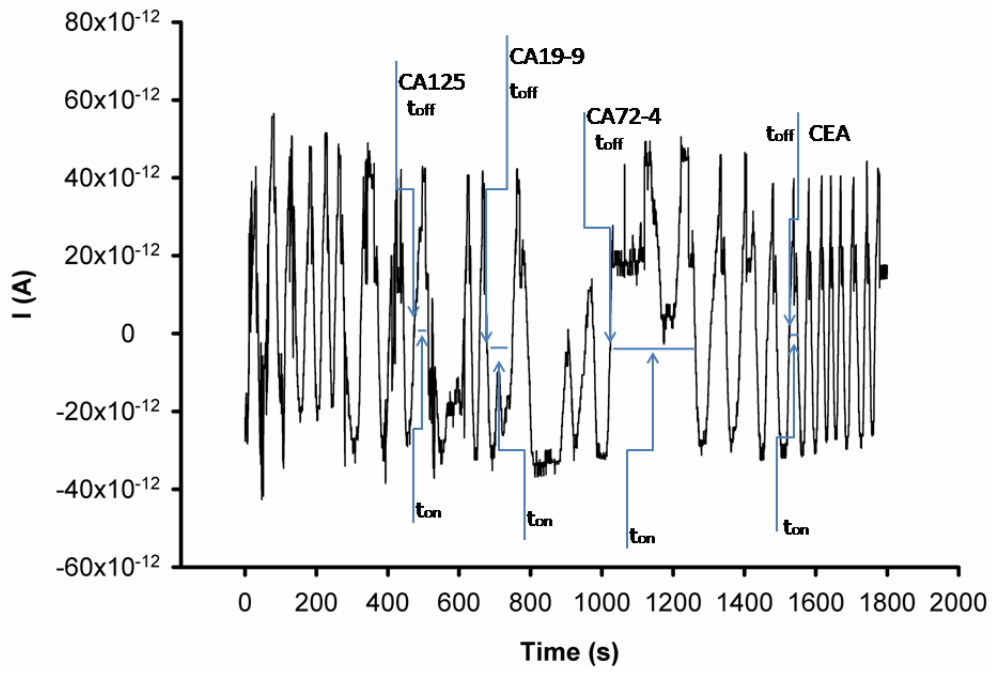


Figura 1. Exemple de diagrame obținute atunci când microsenzorul stocastic 3D cu ac bazat pe NBGr-1 a fost utilizat pentru screening-ul a) salivei, b) sângelui integral, c) țesutului tumoral gastric și d) urinei.

a)



b)



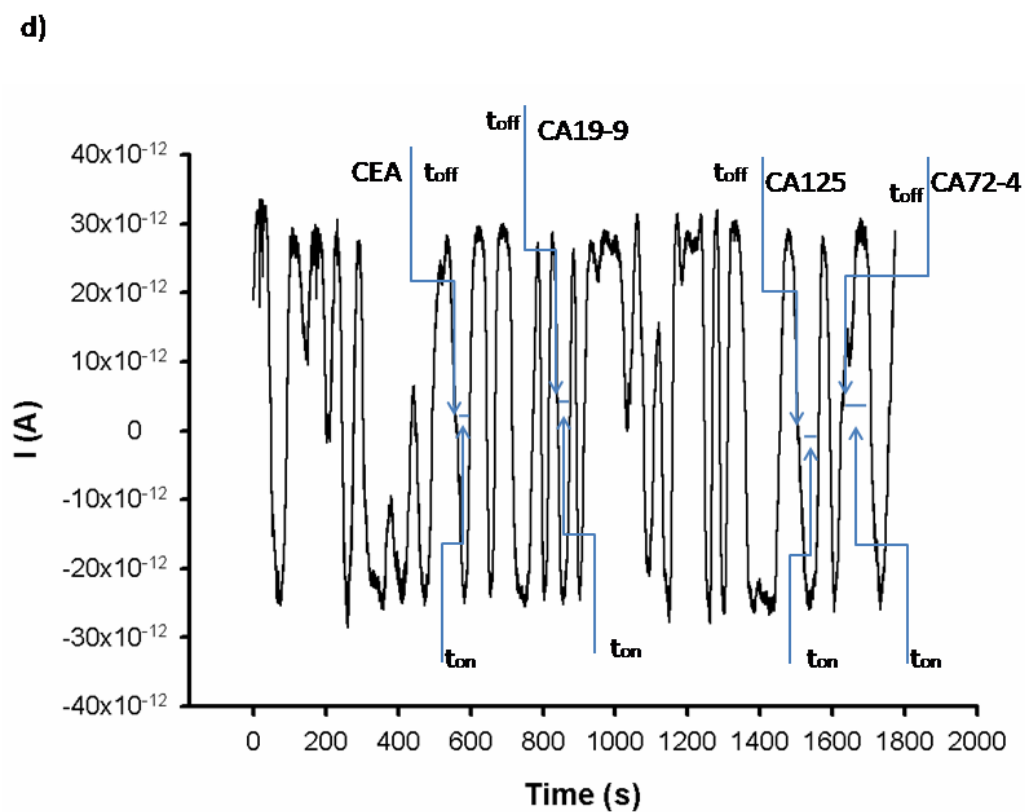
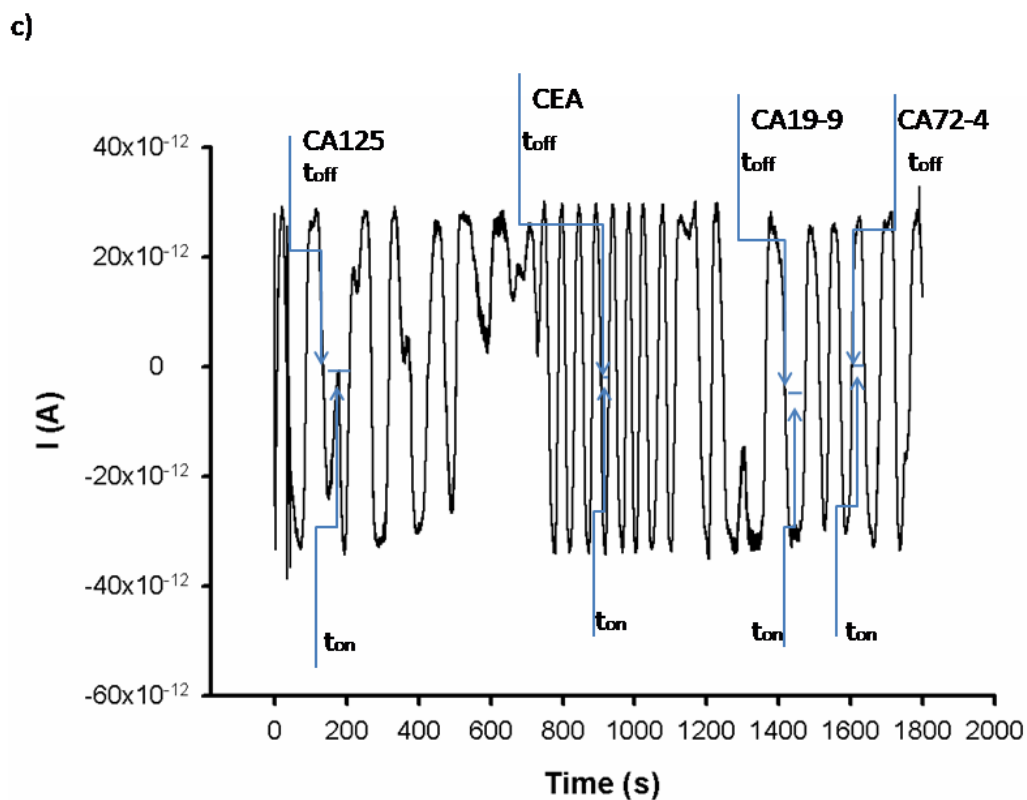


Figura 2. Exemple de diagrame obținute atunci când microsenzorul stocastic 3D cu ac bazat pe NBGr-2 a fost utilizat pentru screening-ul a) salivei, b) sângelui integral, c) țesutului tumoral gastric și d) urinei.

2. Rezultate și discuții

2.1. Morfologia suprafeței active a acului din microsenzorii stocastici 3D

Imaginile de microscopie electronică pentru pastele bazate pe NBGr-1 și NBGr-2 sunt prezentate în Figura 3. Imaginile SEM au demonstrat că există canale pe partea activă a microsenzorilor stocastici cu ac 3D.

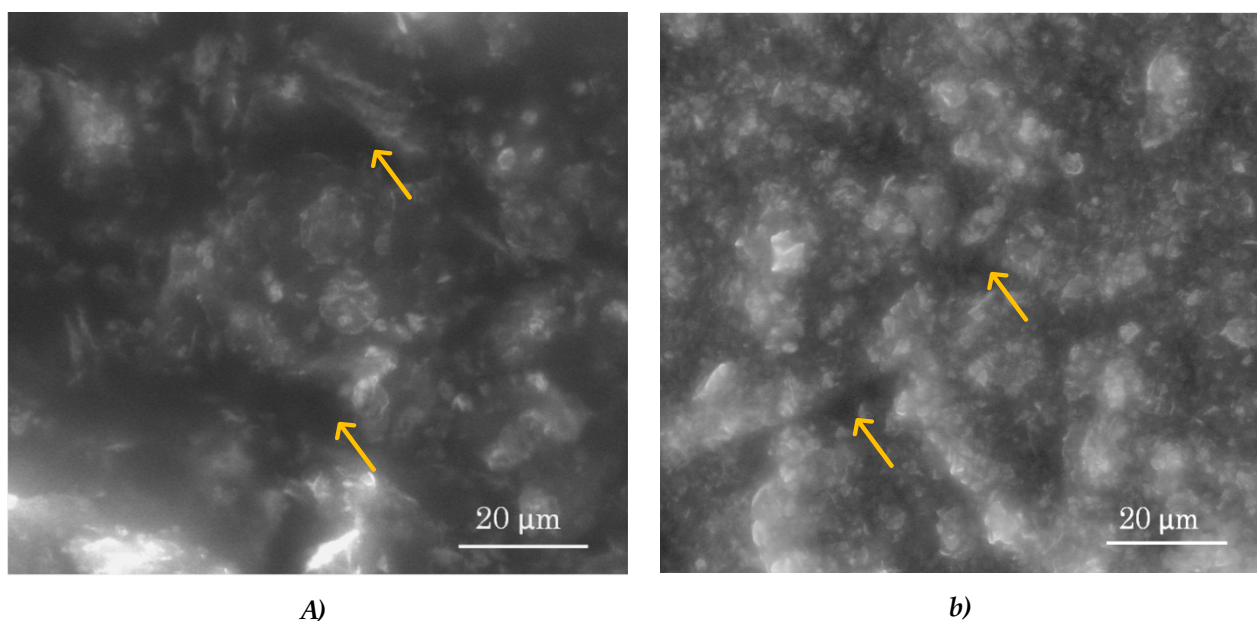


Figura 3. Imagini SEM pentru partea activă a microsenzorului stocastic cu ac bazate pe a) NBGr-1 și b) NBGr-2.

Aceste canale sunt necesare pentru detectarea stocastică și, prin urmare, se poate spune că semnalele stocastice specifice pot fi produse dacă senzorii sunt utilizați în modul cronoamperometrie. Multe studii de analiză a suprafeței au confirmat că suprafața suprafeței grafenului este mai netedă și stabilă [41] facilitând stabilitatea ridicată a canalelor modificatorilor. Aceste canale sunt necesare pentru detectarea stocastică și, prin urmare, se poate spune că semnalele stocastice specifice pot fi produse dacă senzorii sunt utilizați în modul cronoamperometrie.

2.2. Caracteristicile de răspuns ale celor doi microsenzori stocastici utilizați pentru testarea celor patru biomarkeri (CA 19-9, CA 72-4, CA125 și CEA)

Dezvoltarea actuală a senzorilor stocastici este un proces în două faze: în prima fază, cunoscută și sub denumirea de fază de recunoaștere, biomarkerul intră în canal - în timp ce intră în canal, biomarkerul îl blochează, făcând ca intensitatea curentului să scadă la valoarea zero - atâta timp cât procesul de intrare în canal are loc (acest timp necesar pentru ca biomarkerul să intre în canal se numește

semnătura biomarkerului și este marcat pe diagrame cu t_{off}); a doua fază este cea în care se determină cantitatea de biomarker, iar parametrul t_{on} este conectat la concentrație în mod corespunzător cu ecuația prezentată în paragraful mod stocastic. În timp ce semnătura este foarte importantă pentru analiza calitativă (fiind parametrul legat de recunoașterea moleculară a biomarkerilor), parametrul t_{on} oferă caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici 3D cu ac. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici 3D cu două ace sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici utilizați pentru testarea simultană a CA 72-4, CA 19-9, CA 125, CEA.

Microsenzor stochastic cu ac 3D bazat pe	Biomarker	Semnătură t_{off} (s)	Ecuație de calibrare, r	Sensibilitate	Limită de cuantificare	Liniar concentrație gamă
NBGr-2	CA 72-4 ¹	1.6	$1/t_{on}=0.04+1.06 \times 10^{-5}C$ $r=0.9923$	1.06×10^{-5} $s^{-1} U^{-1} mL$	4.00×10^{-11} $s^{-1} U^{-1} mL$	4.00×10^{-11} - 4.00×10^3 $s^{-1} U^{-1} mL$
	CA 19-9 ¹	1.8	$1/t_{on}=0.03+1.82 \times 10^{-4}C$ $r=0.9973$	1.82×10^{-4} $s^{-1} U^{-1} mL$	3.28×10^{-9} $s^{-1} U^{-1} mL$	3.28×10^{-9} - 5.00×10^2 $s^{-1} U^{-1} mL$
	CA 125 ¹	1.4	$1/t_{on}=0.03+9.92 \times 10^{-5}C$ $r=0.9994$	9.92×10^{-5} $s^{-1} U^{-1} mL$	8.36×10^{-6} $s^{-1} U^{-1} mL$	8.36×10^{-6} - 837.43 $s^{-1} U^{-1} mL$
	CEA ²	1.1	$1/t_{on}=0.03+8.13 \times 10^5C$ $r=0.9861$	8.13×10^5 $s^{-1} g^{-1} mL$	4.10×10^{-15} $s^{-1} g^{-1} mL$	4.10×10^{-15} - 2.00×10^{-7} $s^{-1} g^{-1} mL$
NBGr-1	CA 72-4 ¹	1.0	$1/t_{on}=0.04+1.43 \times 10^{-5}C$ $r=0.9977$	1.43×10^{-5} $s^{-1} U^{-1} mL$	4.00×10^{-3} $s^{-1} U^{-1} mL$	4.00×10^{-3} - 4.00×10^3 $s^{-1} U^{-1} mL$
	CA 19-9 ¹	1.4	$1/t_{on}=0.04+5.88 \times 10^{-3}C$ $r=0.9997$	5.88×10^{-3} $s^{-1} U^{-1} mL$	2.09×10^{-13} $s^{-1} U^{-1} mL$	2.09×10^{-13} - 20.00 $s^{-1} U^{-1} mL$
	CA 125 ¹	1.2	$1/t_{on}=0.04+1.98 \times 10^{-5}C$ $r=0.9955$	1.98×10^{-5} $s^{-1} U^{-1} mL$	8.37×10^{-14} $s^{-1} U^{-1} mL$	8.37×10^{-14} - 8.37×10^3 $s^{-1} U^{-1} mL$
	CEA ²	1.6	$1/t_{on}=0.06+9.24 \times 10^4C$ $r=0.9946$	9.24×10^4 $s^{-1} g^{-1} mL$	1.28×10^{-11} $s^{-1} g^{-1} mL$	1.28×10^{-11} - 1.00×10^{-6} $s^{-1} g^{-1} mL$

Au fost înregistrate semnături diferite pentru cei patru biomarkeri, când a fost folosit același microsenzor, dovedind că cei doi microsenzori pot fi utilizați în mod fiabil pentru analiza simultană a celor patru biomarkeri. S-au obținut sensibilități ridicate și limite scăzute de determinare pentru toți microsenzorii stocastici 3D cu ac. Limitele de determinare au fost stabilite ca fiind cea mai mică concentrație găsită în intervalul de concentrație liniară, în conformitate cu noua recomandare IUPAC (punctul 3.36, Nota 3) [42]. În timp ce tipul de grafen nu a influențat semnificativ sensibilitatea testului biomarkerilor (cu excepția CA 19-9 când a fost înregistrată o sensibilitate mai bună când a fost utilizat NBGr-2 și CEA când a fost înregistrată o sensibilitate mai bună când a fost înregistrată NBGr-1). folosit), a influențat mai mult limitele de determinare a biomarkerilor: limitele inferioare de determinare au fost obținute pentru CA 72-4 și CEA când a fost utilizat microsenzorul pe bază de NBGr-2 și pentru CA 19-9 și CA 125 când a fost utilizat A fost utilizat un microsenzor bazat pe NBGr-1. Reacția electrochimică este indusă de tensiunea aplicată pe electrodul de lucru, iar cantitatea de electroni deplasată (denumită curent electric) oferă perspective asupra stării suprafeței [43-46]. Rata de schimbare a curentului electric este direct proporțională cu cantitatea de molecule care au suferit adsorbție la suprafață, oferind astfel date valoroase de detectare. Intervalele de concentrație liniare înregistrate au fost largi, făcând posibilă testarea celor patru biomarkeri la persoanele sănătoase și la pacienții cu cancer gastric din stadiile incipiente până la cele mai avansate.

Au fost efectuate studii de reproductibilitate și stabilitate pentru fiecare dintre microsenzorii stocastici 3D cu ac. Zece microsenzori stocastici 3D cu ace din fiecare categorie au fost proiectați în mod corespunzător cu metoda descrisă mai sus, iar valorile sensibilităților au fost înregistrate și comparate timp de 60 de zile. Pentru reproductibilitatea designului, sensibilitățile înregistrate pentru microsenzorii de același tip au fost comparate pentru fiecare biomarker; %, RSD înregistrate pentru sensibilitățile microsenzorialor stocastici 3D cu ac au fost următoarele: pentru microsenzorul bazat pe NBGr-1 0,03% pentru CA 72-4, 0,02% pentru CA 19-9, 0,03% pentru CA 125 și 0,01 % pentru CEA, în timp ce pentru microsenzorul bazat pe NBGr-2, valorile înregistrate au fost de 0,02% pentru CA 72-4, 0,01% pentru CA 19-9, 0,04% pentru CA 125 și 0,01% pentru CEA. Aceste valori obținute pentru % RSD au confirmat reproductibilitatea designului celor două tipuri de microsenzori stocastici 3D cu ac.

Stabilitatea în timp, a fost determinată prin măsurarea sensibilităților senzorilor proiectați timp de 60 de zile. Prin compararea sensibilităților obținute în această perioadă de timp pentru fiecare tip de microsenzor stocastici 3D cu ac, se pot face următoarele afirmații: pentru microsenzorul bazat pe NBGr-1 valorile RSD au fost: 0,05% pentru CA 72-4, 0,06% pentru CA 19-9, 0,08% pentru CA125 și 0,03% pentru CEA, în timp ce pentru microsenzorul bazat pe NBGr-2, valorile înregistrate au fost de 0,08% pentru CA72-4, 0,04% pentru CA19-9, 0,03% pentru CA125 și 0,03% pentru CEA. Aceste rezultate

au demonstrat o bună stabilitate în timp a pastelor modificate, precum și a microsenzorilor stocastici în timp.

Selectivitatea microsenzorilor stocastici este determinată de valorile înregistrate ale semnăturilor asociate cu biomarkeri și alți compuși prezenți în probele biologice. Prezența diferențelor perceptibile între aceste semnături servește ca dovadă a selectivității microsenzorilor. Valorile t_{off} înregistrate pentru diferite interferențe potențiale servesc ca indicatori ai selectivității celor doi senzori stocastici luați în considerare. Următoarele substanțe au fost investigate ca posibili interferenți: p53, catepsină D, catepsină B, leucină, serină și glutamina. Semnătura celor patru biomarkeri a fost determinată a fi mai mică de 2 s atunci când se utilizează ambii senzori. Ceilalți compuși prezenți în probele biologice care au fost examinate ca potențiale interferențe au avut caracteristici distincte de biomarkerii ipotezați, confirmând astfel selectivitatea senzorilor. Când s-au folosit microsenzorii stocastici 3D cu ac bazați pe NBGr-1, s-au înregistrat următoarele semnături: 2,4 s pentru p53, 2,7 s pentru catepsina D, 2,9 s pentru catepsina B, 3,1 s pentru leucină, 3,9 s pentru serină și 3,7 s. pentru glutamina. Când s-au folosit microsenzorii stocastici 3D cu ac bazați pe NBGr-2, s-au înregistrat următoarele semnături: 3,8 s pentru p53, 3,0 s pentru catepsina D, 2,8 s pentru catepsina B, 3,5 s pentru leucină, 2,4 s pentru serină și 2,6 s. pentru glutamina.

Toate semnăturile obținute pentru aceste substanțe au fost diferite una de cealaltă și mai mari de 2,3, dovedind selectivitatea microsenzorilor stocastici 3D cu ac propuși atunci când sunt utilizați pentru testarea CA 19-9, CA 72-4, CA 125 și CEA în probe biologice. În consecință, microsenzorii stocastici 3D cu ac pot fi utilizați selectiv pentru testarea CA 19-9, CA 72-4, CA125 și CEA în probe biologice.

În comparație cu alte instrumente și metode propuse până în prezent, inclusiv: un senzor imunitar electrochimic ultrasensibil propus pentru testarea CA 72-4 de Yan și colab. [47], un senzor electrochimic propus pentru testarea simultană a CA19-9 și CA 72-4, care s-a bazat pe recunoașterea duală a markerilor tumorali prin amprentarea glicozilului și legarea specifică a lectinei, propus de Luo și colab. [48], un imunosenzor electrochimic de tip split ultrasensibil, bazat pe o strategie de control propusă de Li și colab. pentru testarea CA 19-9 [49], un imunosenzor fotoelectrochimic propus de Gholamin și colab. pentru testarea CA 19-9 [50], un senzor pe bază de chemiluminiscență în formă de floare pentru testarea CEA [51], un silicat de cupru magnetic și acid boronic - conjugat AuNCs@keratină - cu detecție duală electrochimică/fluorescentă a fost propus de Jin et al pentru determinarea CEA [52], și pentru testarea CA 125 – un imunosenzor pe bază de hidrogel propus de Er et al. [53] și un imunosenzor dublu fără etichetă propus de Kamac și colab. [54], microsenzorii stocastici 3D cu ac propuși în această lucrare au avut următoarele avantaje: senzorii dezvoltați prezintă capacități de recunoaștere moleculară fiabile pentru CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125, demonstrează intervale de concentrație de lucru mai largi în comparație cu cele documentate în lucrările de referință; în plus,

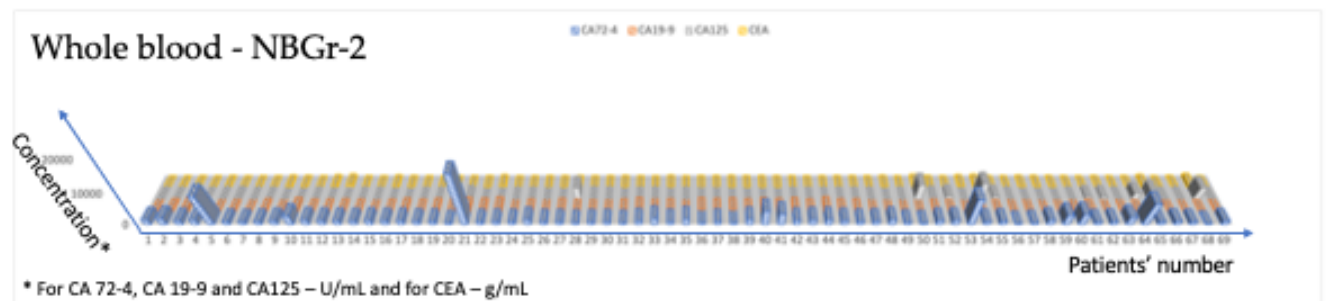
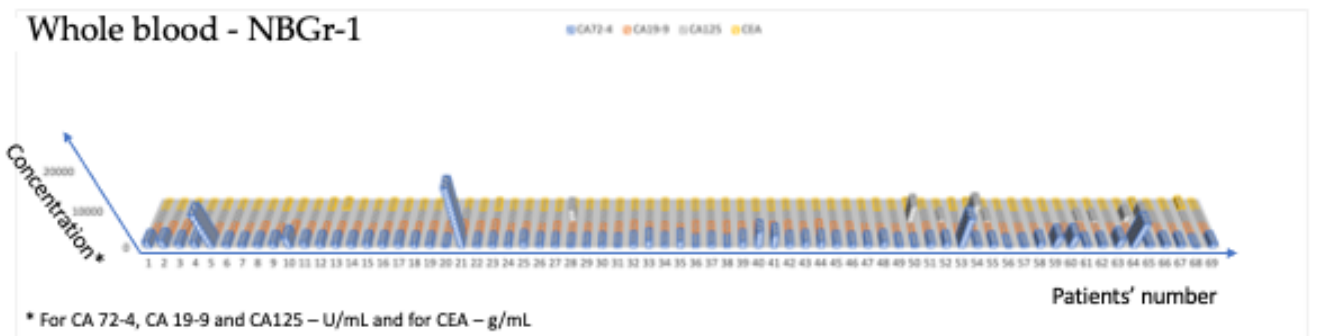
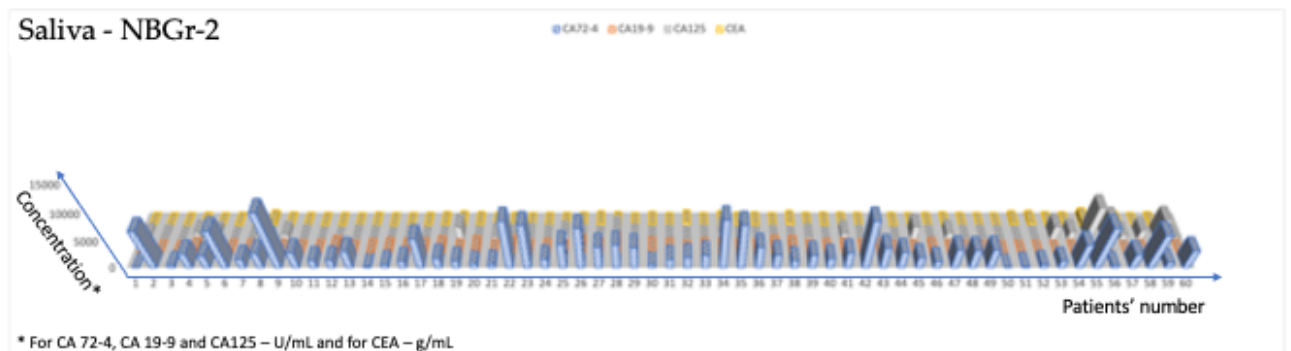
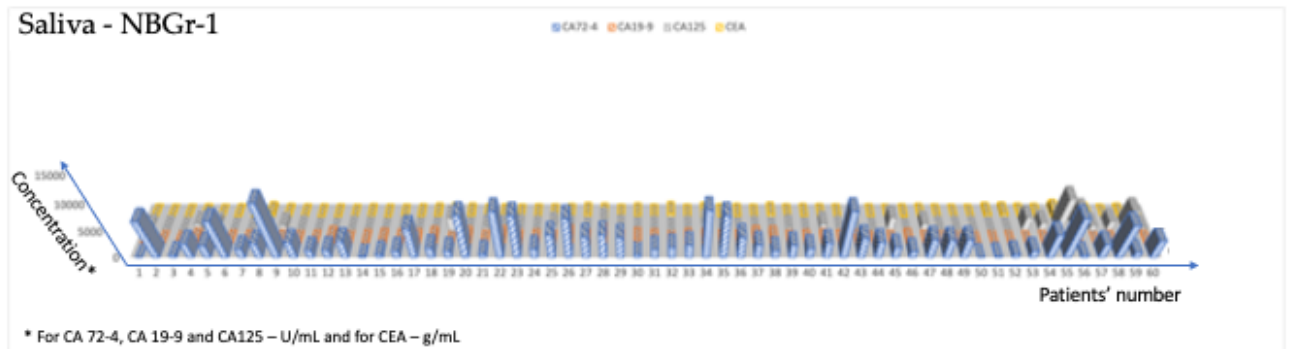
senzorii ating limite mai mici de determinare și sensibilități mai mari, proiectarea lor, care nu implică utilizarea de biomolecule, contribuie la stabilitatea sporită a acestora în timp. În special, senzorii stocastici 3D cu ac pot fi păstrați la temperatura camerei timp de minim două luni fără a le compromite funcționalitatea. Mai mult, ele pot fi utilizate zilnic pentru analiza cantitativă a CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125 în diferite probe biologice, inclusiv sânge integral, urină, saliva și țesuturi tumorale. Senzorii menționați mai sus au un grad mai mare de selectivitate în comparație cu biomarkerii găsiți în sângele integral, saliva, urină și țesuturile tumorale.

2.3. Determinarea ultrasensibilă a celor patru biomarkeri în toate cele patru fluide biologice

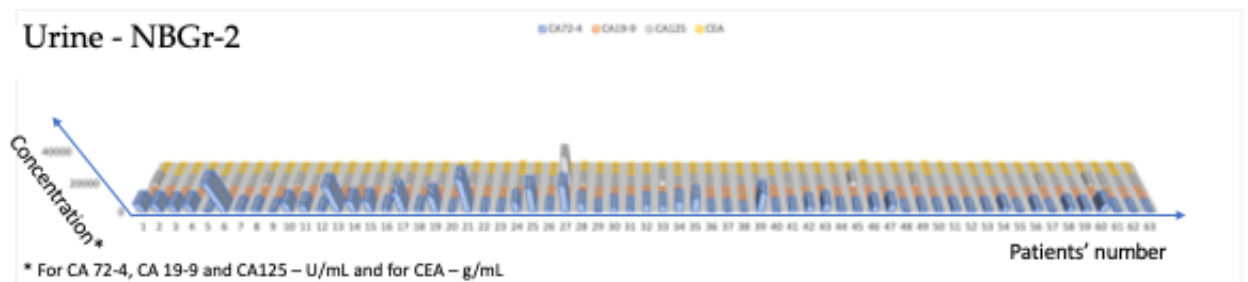
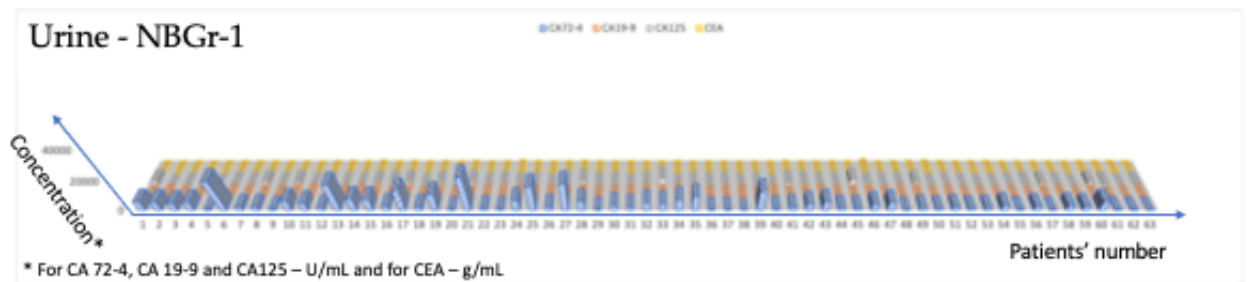
Intervalele largi de concentrație de lucru, limitele scăzute de determinare, posibilitatea determinării simultane a CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125, au făcut posibilă utilizarea microsenzorilor stocastici 3D cu ac pentru testele de screening ale sângelui integral, saliva, urină și țesuturi tumorale.

Probele au fost analizate cât mai curând posibil după ce au fost prelevate de la pacienți. Diagramele au fost înregistrate, iar primul pas a fost identificarea, pe baza semnăturilor lor, a biomarkerilor: CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125 din diagramă. Între două semnături, s-a citit tona. Valorile tonelor au fost utilizate pentru determinarea cantitativă a CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125 în sângele integral, saliva, urină și țesutul tumoral, în conformitate cu procedura în modul stocastic descrisă mai sus. Nivelurile celor patru biomarkeri au fost evaluate în toate cele patru tipuri de fluide biologice (sânge integral, salivă, urină și probe de țesut) cu ambele senzori, iar rezultatele sunt prezentate în Figura 4.

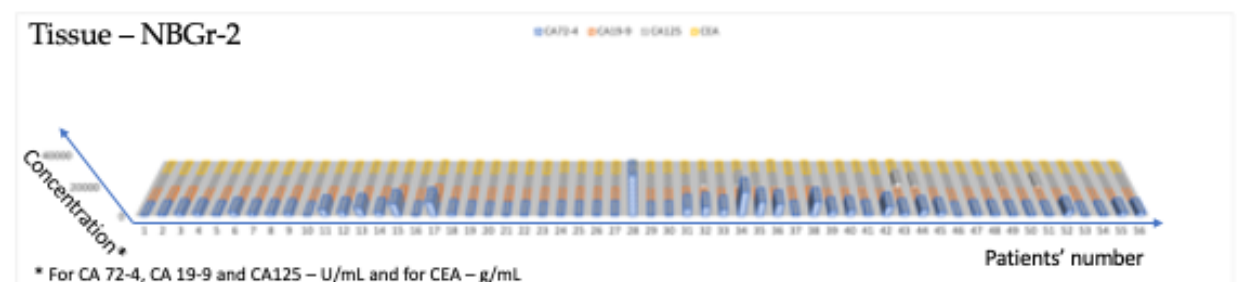
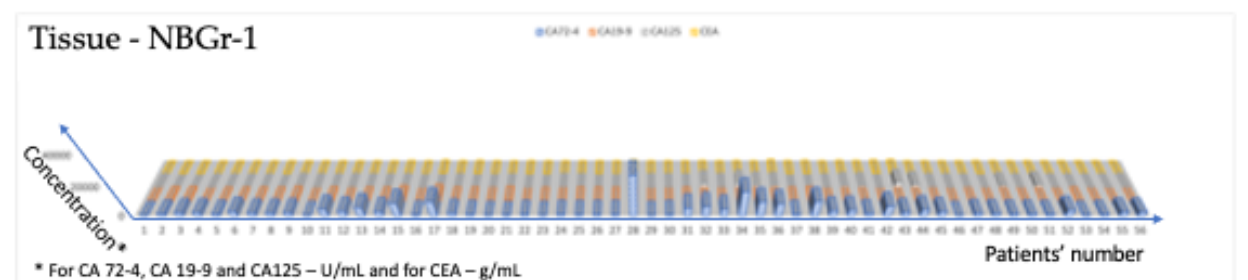
A)



b)



c)



d)

Figura 4. Comparație între rezultatele obținute cu microsenzorii stocastici 3D cu două ace bazați pe NBGr-1 și NBGr-2 pentru testarea celor patru biomarkeri în a) saliva b) sânge integral c) urină și d) probe de țesut tumoral gastric.

Testul t pereche student a fost efectuat 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 de 3.500, ceea ce este mai mic decât valoarea tabelată, demonstrând că nu există o diferență semnificativă statistic între rezultatele obținute folosind microsenzorii stocastici 3D cu două ace. Testul F a fost de asemenea efectuat, la un nivel de încredere de 95%, pentru zece probe de fiecare fel. Valoarea F tabelată a fost 3,18. Rezultatele obținute la compararea abaterilor standard obținute pentru microsenzorii stocastici 3D cu două ace au fost mai mici de 1,00, ceea ce este o valoare mai mică decât valoarea tabelată, 3,18. Acest lucru indică faptul că nu există o diferență semnificativă în precizia înregistrată pentru senzorii stocastici 3D cu două ace și că abaterile standard nu depind de probele analizate. În consecință, microsenzorii propuși pot fi utilizați pentru screeningul sângelui integral, al salivei, al urinei și al țesuturilor tumorale pentru cei patru biomarkeri.

Cel de-al doilea test efectuat pentru validarea senzorilor stocastici 3D ac și a metodei de screening a fost testul de recuperare. Cantități cunoscute din fiecare dintre biomarkeri (CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125) au fost adăugate în sânge integral, urină, salivă și țesuturi tumorale. Cantitățile de CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125 au fost determinate înainte și după adăugarea lor în probele de sânge integral, urină, salivă și țesut tumoral. Diferența dintre cantitatea finală găsită în proba biologică și cantitatea inițială (determinată înainte de adăugarea cantităților cunoscute de CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125 la probă) a fost comparată cu cantitatea cunoscută adăugată în eșantion pentru fiecare dintre biomarkeri. Rezultatele obținute pentru testele de recuperare sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabel 2. Testele de recuperare ale CA72-4, CA19-9, CA125, CEA efectuate cu ajutorul microsenzorilor stocastici 3D cu ac (N=10).

Microsenzor					
stocastic cu ac 3D bazat pe	Biomarker	Sânge integral	Salivă	Urină	Țesut tumoral
%, Recuperare					
NBGr-2	CA72-4	98,99±0,03	99,43±0,04	99,29±0,03	97,25±0,05
	CA19-9	97,23±0,05	98,21±0,03	98,14±0,03	98,01±0,03
	CA125	98,47±0,02	99,12±0,05	98,37±0,04	97,15±0,04
	CEA	99,05±0,02	99,54±0,05	98,11±0,02	98,00±0,04
NBGr-1	CA72-4	99,09±0,08	99,01±0,01	99,12±0,02	98,29±0,08
	CA19-9	99,00±0,02	97,59±0,04	99,87±0,07	97,97±0,09
	CA125	98,32±0,05	98,06±0,02	98,93±0,04	98,19±0,04
	CEA	98,27±0,03	98,89±0,05	98,90±0,03	98,05±0,02

Rezultatele prezentate în Tabelul 2 au arătat valori ridicate de recuperare pentru toți biomarkerii: CA 72-4, CA 19-9, CA 125 și CEA atunci când au fost recuperate din sânge integral, salivă, urină și probe de țesut tumoral. Au fost raportate și valori procentuale foarte scăzute, RSD.

Pe baza primului și celui de-al doilea test de validare, se poate concluziona că microsenzorii stocastici 3D cu ac propuși pot fi utilizați de încredere pentru testarea simultană a CA 72-4, CA 19-9, CA 125 și CEA în sângele integral, salivă, urină, și țesut tumoral. Testul poate fi folosit ca test de screening în masă al populației, pentru diagnosticarea precoce a cancerului gastric.

Partea 2- Aplicații biomedicale pentru senzorii stocastici dezvoltati

În această teză, este propusă o nouă metodă moleculară de determinare a localizării și a principalelor caracteristici clinicopatologice cu sensibilități ridicate și specificități ridicate pe baza nivelurilor de proteine MMR și KRAS obținute cu ajutorul senzorilor stocastici în probele de sânge integral, salivă și urină. Datorită utilizării senzorilor stocastici, nivelurile celor cinci biomarkeri pot fi determinate rapid, simultan și fără costuri semnificative.

1. Descrierea pacientului

După primirea consimțământului informat, au fost recoltate cele trei tipuri de probe de la 116 pacienți cu cancer colorectal (107 probe de sânge integral, 79 de probe de salivă și 88 de probe de urină).

Pacienții au fost selectați din baza de date a proiectului GRAPHSENSGASTROINTES și utilizați corespunzător cu aprobarea Comitetului de Etică nr. 32647/2018 acordat de Spitalul Județean de Urgență din Târgu-Mureș. O mică descriere a pacienților este dată în tabelul 1.

Tabelul 1. Caracterizarea pacienților

Caracteristicile pacienților cu adenocarcinom colorectal	Numărul de pacienți	La sută
Vârsta	≤60 de ani	26,96%
	60-69 ani	36,52%
	70-79 ani	26,09%
	≥80 de ani	10,43%
Sex	Masculin	73,28%
	Feminin	26,72%
Localizarea tumorii	Colon ascendent	12,07%
	Colon transvers	6,03%
	Colonul descendent	1,72%
	Colon sigmoid	21,55%
	Joncțiunea rectosigmoidiană	9,48%
	Rect	31,90%
	Rect cu radioterapie	17,24%
Polipi maligni	1,83%	

Aspect macroscopic	Vegetant	27	24,77%
	Vegetant și ulcerat	26	23,85%
	Infiltrativ	54	49,54%
Prezența mucusului	Per total	36	31,86%
Tipul de stromă	Componentă fibroasă	59	65,56%
	Componentă inflamatorie	31	34,44%
Subtip molecular	Componentă mezenchimală	31	38,75%
Invazii	Vase de sânge	29	25,66%
	Vase limfatice	54	47,79%
	Perineurală	36	31,86%
	Ganglionilor limfatici	50	44,25%
Rata de supraviețuire	≥1 an	21	18,10%
	<2 ani	47	40,52%
	≥2 ani	7	6,03%
Clasificare TNM	pT2	19	17,12%
	pT3	55	49,55%
	pT4a	25	22,52%
	pT4b	12	10,81%
	Depozite tumorale	11	9,91%
	Metastaze	18	15,52%

2. Rezultate

Nivelurile fiecărui biomarker au fost evaluate prin metoda stocastică în toate cele trei fluide biologice, iar valorile au fost căutate pentru corelații cu caracteristicile clinicopatologice la pacienții cu adenocarcinom colorectal. Toate aceste caracteristici au fost înregistrate de către medicii patologi și geneticianul de la Departamentul de Patologie al Spitalului Județean de Urgență din Targu-Mures. Toate corelațiile au fost optimizate folosind Microsoft Office Suite Software, Matlab și Mathcad.

Pentru fiecare caracteristică a fost dezvoltat și descris un algoritm bazat pe formule matematice sau pe criterii de probabilitate. Întrucât toate rezultatele sunt bazate pe matematică, iar inteligența artificială are o dezvoltare rapidă în medicină, propunem un cod în Matlab care poate prezice cu mare probabilitate caracteristicile clinicopatologice la pacienții cu adenocarcinom colorectal. Acest cod este

dat în Material suplimentar. Pornind de la acest cod, prin introducerea nivelurilor fiecărui biomarker în fiecare fluid biologic, rezultatele sunt generate într-un timp foarte scurt.

Fiecare caracteristică a fost analizată separat și cele mai bune corelații au fost selectate și descrise pe larg. Primul pas a fost reprezentat de calculul valorilor p pentru fiecare caracteristică și fiecare biomarker. Unele formule derivate au fost căutate și pentru valorile p. Aceste formule se bazează pe cinetică biochimică și au fost adaptate pentru fiecare caracteristică dacă era necesar ca o optimizare matematică.

Prima caracteristică discutată în această lucrare este reprezentată de localizarea tumorii. Zona colorectală a fost practic împărțit în șase zone și anume colon ascendent, colon transvers, colon descendent, colon sigmoid, joncțiune rectosigmoidă cu zona adiacentă și rect. Pentru a evita efectul terapiei adjuvante asupra nivelului biomarkerilor, doar pacienții care nu au beneficiat de terapie în momentul prelevării au fost luați în considerare pentru stabilirea localizării tumorii.

Înainte de introducerea parametrilor derivați, valorile p au fost calculate pentru nivelul fiecărui biomarker și pentru unele rapoarte principale între concentrațiile diferiților biomarkeri în același fluid biologic. Valorile p sunt date în tabelul 2.

Tabelul 2. Valorile p calculate pentru fiecare biomarker din fiecare fluid biologic și pentru principalele rapoarte

Biomarker sau raport	Fluid biologic		
	Tot sângele	Urină	Salivă
MLH1	0,143	0,928	0,256
MSH2	0,391	0,344	0,365
MSH6	0,783	0,278	0,780
PMS2	0,080	0,382	0,996
KRAS	0,921	0,367	0,013
MLH1/MSH2 (ng/pg)	0,261	0,540	0,200
PMS2/MSH6 (ng/pg)	0,204	0,942	0,015
MLH1/PMS2	0,195	0,142	0,878
MSH2/MSH6	0,085	0,814	0,386
MLH1/KRAS (ng/μg)	0,217	0,071	0,285

Pentru nivelurile biomarkerilor și valorile rapoartelor selectate s-au făcut câteva observații cu privire la corelațiile acestora cu localizarea:

- Valorile raportului MLH1/PMS2 din sângele întreg sunt mai mici la pacienții cu adenocarcinom de joncțiune rectosigmoidă (<5, 66,66%) și rect (<5, 67,74%);

- Valorile raportului MSH2/MSH6 din sânge total sunt mai mari la pacienții cu colon ascendent ($>0,85$, 69,23%) și valori mai mici la colonul transvers și descendent ($<0,85$, 100%), joncțiunea rectosigmoidă ($<0,85$, 66,66%) și rect ($<0,85$). , 61,29%) pacienți cu adenocarcinom;
- Valorile raportului MLH1/MSH2 din sângele întreg sunt mai mici în colonul ascendent (<1 ng/pg, 69,23%), colonul transvers și descendent (<1 ng/pg, 87,5%) și joncțiunea rectosigmoidă (<1 ng/pg, 66,66%) pacienți cu adenocarcinom;
- Valorile raportului PMS2/MSH6 din sângele întreg sunt mai mari la pacienții cu rect ($>0,9$ ng/pg, 58,06%) și mai mici la colonul ascendent ($<0,9$ ng/pg, 61,54%) și colonul sigmoid ($<0,9$ ng/pg, 75%) pacienți cu adenocarcinom;
- Valorile raportului MLH1/KRAS din sângele întreg sunt mai mari la colonul sigmoid ($>0,009$, 58,33%) și la pacienții cu adenocarcinom de rect ($>0,009$, 58,06%) și mai scăzute la colonul transvers și descendent ($<0,009$, 75%) și joncțiunea rectosigmoidă ($<0,009$). , 77,78%) pacienți cu adenocarcinom;
- valorile raportului urinar MLH1/PMS2 sunt mai mici la pacienții cu adenocarcinom de colon ascendent (<3 , 70%), joncțiunea rectosigmoidă (<3 , 77,78%) și rect (<3 , 57,14%);
- valorile raportului urinar MSH2/MSH6 sunt mai mari la pacienții cu adenocarcinom de colon ascendent ($>0,9$, 70%);
- valorile raportului urinar MLH1/MSH2 sunt mai mici la pacienții cu adenocarcinom de colon ascendent ($<1,5$ ng/pg, 80%) și joncțiunea rectosigmoidă ($<1,5$ ng/pg, 77,78%);
- valorile raportului urinar PMS2/MSH6 sunt mai mici la pacienții cu adenocarcinom de colon transvers și descendent ($<0,25$ ng/pg, 85,71%);
- valorile raportului salivar MLH1/MSH2 sunt mai mici la pacienții cu adenocarcinom de colon ascendent ($<0,25$ ng/pg, 77,78%) și de colon transvers și descendent ($<0,25$ ng/pg, 71,43%);
- valorile raportului PMS2/MSH6 salivare sunt mai mici la pacienții cu adenocarcinom de colon ascendent ($<0,8$ ng/pg, 66,66%) și joncțiunea rectosigmoidă ($<0,8$ ng/pg, 100%);
- valorile raportului salivar MLH1/PMS2 sunt mai mari la pacienții cu colon ascendent ($>1,55$, 77,78%), colon sigmoid ($>1,55$, 68,42%) și joncțiunea rectosigmoidă ($>1,55$, 77,78%);
- MLH1/KRAS are valori mai mari la pacienții cu adenocarcinom de colon sigmoid ($>0,012$, 73,69%) și valori mai mici la pacienții cu adenocarcinom de colon transvers și descendent ($<0,012$, 100%) și joncțiunea rectosigmoidă ($<0,012$, 77,78%).

Deoarece principalele diferențe privind dinamica biomoleculilor sunt date de forța gravitațională, morfologie și vascularizare, pentru estimarea locației sunt utilizați trei parametri derivați. Acești parametri care evaluează biodinamica fiecărui biomarker sunt reprezentați de S (suma între dublul nivelului unui biomarker în urină și nivelul biomarkerului din salivă), r1 (raportul dintre concentrația unui biomarker în sânge integral și concentrația acestuia în urină), și r2 (raportul dintre concentrația unui biomarker în sânge integral și concentrația acestuia în salivă).

Pentru fiecare parametru derivat, semnificația biologică este detaliată pe larg în secțiunea de discuții. Valorile p au fost calculate pentru fiecare parametru derivat și pentru fiecare biomarker. Aceste valori p sunt date în tabelul 3.

Tabelul 3. Valorile p pentru fiecare parametru derivat legat de biodinamica fiecărui marker

Biomarker	Derivat parametru	valoarea p	Derivat parametru	valoarea p	Derivat parametru	valoarea p
MLH1	S	0,771	r1	0,058	r2	0,853
MSH2	S	0,960	r1	0,537	r2	0,749
MSH6	S	0,364	r1	0,702	r2	0,806
PMS2	S	0,448	r1	0,806	r2	0,663
KRAS	S	0,040	r1	0,548	r2	0,540

Prin analiza valorilor parametrilor biodinamici menționați mai sus, s-au făcut câteva observații legate de locație:

- pacienții cu adenocarcinom de colon ascendent asociază $r1(\text{MSH2}) > 1,5$, $r1(\text{MSH6}) < 0,7$ și $S(\text{MSH6}) < 600$ pg/mL;
- Pacienții cu adenocarcinom de colon transvers și descendent asociază $r1(\text{MSH2}) < 1,5$, $S(\text{MSH2}) > 500$ pg/mL, $r2(\text{MSH2}) > 0,75$ și $r1(\text{KRAS}) < 0,45$;
- Pacienții cu adenocarcinom de colon sigmoid asociază $r2(\text{PMS2}) < 0,6$ și $r1(\text{KRAS}) < 1,4$;
- Pacienții cu adenocarcinom de joncțiune rectosigmoidiană asociază $r1(\text{MSH6}) < 0,5$, $S(\text{MSH6}) > 1500$ pg/mL și $r2(\text{MSH2}) < 0,75$;
- Pacienții cu adenocarcinom de rect asociază $r2(\text{PMS2}) > 0,6$ și $r1(\text{KRAS}) > 1,4$.

Toți parametrii de mai sus au fost analizați în funcție de fiecare locație și au fost unele observații. Deoarece toți biomarkerii sunt întâlniți în toate locațiile și concentrațiile lor depind de masa tumorală și de caracteristicile sale clinicopatologice, nivelurile directe nu sunt suficiente pentru diferențiere și localizarea trebuie evaluată în funcție de probabilitate. Pentru fiecare locație au fost stabilite criteriile și,

deoarece numărul de criterii îndeplinite este mai mare, probabilitatea pentru o anumită locație este și ea mai mare. Mai mult, unele locații împărtășesc niveluri similare ale unui biomarker, un raport sau un parametru derivat, astfel încât chiar și unele dintre ele care nu au avut o valoare p mică sunt utilizate pentru algoritmul de criteriu. Algoritmul este descris pe larg în secțiunea de discuții.

După stabilirea locației cu probabilitate foarte mare, aspectul brut a fost evaluat pentru corelare.

Aspectul grosier a fost descris ca vegetant (1), vegetant și ulcerat (2), ulcero-infiltrativ și infiltrativ (3) și polip malign (4). Pentru aceste 4 posibilități, valorile p calculate în raport cu toate nivelurile celor cinci biomarkeri sunt date în Tabelul 4.

Tabel 4. Valorile P calculate pentru aspectul brut și nivelurile biomarkerilor în diferite fluide biologice

Fluid biologic	Biomarker	valoarea p
Probe de sânge integral	MLH1	0,4023
	MSH2	0,5867
	MSH6	0,7683
	PMS2	0,2563
	KRAS	0,1418
Probele de urină	MLH1	0,2588
	MSH2	0,2874
	MSH6	0,0926
	PMS2	0,0320
	KRAS	0,0717
Probe de saliva	MLH1	0,5747
	MSH2	0,1557
	MSH6	0,8343
	PMS2	0,3890
	KRAS	0,9521

Din cele 15 combinații, aspectul brut părea să fie cel mai corelat cu nivelurile MSH6, PMS2 și KRAS din probele de urină. Pornind de la acești 3 biomarkeri, a fost dezvoltat un algoritm bazat pe criterii pentru a diferenția aceste 4 posibilități. Pentru această diferențiere au fost introduse trei variabile și anume $Grs1=[MSH6] \cdot [KRAS]$ ($pg \cdot \mu g/mL^2$), $Grs2=[MSH6] \cdot [KRAS]/[PMS2]$ ($pg \cdot \mu g/ (ng \cdot mL)$) și $Grs3=[MSH6] \cdot [KRAS]/[PMS2]^2$ ($ng \cdot \mu g/pg^2$). Pornind de la nivelurile biomarkerilor și de la valorile celor trei variabile, s-au făcut următoarele observații:

- Polipii maligni asociază [MSH6] urină <30 pg/mL, [PMS2] urină <10 ng/mL și [KRAS] urină < 3μg/mL;
- Pacienți cu adenocarcinom colorectal a căror masă tumorală prezintă un compus vegetant asociat Grs1 >387 ng•μg/mL², Grs2 >25 ng•μg/(pg•mL) și Grs3 >0,5 ng•μg/pg²;
- Pacienți cu adenocarcinom colorectal a căror masă tumorală nu prezintă un compus vegetant asociat Grs1 <387 ng•μg/mL², Grs2 <25 ng•μg/(pg•mL) și Grs3 <0,5 ng•μg/pg².

Dimensiunile tumorii (diametrul maxim și adâncimea maximă) au fost analizate individual pentru fiecare localizare a tumorii. În acest caz, colorectul a fost împărțit în 5 regiuni – colon ascendent (C1), colon transvers și descendent (C2 – datorită asemănărilor lor, aceste două locații au fost considerate împreună), C3 (colon sigmoid), C4 (joncțiunea rectosigmoidiană și adiacentă) și C5 (rect). Valorile P privind corelația dintre nivelul fiecărui biomarker și diametrul maxim sunt date în Tabelul 5 și pentru adâncimea maximă sunt date în Tabelul 6.

Tabelul 5. Valorile P calculate pentru diametrul maxim și nivelurile de biomarkeri în diferite fluide biologice

Fluid biologic	Biomarker	Locație				
		C1	C2	C3	C4	C5
probe de sânge integral	MLH1	0,8669	0,0652	0,2765	0,4034	0,7378
	MSH2	0,8837	0,5392	0,1267	0,3764	0,4929
	MSH6	0,4876	0,0204	0,2405	0,7609	0,2512
	PMS2	0,1623	0,4395	0,3628	0,6253	0,1689
	KRAS	0,9259	0,7824	0,7604	0,1115	0,3707
probe de urină	MLH1	0,7096	0,3948	0,6147	0,9011	0,3915
	MSH2	0,8528	0,7152	0,0881	0,6411	0,7394
	MSH6	0,7122	0,4167	0,7073	0,8052	0,1462
	PMS2	0,2391	0,7576	0,6916	0,7039	0,4293
	KRAS	0,7370	0,0010	0,8240	0,8745	0,6624
probe de salivă	MLH1	0,3647	0,0071	0,1135	0,2373	0,7911
	MSH2	0,9854	0,5659	0,1220	0,3649	0,6238
	MSH6	0,5792	0,3025	0,8692	0,2347	0,1923
	PMS2	0,7048	0,4765	0,0805	0,1941	0,8686
	KRAS	0,3972	0,0046	0,1491	0,8622	0,6808

Tabel 6. Valorile P calculate pentru adâncimea maximă și nivelurile de biomarkeri în diferite fluide biologice

Fluid biologic	Biomarker	Locație				
		C1	C2	C3	C4	C5
probe de sânge integral	MLH1	0,2631	0,3809	0,4755	0,0877	0,1425
	MSH2	0,2440	0,4272	0,0234	0,3441	0,3552
	MSH6	0,1770	0,5903	0,1245	0,0314	0,6932
	PMS2	0,7061	0,7830	0,3788	0,1853	0,0633
	KRAS	0,6150	0,1612	0,0528	0,7995	0,7339
probe de urină	MLH1	0,5234	0,3565	0,7672	0,8110	0,0781
	MSH2	0,2131	0,4006	0,0383	0,3417	0,1168
	MSH6	0,9874	0,3758	0,3372	0,7504	0,8672
	PMS2	0,4808	0,7437	0,8236	0,9154	0,8362
	KRAS	0,6203	0,7067	0,0616	0,6317	0,4282
probe de salivă	MLH1	0,5865	0,8590	0,2711	0,1487	0,0422
	MSH2	0,3892	0,8804	0,1359	0,8630	0,6078
	MSH6	0,7042	0,1386	0,6893	0,1016	0,3818
	PMS2	0,0045	0,5828	0,1415	0,0359	0,1470
	KRAS	0,1872	0,5305	0,2176	0,0309	0,7098

Pornind de la valorile p calculate pentru ambele dimensiuni maxime, au fost aleși cei mai mulți biomarkeri înrudiți și pentru aceștia au fost determinate ecuații care pot calcula cu o mică eroare acești parametri. Toate ecuațiile propuse sunt date în secțiunea de discuții.

Următorul pas se referă la corelațiile cu prezența unui compus mucinos în masa tumorală. Datorită variațiilor factorilor care influențează transferul de masă al biomoleculelor în matricea tumorală și morfologia celulelor din diferite segmente, zona colorectală a fost împărțită pentru evaluarea acestei caracteristici în trei regiuni principale – colon ascendent, transvers și descendent (Cm1), colon sigmoid (Cm1). Cm2) și joncțiunea rectosigmoidiană și rect (Cm3). Fiecare regiune a fost căutată pentru corelații cu prezența compusului mucinos, iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 7.

Tabelul 7. Corelația nivelului fiecărui biomarker din fiecare fluid biologic cu prezența mucusului

	Locație	Cm1	Cm2	Cm3
Fluid biologic	Biomarker	valoarea p	valoarea p	valoarea p
Sânge integral	MLH1	0,419	0,034	0,538
	MSH2	0,258	0,825	0,623
	MSH6	0,360	0,658	0,056
	PMS2	0,915	0,831	0,679
	KRAS	0,574	0,542	0,656
urină	MLH1	0,600	0,590	0,346
	MSH2	0,448	0,951	0,889
	MSH6	0,939	0,137	0,189
	PMS2	0,119	0,186	0,058
	KRAS	0,163	0,507	0,181
salivă	MLH1	0,754	0,329	0,826
	MSH2	0,046	0,683	0,721
	MSH6	0,393	0,257	0,059
	PMS2	0,487	0,166	0,610
	KRAS	0,391	0,526	0,371

Prezența unui compus de mucus poate fi prezisă cu un algoritm bazat pe criterii. Au fost făcute următoarele observații:

- Prezența mucusului la pacienții cu adenocarcinom colorectal localizat în Cm1 este asociată cu [PMS2] urină > 40 ng/mL, [KRAS] urină > 5μg/mL și [MSH2] saliva <180 pg/mL;
- Prezența mucusului pacienților cu adenocarcinom colorectal localizat în Cm2 este asociată cu [MLH1] sânge total >20 ng/mL, [MSH6] urină <30 pg/ml și [PMS2] urină <10 ng/ml;
- Prezența mucusului la pacienții cu adenocarcinom colorectal localizat în Cm3 este asociată cu [MSH6] sânge total >220 pg/mL, [PMS2] urină <45 ng/mL și [MSH6] saliva >280 pg/mL.

La fel de important ca prezența mucusului pentru transferul de masă al biomarkerilor este tipul de stromă. Tipul stroma este considerat ca fiind inflamator, fibros și inflamator sau hialin. Pacienții au fost evaluați pentru corelațiile cu prezența unui compus fibros prin utilizarea valorilor p. Pentru tipul de stromă, zona colorectală este considerată ca un întreg și nu este divizată. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 8.

Tabelul 8. Corelația nivelului fiecărui biomarker din fiecare fluid biologic cu prezența unui compus fibros

Fluid biologic	Biomarker	valoarea p
Sânge integral	MLH1	0,0689
	MSH2	0,0449
	MSH6	0,9916
	PMS2	0,0564
	KRAS	0,0509
urină	MLH1	0,0110
	MSH2	0,0727
	MSH6	0,0002
	PMS2	0,3525
	KRAS	0,0050
salivă	MLH1	0,0891
	MSH2	0,2519
	MSH6	0,2194
	PMS2	0,2807
	KRAS	0,9444

La fel ca și pentru prezența mucusului, prezența unui compus fibros este analizată prin utilizarea unor criterii care permit diferențierea între inflamatorii, stroma fibroasă sau fibroasă și inflamatorie. Pentru dezvoltarea criteriilor, s-a observat că un compus fibros din masa tumorală asociază [PMS2] sânge integral >90 ng/mL, [KRAS] urina <4μg/mL și valoarea produsului [MSH2] urină • [MSH6] urină >23000 (pg/mL)².

Următorul viitor care a fost analizat este reprezentat de subtipul molecular. Adenocarcinoamele colorectale sunt împărțite în epiteliale, mixte sau mezenchimale după subtip molecular. Un algoritm de diferențiere a tumorilor care prezintă un compus mezenchimat de cele care nu prezintă. Valorile p au fost calculate și sunt date în Tabelul 9.

Tabelul 9. Corelația nivelului fiecărui biomarker din fiecare fluid biologic cu prezența unui compus mezenchimal

Fluid biologic	Biomarker	valoarea p
Sânge integral	MLH1	0,2219

	MSH2	0,5725
	MSH6	0,8595
	PMS2	0,5361
	KRAS	0,3569
urină	MLH1	0,7552
	MSH2	0,6020
	MSH6	0,0265
	PMS2	0,1195
	KRAS	0,5785
salivă	MLH1	0,8100
	MSH2	0,0464
	MSH6	0,9329
	PMS2	0,7139
	KRAS	0,0729

Analizând datele, s-a observat că pacienții cu adenocarcinom colorectal a căror masă tumorală asociază un compus mezenchimal prezent [MSH6] urina >325 pg/mL, [KRAS] saliva <2,2μg/mL și [MLH1] sânge integral <25 ng/mL.

Folosind rezultatele prezentate mai sus, unele caracteristici microscopice ale masei tumorale pot fi prezise cu mare probabilitate. Prin urmare, următorul pas constă în evaluarea vaselor de sânge, a vaselor limfatice, a invaziilor perineurale și a ganglionilor limfatici. Pentru fiecare pereche de biomarker și invazie, valorile p au fost calculate și sunt date în Tabelul 10.

Tabel 10. Valorile P calculate pentru fiecare tip de invazie și nivelurile biomarkerilor în diferite fluide biologice

Fluid	Biomarker	Invazie				
		Vase de sânge	Vase limfatice	Perineurală	Nodul limfatic	% limfonoduli
Sânge	MLH1	0,6059	0,6238	0,4997	0,0285	0,4997
integral	MSH2	0,3908	0,7620	0,3507	0,0231	0,3507
	MSH6	0,1164	0,5139	0,3985	0,1467	0,3985
	PMS2	0,0434	0,5751	0,0820	0,3734	0,0820

	KRAS	0,0001	0,0009	0,0262	0,0372	0,0262
urină	MLH1	0,3833	0,7276	0,5731	0,9705	0,5731
	MSH2	0,0915	0,9905	0,4122	0,7417	0,4122
	MSH6	0,0521	0,7811	0,2438	0,8311	0,2438
	PMS2	0,5606	0,5151	0,8632	0,9334	0,8632
	KRAS	0,2637	0,3388	0,6571	0,6300	0,6571
salivă	MLH1	0,1564	0,9218	0,1627	0,7492	0,1627
	MSH2	0,5902	0,8745	0,6299	0,0944	0,6299
	MSH6	0,9995	0,9855	0,4148	0,1437	0,4148
	PMS2	0,5318	0,0859	0,0629	0,3331	0,0629
	KRAS	0,0469	0,8982	0,8182	0,4013	0,8182

Pornind de la datele din Tabelul 10, au fost selectați cei mai reprezentativi biomarkeri pentru fiecare tip de invazie și prin utilizarea nivelurilor fiecărui biomarker s-au stabilit algoritmi pentru determinarea prezenței invaziei cu mare probabilitate. Întrucât numărul de ganglioni limfatici este variabil, în funcție de dimensiunea specimenului, pentru ganglionii invadați se propune un algoritm pentru a determina procentul de ganglioni invadați la fiecare pacient cu cancer colorectal.

Observațiile din care au fost elaborate criteriile sunt:

- invazia vaselor de sânge este asociată cu [KRAS] sânge integral $>13\mu\text{g/mL}$, produs MSH urinar $P_u = [\text{MSH2}] \cdot [\text{MSH6}] >25000 \text{ (pg/mL)}^2$ și raportul MSH urinar $R_u = [\text{MSH2}]/[\text{MSH6}] >1$;
- Invazia vaselor limfatice este asociată cu [KRAS] sânge total $>8,4\mu\text{g/mL}$, [PMS2] saliva $>38 \text{ ng/mL}$ și raportul KRAS $[\text{KRAS}] \text{ sânge integral} / [\text{KRAS}] \text{ urină} >2$;
- invazia perineurală este asociată cu [PMS2] sânge integral / [PMS2] saliva $<0,45$, [PMS2] sânge integral / [KRAS] sânge integral $<0,55 \text{ ng}/\mu\text{g}$ și [PMS2] saliva $>17 \text{ ng/mL}$;
- invazia ganglionilor limfatici este asociată cu $[\text{MLH1}] \cdot [\text{KRAS}] / [\text{MSH2}] >4 \text{ ng} \cdot \mu\text{g}/(\text{pg} \cdot \text{ml})$, $[\text{MLH1}] \cdot [\text{KRAS}] >185 \text{ ng} \cdot \mu\text{g/mL}^2$ și $[\text{MLH1}] / [\text{MSH2}] >0,75 \text{ ng/pg}$;
- pentru procentul de ganglioni limfatici invadați, ecuațiile au fost elaborate și discutate pe larg în secțiunea de discuții.

Pe măsură ce au fost prezentate rezultatele privind invazia, următoarea caracteristică se referă la supraviețuirea pacienților. În proiectul nostru, pacienții au fost selectați și urmăriți pe o perioadă de trei ani. Prin urmare, evaluarea propusă a supraviețuirii se referă la supraviețuirea mai mică sau peste

un an și supraviețuirea peste sau mai puțin de doi ani. Valorile p pentru corelațiile dintre nivelul fiecărui biomarker și categoria de supraviețuire sunt date în Tabelul 11.

Tabelul 11. Valorile p pentru evaluarea ratei de supraviețuire relativ la un an și doi ani

Fluid biologic	Biomarker	vs. 1 an	vs. 2 ani
Sânge integral	MLH1	0,2809	0,2265
	MSH2	0,0012	0,0467
	MSH6	0,0946	0,7323
	PMS2	0,9671	0,0642
	KRAS	0,6310	0,6429
urină	MLH1	0,1594	0,0575
	MSH2	0,6634	0,0717
	MSH6	0,7449	0,0005
	PMS2	0,8014	0,2165
	KRAS	0,2905	0,2361
salivă	MLH1	0,0380	0,0632
	MSH2	0,4368	0,0397
	MSH6	0,0786	0,4033
	PMS2	0,8034	0,8257
	KRAS	0,6438	0,3627

Analizând datele, se dau următoarele observații:

- pacienții care au supraviețuit mai puțin de un an asociază [MSH2] sânge integral >340 pg/ml și [MLH1] saliva >52 ng/ml;
- pacienții care au supraviețuit între un an și doi ani asociază [MSH2] sânge integral <340 pg/mL și [MLH1] saliva <52 ng/ml, dar [MSH6] urină <260 pg/ml și [MSH2] saliva >140 pg/ml;
- pacienții care au supraviețuit mai mult de doi ani asociază [MSH6] urina >260 pg/ml și [MSH2] saliva <140 pg/ml.

Ultimele corelații au fost făcute cu elementele stadializării TNM. Au fost dezvoltate algoritmi pentru stabilirea valorii pT și evaluarea pN și pM.

Toți pacienții incluși în proiectul nostru au fost cel puțin pT2 ca majoritatea pacienților colorectali care vin la medic. Prin urmare, algoritmul propus evaluează cu mare probabilitate doar pacienții cu pT2, pT3, pT4a sau pT4b și se bazează pe excluderea pas cu pas a fiecărei valori pentru pT. În primul

rând, se verifică criteriile stabilite pentru pT2 și, dacă nu sunt verificate, a implicat că pT-ul este de cel puțin 3 și așa mai departe. Pentru fiecare evaluare pas cu pas, valorile p pentru diferențierea unui anumit pacienți cu valoare pT de pacienții cu valori pT rămași au fost calculate și sunt date în Tabelul 12.

Tabelul 12. Valori p pentru evaluarea valorii pT

Fluid biologic	Biomarker	pT2 vs restul	pT3 vs pT4	pT 4a vs pT 4b
Sânge integral	MLH1	0,6228	0,3825	0,3254
	MSH2	0,5240	0,6135	0,5830
	MSH6	0,0972	0,2645	0,8704
	PMS2	0,3195	0,1473	0,0559
	KRAS	0,4826	0,1215	0,2049
urină	MLH1	0,9645	0,2080	0,1321
	MSH2	0,9224	0,2883	0,0320
	MSH6	0,6914	0,4597	0,2988
	PMS2	0,9863	0,1849	0,2132
	KRAS	0,6178	0,0779	0,8858
salivă	MLH1	0,4619	0,1598	0,4662
	MSH2	0,2068	0,8527	0,4951
	MSH6	0,6980	0,0862	0,9500
	PMS2	0,0491	0,9013	0,1562
	KRAS	0,4797	0,5990	0,1220

Observațiile care permit elaborarea criteriilor sunt:

- Pacienții cu adenocarcinom colorectal pT2 asociază [MSH6] salivă • [PMS2] salivă >50000 pg • ng/(mL)², [MSH6] salivă • [PMS2] salivă / [MSH2] salivă >45 ng/ml și [MSH2] salivă • [PMS2] salivă >50000 pg • ng/(mL)²;
- Pacienții cu adenocarcinom colorectal pT3 asociază [PMS2] sânge integral / [MSH6] sânge integral <1,2 ng/pg, [PMS2] sânge integral • [KRAS] sânge integral / [MSH6] sânge integral <14,5 ng • μg/(pg • mL), [MLH1] salivă <30 ng/mL și [KRAS] urină <4 μg/mL;
- Pacienții cu adenocarcinom colorectal pT4b (în comparație cu pacienții cu adenocarcinom colorectal pT4a) asociază [PMS2] sânge integral <25 ng/mL, [PMS2] salivă >18 ng/ml, [PMS2] sânge integral / [KRAS] sânge integral <1,5 ng/μg și [PMS2] salivă / [KRAS] salivă <5,5 ng/μg.

Deoarece numărul de ganglioni limfatici găsiți este variabil, valoarea pN din acest studiu a fost evaluată prin procentul de ganglioni invadați și prezența depozitelor. Valoarea pM este evaluată prin prezența metastazelor. Valoarea exactă a pN poate fi evaluată dacă s-ar dezvolta un model matematic al vaselor limfatice și distribuției ganglionilor limfatici în întreaga zonă colorectală. Prin urmare, numărul de ganglioni limfatici dintr-un eșantion de excizie curativă cu procentul de ganglioni limfatici invadați ar permite aproximarea numărului de ganglioni invadați. Aceasta este în acest moment o perspectivă de viitor. Prezența depozitelor tumorale este considerată independentă de invazia ganglionilor limfatici. Prin urmare, se evaluează separat. Metastazele au fost evaluate în momentul diagnosticării și în perioada de urmărire. Pacienții care nu prezentau metastaze la momentul diagnosticului sau în perioada de urmărire au fost considerați ca neavând metastaze. Prezența metastazelor a fost evaluată indiferent de locul metastazelor. Valorile p pentru corelațiile nivelului fiecărui biomarker din fiecare fluid biologic și caracteristicile selectate sunt date în Tabelul 13.

Tabelul 13. Valorile p pentru evaluarea pN și pM

Fluid biologic	Biomarker	Tumora depozite	Metastaze
Sânge integral	MLH1	0,9885	0,5626
	MSH2	0,6009	0,4230
	MSH6	0,4793	0,1739
	PMS2	0,0554	0,1835
	KRAS	0,9294	0,0024
urină	MLH1	0,4575	0,1646
	MSH2	0,9981	0,2737
	MSH6	0,5285	0,1579
	PMS2	0,3419	0,1139
	KRAS	0,0334	0,0002
salivă	MLH1	0,9423	0,0130
	MSH2	0,2486	0,9907
	MSH6	0,5150	0,7827
	PMS2	0,9199	0,4167
	KRAS	0,5323	0,6541

Observațiile privind prezența depozitelor tumorale și prezența metastazelor sunt:

- Prezența depozitelor tumorale este legată de [PMS2] sânge integral > 450 ng/ml, [PMS2] urină <32 ng/ml, [KRAS] urină <1,75μg/mL și [MSH2] saliva <125 pg/mL;
- prezența metastazelor este legată de [KRAS]/[MSH6] >0,05μg/pg, [KRAS]/[PMS2] >0,34μg/ng și [PMS2] <14 ng/mL.

Toți algoritmi și ecuațiile dezvoltate vor fi descriși pe larg în secțiunea de discuții. Prin aplicarea acestora, selectivitatea pentru fiecare caracteristică este dată în Tabelul 14.

Tabelul 14. Sensibilitate și specificitate în predicția caracteristicilor clinicopatologice

Caracteristica clinicopatologică	Caracteristică	Sensibilitate	Specificitate
Localizarea tumorii	Colon ascendent	100%	93,48%
	Colon transvers	100%	91,66%
	Colonul descendent	100%	91,66%
	Colon sigmoid	87,50%	89,47%
	Joncțiunea rectosigmoidiană	100%	95,74%
	Rect	89,47%	87,50%
Aspect grosolan	Polipi maligni	100%	98,60%
	Vegetant	88%	66,60%
	Vegetant și ulcerat	66,60%	76%
	Non-vegetant	73,91%	71,43%
Prezența mucusului	Tumora localizata Cm1	87,50%	100,00%
	Tumora localizata Cm2	100%	78,58%
	Tumora localizata Cm3	77,77%	88,24%
	Per total	86,96%	87,18%
Tipul de stromă	Componentă fibroasă	86,11%	80,95%
	Componentă inflamatorie	80,95%	86,11%
Subtipul molecular	Componentă mezenchimală	93,75%	72,22%
Invazii	Vase de sânge	84,21%	79,37%
	Vase limfatice	74,19%	71,42%
	Perineurală	84,21%	71,70%
	Ganglionilor limfatici	72,41%	75,76%
	vs. 1 an	90,48%	77,78%

Rata de supraviețuire	vs. 2 ani	100%	86,84%
Sistem de clasificare TNM	pT2	90%	89,09%
	pT3	89,66%	89,47%
	pT4a vs. pT4b	100%	81,25%
	Depozite tumorale	80%	91,84%
	Metastaze	90%	77,27%

După cum se observă din Tabelul 14 de mai sus, toți algoritmi de determinare a caracteristicilor clinicopatologice asociază sensibilități și specificități ridicate. Descoperirea de noi biomarkeri și noi algoritmi pentru a prezice caracteristicile clinicopatologice cu sensibilități și specificități mai mari sunt perspective de viitor pentru studii mai mari.

Appendix 1

PARTICIPĂRI LA CONFERINȚE NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE

1. Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Alexandru Adrian Bratei, Damaris-Cristina Gheorghe, Stochastic sensors as new tools for the assay of CA72-4, CA19-9, CA12-5 and CEA in biological samples, [Transnational Multiplier event of REALME](#) project - A Mixed Reality E-Learning Platform Dedicated for Medical Engineering, 18 – 19 OCTOBER 2023, National University of Science and Technology POLITEHNICA Bucharest. (POSTER)
2. Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Alexandru Adrian Bratei, Damaris-Cristina Gheorghe, Bianca Maria Tuchiu, OP9-5-3. DNA Mismatch Repair Assessment in Gastric and Colon Cancers Using Stochastic Microdisks, [Euroanalysis XXI](#), Geneva, Switzerland, 27-31 August, 2023. (ORAL PRESENTATION)
3. Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Alexandru Adrian Bratei, Damaris-Cristina Gheorghe, PS2-22. Stochastic sensors as new tools for the assay of CA72-4, CA19-9, CA12-5 and CEA in biological samples, [Euroanalysis XXI](#), p. 254, Geneva, Switzerland, 27-31 August, 2023. (POSTER)
4. Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Damaris Cristina Gheorghe, Alexandru A A Bratei, Ruxandra Maria Mihai, (Invited) New Challenges in Early Diagnosis of Gastric Cancer, [241st ECS Meeting](#), May 29 – June 2, 2022, Vancouver, Canada (ORAL PRESENTATION)

Appendix 2

ARTICOLE PUBLICATE ÎN JURNALE PEER-REVIEWED

Total IF = 38.5

This PhD thesis is based on the following papers:

- I. Stefan-van Staden, R.-I.; **Bratei, A.A.** et al. Miniplatforms for Screening Biological Samples for KRAS and Four Mismatch Repair Proteins as New Tools for Fast Screening for Gastric and Colon Cancers. *J. Electrochem. Soc.* **2023**, 170, 057510. DOI: 10.1149/1945-7111/acd358. IF=3.9
- II. Stefan-van Staden, R.-I., **Bratei, A.A.** et al. New stochastic devices for simultaneous analysis of mismatch repair proteins and KRAS in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2023**, 115630, ISSN 0731-7085. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115630>. IF= 3.4
- III. Stefan-van Staden, R.-I., **Bratei, A.A.** et al. Bioanalysis of MMR and KRAS – a key factor in diagnosis of colorectal cancer *RSC Adv.* **2023**, 13, 24086. DOI: 10.1039/d3ra04260j. IF= 3.9
- IV. Stefan-van Staden, R.-I.; **Bratei, A.A.** et al. DNA Mismatch Repair Assessment in Gastric and Colon Cancers Using Stochastic Microdisks. *ChemElectroChem* **2023**, 10, e202300273. <https://doi.org/10.1002/celec.202300273>. IF=4
- V. **Bratei, A.A.**; Stefan-van Staden, R.-I. et al. Molecular Differentiation of Cathepsins B and D, and of p53 Protein, and their Quantitative Assay in Biological Samples. *J. Electrochem. Soc.* **2023**, 170, 097503. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/acf622>. IF=3.9
- VI. **Bratei, A.A.**; Stefan-van Staden, R.-I.; Ilie-Mihai, R.-M.; Gheorghe, D.-C. Simultaneous Assay of CA 72-4, CA 19-9, CEA and CA 125 in Biological Samples Using Needle Three-Dimensional Stochastic Microsensors. *Sensors* **2023**, 23, 8046. <https://doi.org/10.3390/s23198046>. IF=3.9
- VII. **Bratei, A.A.**; Stefan-van Staden R.-I., Ilie-Mihai R.-M. Electroanalysis of maspin in whole blood. *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, ISSN 1454-2331, **2024**. IF=0.5.
- VIII. **Bratei, A.A.**; Stefan-van Staden, R.-I. Correlation between Maspin Levels in Different Biological Samples and Pathologic Features in Colorectal Adenocarcinomas. *Life* **2023**, 13, 1060. <https://doi.org/10.3390/life13041060>. IF=3.2
- IX. **Bratei, A.A.**; Stefan-van Staden, R.-I. Minimally Invasive and Fast Diagnosis of Gastric Cancer Based on Maspin Levels in Different Biological Samples. *Diagnostics* **2023**, 13, 1857. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13111857>. IF=3.6
- X. **Bratei, A.A.**; Stefan-van Staden, R.-I. Differentiation between Gastric and Colorectal Adenocarcinomas Based on Maspin, MLH1, PMS2 and K-Ras Concentrations Determined Using Stochastic Sensors. *Gastrointest. Disord.* **2023**, 5, 487-499. IF=0.7

- XI. **Bratei, A.A.**; Stefan-van Staden, R.-I. Correlations between MSH2 and MSH6 Concentrations in Different Biological Fluids and Clinicopathological Features in Colorectal Adenocarcinoma Patients and Their Contribution to Fast and Early Diagnosis of Colorectal Adenocarcinoma. *Biomedicines* **2023**, *11*, 3213. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11123213>. **IF=4.7**
- XII. **Bratei, A.A.**, & Stefan-van Staden, R.-I. (2023). The Importance of KRAS Quantification for a Clinicopathological Characterization in Colorectal Cancer Patients. *Medinformatics*.
- XIII. **Bratei, A.A.**; Stefan-van Staden R.-I. Pathological features of colorectal adenocarcinoma patients related to MLH1. *Cellular and Molecular Bioengineering* **2024**. **IF=2.8**

ARTICOLE TRIMISE SPRE PUBLICARE ÎN REVISTE ISI

- I. **Bratei, A.A.**; Stefan-van Staden, R.-I. Fast diagnosis and pathological features related to MLH1 and PMS2 in gastric cancer patients and to PMS2 in colorectal cancer patients.
- II. **Bratei, A.A.**; Stefan-van Staden, R.-I. Evaluation of clinicopathological features in colorectal adenocarcinoma patients based on the concentrations of MMR proteins and KRAS.

Bibliografie selectivă

- [5] Coros, M.; Pruneanu, S.; Stefan-van Staden, R.-I. Recent progress in the graphene-based electrochemical sensors and biosensors. A review. *J. Electrochem. Soc.* **2020**, *167*, 037528.
- [6] Gu, L.Q.; Braha, O.; Conlon, S.; Cheley, S.; Bayley, H. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature* **1999**, *398*, 686–690.
- [7] 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.* **2015**, *148*, 64–69.
- [8] Ilie-Mihai, R.M.; Gheorghe, D.C.; Stefan-van Staden, R.I.; Lungu-Moscalu, A.; Pruneanu, S.M.; van Staden, J.F. Fast screening method of biological samples based on needle stochastic sensors for early detection of gastric cancer. *Rev. Chim.* **2021**, *72*, 22–34.
- [9] Ilie-Mihai, R.M.; Gheorghe, S.S.; Stefan-van Staden, R.-I.; Bratei, A. Electroanalysis of interleukins 1 β , 6, and 12 in biological samples using a needle stochastic sensor based on nanodiamond paste. *Electroanalysis* **2021**, *33*, 6–10.
- [10] Ilie-Mihai, R.M.; Stefan-van Staden, R.-I.; Lungu-Moscalu, A.; Pogacean, F.; Pruneanu, S.M. Sulphur Doped Graphenes Based 3D-Needle Stochastic Sensors as New Tools for Biomedical Analysis. *J. Electrochem. Soc.* **2021**, *168*, 037509.
- [15] Stefan-van Staden, R.-I.; Ilie-Mihai, R.M.; Pogacean, F.; Pruneanu, S. Graphene-based stochastic sensors for pattern recognition of gastric cancer biomarkers in biological fluids. *J. Porph. Phthal.* **2019**, *23*, 1365–1370.
- [16] Stefan-van Staden, R.-I.; Negut, C.C.; Gheorghe, S.S.; Ciorîță, A. 3D stochastic microsensors for molecular recognition and determination of heregulin- α in biological samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, *413*, 3487–3492.
- [17] Stefan-van Staden, R.I.; Boga, I.M.; Ilie-Mihai, R.M.; Gheorghe, D.C.; Coros, M.; Pruneanu, S. Stochastic microsensors based on modified graphene for pattern recognition of maspin in biological samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2022**, *414*, 3667–3673.
- [18] Stefan-van Staden, R.I.; Comnea-Stancu, I.R.; Surdu-Bob, C.C. Molecular Screening of Blood Samples for the Simultaneous Detection of CEA, HER-1, NSE, CYFRA 21-1 Using Stochastic Sensors. *J. Electrochem. Soc.* **2017**, *164*, B267–B273.
- [19] Stefan-van Staden, R.I.; Gheorghe, D.C.; Ilie-Mihai, R.M.; Barbu-Tudoran, L.; Pruneanu, S.M. Stochastic biosensors based on N and S-doped graphene for the enantioanalysis of aspartic acid in biological samples. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 23301–23309.

- [20] Stefan-van Staden, R.I.; Gheorghe, S.S.; Ilie-Mihai, R.M.; Badulescu, M. Disposable Stochastic Sensor Based on Deposition of a Nanolayer of Silver on Silk for Molecular Recognition of Specific Biomarkers. *J. Electrochem. Soc.* **2021**, *168*, 037515.
- [21] Stefan-van Staden, R.I.; Ilie-Mihai, R.M.; Magerusan, L.; Coros, M.; Pruneanu, S. Enantioanalysis of glutamine—A key factor in establishing the metabolomics process in gastric cancer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412*, 3199–3207.
- [91] Baniias, L.; Gurzu, S.; Kovacs, Z.; Bara, T.; Bara, T., Jr.; Jung, I. Nuclear maspin expression: A biomarker for budding assessment in colorectal cancer specimens. *Pathol. Res. Pract.* **2017**, *213*, 1227–1230.
- [92] Baniias, L.; Jung, I.; Bara, T.; Fulop, Z.; Simu, P.; Simu, I.; Satala, C.; Gurzu, S. Immunohistochemical-based molecular subtyping of colorectal carcinoma using maspin and markers of epithelial-mesenchymal transition. *Oncol. Lett.* **2020**, *19*, 1487–1495.
- [93] Baniias, L.; Jung, I.; Gurzu, S. Subcellular expression of maspin—from normal tissue to tumor cells. *World J. Meta-Anal.* **2019**, *7*, 142–155.
- [102] Gurzu, S.; Bara, T.; Molnar, C.; Bara, T., Jr.; Butiurca, V.; Beres, H.; Savoji, S.; Jung, I. The epithelial-mesenchymal transition induces aggressivity of mucinous cystic neoplasm of the pancreas with neuroendocrine component: An immunohistochemistry study. *Pathol. Res. Pract.* **2019**, *215*, 82–89.
- [103] Gurzu, S.; Ciortea, D.; Ember, I.; Jung, I. The possible role of Mena protein and its splicing-derived variants in embryogenesis, carcinogenesis, and tumor invasion: A systematic review of the literature. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 365192.
- [104] Gurzu, S.; Copotoiu, C.; Tugui, A.; Kwizera, C.; Szodorai, R.; Jung, I. Primary gastric choriocarcinoma—a rare and aggressive tumor with multilineage differentiation: A case report. *World. J. Clin. Cases* **2019**, *7*, 1837–1843.
- [105] Gurzu, S.; Fetyko, A.M.; Bara, T.; Baniias, L.; Butiurca, V.O.; Bara, T., Jr.; Tudorache, V.; Jung, I. Gastrointestinal mixed adenoneuroendocrine carcinoma (MANEC): An immunohistochemistry study of 13 microsatellite stable cases. *Pathol. Res. Pract.* **2019**, *215*, 152697.
- [106] Gurzu, S.; Kadar, Z.; Bara, T.; Bara, T., Jr.; Tamasi, A.; Azamfirei, L.; Jung, I. Mixed adenoneuroendocrine carcinoma (MANEC) of gastrointestinal tract: Report of two cases and review of the literature. *World. J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 1329–1333.
- [107] Gurzu, S.; Szentirmay, Z.; Popa, D.; Jung, I. Practical value of the new system for Maspin assessment, in colorectal cancer. *Neoplasma* **2013**, *60*, 373–383.

- [108] Gurzu, S.I.; Sugimura, H.; Stefan-van Staden, R.I.; Yamada, H.; Natsume, H.; Iwashita, Y.; Szodorai, R.; Szederjesi, J. Maspin subcellular expression of wild-type- and mutant TP53 gastric cancers. *World. J. Gastrointest. Oncol.* **2020**, *12*, 741–755.
- [111] Kovacs, Z.; Jung, I.; Szalman, K.; Baniyas, L.; Bara, T.J.; Gurzu, S. Interaction of arylsulfatases A and B with maspin: A possible explanation for dysregulation of tumor cell metabolism and invasive potential of colorectal cancer. *World. J. Clin. Cases* **2019**, *7*, 3990–4003.
- [123] Turdean, S.G.; Gurzu, S.; Jung, I.; Neagoe, R.M.; Sala, D. Unexpected maspin immunoreactivity in Merkel cell carcinoma. *Diagn. Pathol.* **2015**, *10*, 206.