

Contract nr. 600PED/2022; etapa nr. 1/2022

PN-III-P2-2.1-PED-2021-0390

**INSTRUMENTE ȘI TESTE DE SCREENING PENTRU DIAGNOSTICAREA
PRECOCE A CANCERULUI GASTRIC**

Raport Științific

Etapa 1

A) Design-ul și caracterizarea senzorilor stocastici

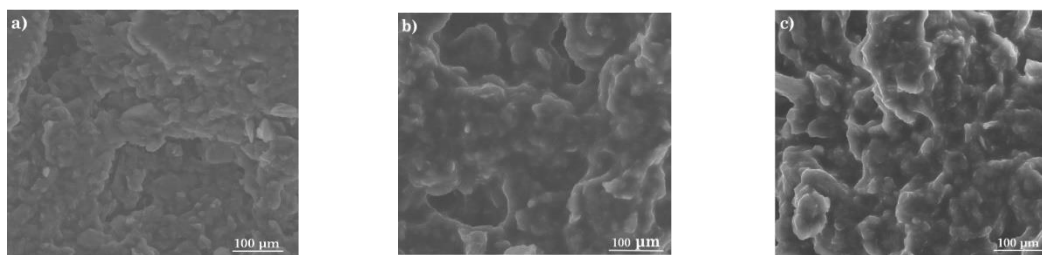
Materialele nanostructurate din clasa oleamidelor au fost luate în considerare ca modificatori pentru proiectarea senzorului stocastic funcțional. Compușii din această clasă vor fi aleși datorită dimensiunii, formei și stereochimiei lor. Pentru proiectarea senzorilor au fost alese materiale pe bază de carbon, cum ar fi nanografena, grafena și grafena redusă. Criteriul fundamental de selecție a fost acela că acestea pot păstra o formă previzibilă pentru canale, care sunt necesare pentru fiabilitatea senzorilor stocastici.

Design-ul senzorilor

Pentru proiectarea senzorilor, pudra de grafenă, grafit și nanopulbere de grafenă au fost amestecate cu ulei de parafină pentru a obține o pastă omogenă. Modificarea celor trei paste a fost realizată cu ajutorul unei soluții de oleamidă.

Caracterizarea morfologică a pastelor

Morfologia de suprafață a pastelor obținute a fost observată cu ajutorul unui microscop cu scanare electronică (SEM) (Inspect S, FEI Company Netherlands). În Figura sunt prezentate caracterizările SEM tipice ale N2-Grafitului, N2-Grafenei și N2-nanopulbera de Grafenă. După cum se poate observa, în cazul pastelor pe bază de grafit și grafenă, morfologia suprafeței relevă particule aglomerate în formațiuni asimetrice. Mai mult, integrarea nanoparticulelor în matricea de grafenă poate fi observată.



Imagini SEM ale pastelor N2-Grafit, N2-Grafena și N2-Grafenă sub formă de nanopulbere.

B) Testarea HER-3 și HER-4 utilizând senzori stocastici

Pentru a putea detecta cancerul gastric în stadii incipiente, pentru a crește numărul de biomarkeri care pot fi detectați din diferite tipuri de probe biologice, utilizând o metodă minim invazivă de obținere a acestor probe și pentru a valida faptul că senzorii stocastici sunt capabili să detecteze un panel de biomarkeri din probe de sânge integral, urină, salivă și țesuturi, trebuie studiat un număr sporit de biomarkeri.

Printre biomarkerii clasici despre care se știe că au o legatură cu cancerul gastric și care au fost studiați, există unele proteine despre care se știe prea puțin că au vreo legătură cu cancerul gastric, care sunt eliberate în cantități mici în sistemul circulator al pacienților afectați de cancer gastric.

Deoarece există puține cunoștințe despre relația dintre HER3 și HER4 și simptomele clinice patologice, precum și despre rolul pe care HER3 și HER4 îl joacă în dezvoltarea cancerului gastric, am decis să analizăm un grup de doi biomarkeri, HER-3 și HER-4, despre care nu se știe că sunt specifici pentru cancerul gastric.

În acest studiu au fost utilizate patru tipuri diferite de probe biologice de la pacienți care fuseseră deja diagnosticați cu cancer gastric.

Toate măsurătorile au fost înregistrate cu ajutorul unui dispozitiv EmStatpico de la PalmSens, care a fost conectat la un laptop. De asemenea, experimentul a utilizat o celulă electrochimică cu trei electrozi. Senzorii stocastici propuși sunt utilizați ca electrozi de lucru în sistemul cu trei electrozi.

Caracterizarea morfologică a pastelor

SEM a fost utilizat pentru a efectua o investigație privind analiza calitativă a materialelor care au fost cercetate. Figurile ilustrează morfologia suprafeței AuNPs/ α -CD-nGr (a), AuNPS-nGr (b) și Cu/ α -CD-nGr sferoidal (c). În Figurile (a) și 3(b), se observă că morfologiile de suprafață ale pastelor sunt compuse din straturi multiple de fulgi de formă neregulată de diferite dimensiuni. Pe de altă parte, în cazul pastelor pe bază de Cu sferoidal din Figura 3(c), se observă că foițele orientate aleatoriu se suprapun pentru a forma un cadru poros tridimensional.

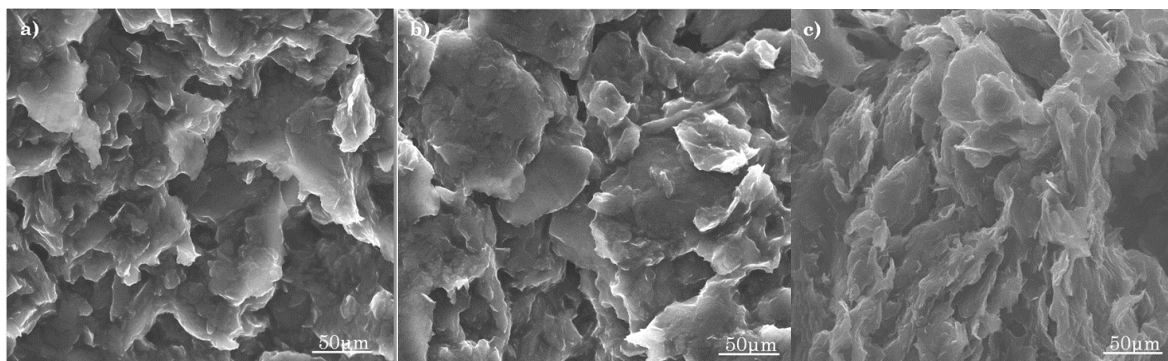


Fig. 3 Caracterizările SEM ale celor trei senzori pe bază de a) AuNPs/ α -CD-nGr, b) AuNPS-nGr și c) Sferoidal Cu/ α -CD-nGr.

Design-ul senzorilor

Pentru a crea cei doi senzori stocastici, s-a amestecat pulberea de nanografenă și o soluție de α -CD. Pentru primul senzor, s-a creat o pastă omogenă prin amestecarea de nanografene cu α -CD și ulei de parafină. Pentru a modifica pasta s-au folosit AuNPs. Aceleași matrici și Cu sferic au fost utilizate ca modificatori pentru cel de-al doilea senzor. Acești modificatori au fost folosiți pentru a crea canalele necesare pentru a obține semnalele corecte pentru senzorii stocastici, deoarece senzorul gol nu avea un semnal stocastic. Un fir de argint a unit cele două paste cu circuitul exterior al celulei electrochimice. Fiecare pastă modificată a fost introdusă într-un tub realizat din plastic neconductor.

Caracteristicile de răspuns și validarea senzorilor

Determinarea celor doi biomarkeri a fost efectuată simultan cu ajutorul senzorilor modificați. Deși proteinele au fost analizate în același timp, ele au fost identificate din diagramă prin semnătura proprie. Astfel, senzorii stocastici sunt capabili să detecteze un număr de molecule

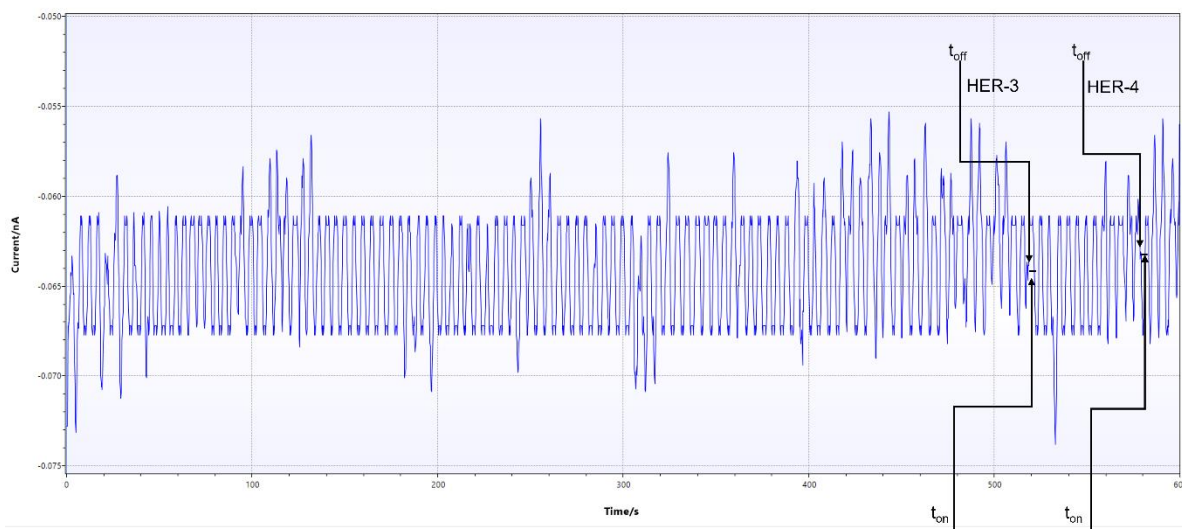
în același timp, datorită faptului că fiecare analit are propria semnătură care îi permite să fie identificat în mod unic față de alți analiți.

Tabelul 1. Caracteristicile de performanță ale senzorilor stocastici pentru analiza HER3 și HER4

Senzori stocastici	Domeniu de concentrație de lucru (g mL ⁻¹)	Ecuția de calibrare și r*	t _{off} (s)	Sensibilitate (s ⁻¹ /μg mL ⁻¹)	Limită de determinare (g mL ⁻¹)
HER-3					
Cu/alpha-CD-nGr	1x10 ⁻¹⁵ -1x10 ⁻⁹	1/ton=0.24+3.89x10 ⁶ C R=0.9997	1.2	3.89x10 ⁶	1x10 ⁻¹⁵
AuNPs/ alpha-CD-nGr	1x10 ⁻¹⁰ -1x10 ⁻⁸	1/ton=0.82+84.17C R=0.9999	1.9	84.17	1x10 ⁻¹⁰
HER-4					
Cu/alpha-CD-nGr	1x10 ⁻¹⁵ -1x10 ⁻⁸	1/ton=0.22+6.17x10 ⁶ C R=0.9999	2.3	6.17x10 ⁶	1x10 ⁻¹⁵
AuNPs/ alpha-CD-nGr	1x10 ⁻¹⁵ -1x10 ⁻⁹	1/ton=0.21+8.98x10 ⁶ C R=0.9999	1.1	8.98x10 ⁶	1x10 ⁻¹⁵

* <1/t_{on}> = s⁻¹; <C> - concentrație = μg mL⁻¹; <r> - coeficient de corelație

Din valoarea semnăturii distinctive (t_{off}) a fiecărui analit, se pot obține caracteristicile de răspuns ale senzorilor, cum ar fi domeniul liniar de concentrație, sensibilitatea și limitele de determinare. Cei doi senzori modificați au prezentat un domeniu larg de concentrație, valori ridicate ale sensibilității și limite de determinare scăzute, sub ordinul de mărime pmol/L.



Exemplu de recunoaștere a modelelor HER-3 și HER-4 în probe de sânge integral, utilizând senzori stocastici.

Etapă de validare a senzorilor a fost realizată prin analiza a patru tipuri diferite de probe biologice. S-au obținut diagrame tipice și în fiecare diagramă obținută în urma analizei fiecărei probe au fost observate semnăturile celor doi biomarkeri.

C. Senzori stocastici pentru detectarea unui panel de biomarkeri pentru cancerul gastric

Depistarea cancerului de stomac într-un stadiu incipient este extrem de importantă, deoarece numai în acest moment este posibilă creșterea ratei globale de supraviețuire. Procedurile de screening care sunt rapide, nu sunt prea intruzive sau poate chiar neinvazive pot fi utile în detectarea timpurie a biomarkerilor în probele biologice.

Aproximativ 40 de ani de cercetare au fost dedicați înțelegerii legăturii dintre catepsine și creșterile maligne. Distrugerea și modificarea matricei extracelulare (ECM) în micro-mediul tumoral este accelerată de prezența mai multor catepsine, care contribuie la dezvoltarea și invazia tumorală. Un nivel crescut de catepsine este, în general, legat de un prognostic mai prost.

Suprareglarea catepsinei B se corelează cu creșterea tumorii și cu un prognostic negativ în fazele T, N și TNM ale dezvoltării tumorale. În plus, expresia scăzută a lamininei cauzată de expresia crescută a catepsinei B facilitează invazia și metastazarea celulelor canceroase gastrice.

Deși s-a dovedit că proteina p53 poate stimula în mod direct scurgerea proteazelor de catepsină din lizozom, inducând astfel în mod direct moartea celulară, se cunosc foarte puține lucruri

despre parametrii care determină pragul la care lizozomul poate deveni permeabilizat. S-ar părea că nivelurile de expresie ale catepsin proteazelor pot juca un rol semnificativ în acest proces. p53 este responsabil pentru reglarea transcripțională a unora dintre aceste proteaze.

Proteazele catepsine sunt capabile să moduleze matricea extracelulară în timpul progresiei unor tipuri de cancer. Catepsina proteazele pot fi prezente la suprafața celulară a anumitor celule canceroase.

De exemplu, s-a constatat o expresie crescută a catepsinei D în fața invazivă a tumorilor de carcinom cu celule scuamoase esofagiene. Aceasta este o caracteristică care este, de asemenea, frecvent întâlnită în carcinomul gastric și în alte tipuri de cancer digestiv. Este interesant de observat că localizarea catepsinei D se poate schimba de la lizozomi la suprafața celulei și că această schimbare chiar poate avea loc.

Există multe tipuri de cancer, inclusiv carcinoamele gastrice, colorectale, pancreatice și hepatocelulare, care pot determina creșterea nivelului de CEA. CA19-9 este o glicoproteină care este strâns legată de dezvoltarea tumorilor canceroase și este frecvent aplicată în mediul clinic ca marker de diagnostic pentru cancerul pancreasului, ale tractului colorectal și ale stomacului.

În cazul cancerului gastric avansat, s-au constatat niveluri crescute de CA125 și CA72-4, pe lângă cei doi markeri frecvenți CEA și CA19-9. Pe de altă parte, nu toți acești markeri sunt utilizați în rutina de analize de bază, deoarece nu există suficiente date clinice care să susțină utilitatea lor. Este bine stabilit faptul că atât inflamația peritoneală, cât și carcinomatoza duc la o creștere a nivelului seric al CA125. Deși s-a demonstrat că nivelurile serice de CA72-4 sunt mai ridicate în stadiile avansate ale cancerului gastric, valoarea clinică a CA72-4 în metastazele peritoneale este încă necunoscută.

Design-ul și caracteristicile de răspuns ale senzorilor

Pentru determinarea acestor biomarkeri, au fost concepuți, caracterizați și validați senzori stocastici folosind probe biologice. Utilizând metoda diluție în serie, au fost create soluții de catepsină B, catepsină D, CEA, CA19-9, p53, CA72-4, CA12-5. Pentru tamponarea tuturor soluțiilor s-a folosit soluție salină tampon fosfat (PBS) cu un pH de 7,50. Soluțiile de catepsină B, catepsină D, CEA, CA19-9, p53, CA72-4, CA12-5 au fost păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8 grade Celsius atunci când nu au fost utilizate. După ce microsenzorii au fost proiectați, aceștia au fost plasați în interiorul unei celule care conținea soluții de analit în concentrații variabile. Am reușit să obținem ecuații de calibrare pentru fiecare dintre

microsenzori. Pentru determinarea ecuațiilor de calibrare a fost utilizată metoda regresiei liniare. Valoarea lui t_{off} , care reprezintă semnăturile analiților, este cea care este utilizată pentru a determina cât de selectivi sunt senzorii stocastici. În cazul în care semnăturile analiților pot fi monitorizate cu același senzor stocastic, dar produc rezultate diferite, acest lucru indică faptul că senzorul este selectiv. Selectivitatea senzorilor stocastici sugerați a fost demonstrată prin semnăturile care au fost prezentate pentru catepsina B, catepsina D, CEA, CA19-9, p53, CA72-4, CA12-5.

Au fost aleși doi senzori pe bază de nanopulbere de diamant și grafena pentru analiza catepsinei B, catepsinei D și p53. Pentru obținerea unei paste omogene, la pulbere s-a adăugat ulei de parafină. În continuare, pastele de diamant și nanografene au fost modificate cu soluție de clorură de 2,3,7,8,12,12,17,18 -Octaetil-21H,23H-porfirină de mangan (III). Fiecare probă de pastă diferită a fost plasată în propriul său tub de plastic care nu conduce electricitatea. S-a folosit un fir de argint pentru a conecta senzorii cu paste la circuitul exterior al celulei electrochimice.

Tabelul 2. Tabelul caracteristicilor de răspuns ale senzorilor stocastici pentru testarea catepsinei B, a catepsinei D și a p53

Senzori stocastici	Domeniu de concentrație de lucru (g mL^{-1})	Ecuația de calibrare și r^*	t_{off} (s)
Catepsina B			
Mn(III)Porf/nGR	7.00×10^{-15} - 7.00×10^{-6}	$1/\text{ton} = 0.07 + 2.35 \times 10^4 C$ $R = 0.9898$	1.4
Mn(III)Porf/DP	7.00×10^{-15} - 7.00×10^{-6}	$1/\text{ton} = 0.04 + 2.50 \times 10^4 C$ $R = 0.9999$	1.0
Catepsina D			
Mn(III)Porf/nGR	2.50×10^{-13} - 2.50×10^{-8}	$1/\text{ton} = 0.07 + 2.76 \times 10^6 C$ $R = 0.9936$	1.0
Mn(III)Porf/DP	2.50×10^{-15} - 2.50×10^{-6}	$1/\text{ton} = 0.03 + 5.99 \times 10^3 C$ $R = 0.9943$	1.8
p53			
Mn(III)Porf/nGR	1.28×10^{-11} - 1.00×10^{-6}	$1/\text{ton} = 0.03 + 7.94 \times 10^4 C$ $R = 0.9955$	1.8
Mn(III)Porf/DP	2.56×10^{-12} - 5.00×10^{-6}	$1/\text{ton} = 0.05 + 1.95 \times 10^4 C$ $R = 0.9971$	1.6

* $\langle 1/\text{ton} \rangle = \text{s}^{-1}$; $\langle C \rangle$ - concentrație = $\mu\text{g mL}^{-1}$; $\langle r \rangle$ - coeficient de corelație

S-a propus ca pentru determinarea unui panel de biomarkeri din probe biologice, panel care cuprinde biomarkeri precum CA72-4, CA12-5, CEA și CA19-9, să se ia în considerare doi microsenzori stocastici pe bază de grafena dopată cu sulf și nanostructură de oleamidă.

Metodă de obținere a grafenei exfoliate

Exfolierea tijelor de grafit într-o soluție care conține sulfat de amoniu 0,05 M, acid boric 0,05 M și clorură de sodiu 0,05 M a dus la producerea primului eșantion de grafenă, care a fost denumit EGR-1 (SPEXF91). Exfolierea tijelor de grafit într-o soluție care conține sulfat de amoniu 0,05 M, acid boric 0,1 M și clorură de sodiu 0,05 M a dus la producerea celui de-al doilea eșantion de grafenă, care a fost desemnat cu denumirea EGR-2 (SPEXF96). Celula de exfoliere era formată, de obicei, din două tije de grafit de înaltă puritate (denumite anod și catod) care erau conectate la mecanismul de exfoliere (un sistem artizanal care genera impulsuri de curent). Între anod și catod a fost aplicată o tensiune constantă de 12 volți timp de aproximativ patru ore, în timp ce celula a fost umplută cu o soluție de fiecare electrolit cu un volum de 100 ml. În urma procesului de exfoliere, la baza celulei s-a depus o pulbere de culoare închisă. După colectarea pulberii, aceasta a fost curățată cu 8L de apă distilată, iar apoi s-a folosit ultrasunete pentru a o dispersa în 125mL de apă (30 min). Suspensia închisă la culoare a fost filtrată prin hârtie cu panglică albă și apoi a fost liofilizată înainte de a fi uscată. Acest lucru a fost făcut pentru ca particulele mai mari să poată fi îndepărtate.

Prin urmare, pentru proiectarea senzorilor, 43,5 mg de pulbere de EGR-1 (SPEXF91) au fost amestecate cu ulei de parafină pentru a obține o pastă, care a fost modificată ulterior cu 50 μ L de oleamidă N8. Pentru cel de-al doilea senzor, 24,3mg de pulbere EGR-2 (SPEXF96) a fost combinată cu 25 μ L de oleamidă N8 și ulei de parafină. Fiecare pastă diferită a fost apoi plasată

într-un tub care a fost fabricat dintr-un material care nu era conductiv. În scopul conectării celor două paste la circuitul exterior al celulei electrochimice, a fost utilizat un fir de argint.

Tabelul 3. Caracteristicile de răspuns la performanță ale senzorilor stocastici pentru analiza CA72-4, CA12-5, CEA și CA19-9

Senzori stocastici	Domeniu de concentrație de lucru	Ecuația de calibrare și r^*	t_{off} (s)
CA72-4**			
N8/ EGR-1 (SPEXF91)	0.004 - 4000	$1/ton=0.07+1.43 \times 10^{-5}C$ $R=0.9977$	1.0
N8/ EGR-2 (SPEXF96)	4.00×10^{-11} - 4000	$1/ton=0.04+1.06 \times 10^{-5}C$ $R=0.9923$	1.6
CA12-5**			
N8/ EGR-1 (SPEXF91)	8.37×10^{-14} – 8374.3	$1/ton=0.04+1.9 \times 10^{-5}C$ $R=0.9940$	1.2
N8/ EGR-2 (SPEXF96)	8.30×10^{-6} – 837.43	$1/ton=0.08+9.9187 \times 10^{-5}C$ $R=0.9994$	1.4
CA19-9**			
N8/ EGR-1 (SPEXF91)	2.09×10^{-13} - 20	$1/ton=0.04+5.88 \times 10^{-3}C$ $R=0.99972$	1.4
N8/ EGR-2 (SPEXF96)	3.28×10^{-9} - 500	$1/ton=0.03+1.82 \times 10^{-4}C$ $R=0.9973$	1.8
CEA***			
N8/ EGR-1 (SPEXF91)	1.28×10^{-11} - 1.00×10^{-6}	$1/ton=0.06+0.0924C$ $R=0.9946$	1.6
N8/ EGR-2 (SPEXF96)	4.096×10^{-15} - 2.00×10^{-7}	$1/ton=0.03+0.8133C$ $R=0.9861$	1.1

* $<1/t_{on}> = s^{-1}$; **< CA72-4/ CA12-5/ CA19-9> - concentrație = $\mu g mL^{-1}$; ***<CEA> - concentrație = $\mu g mL^{-1}$, <r> - coeficient de corelație

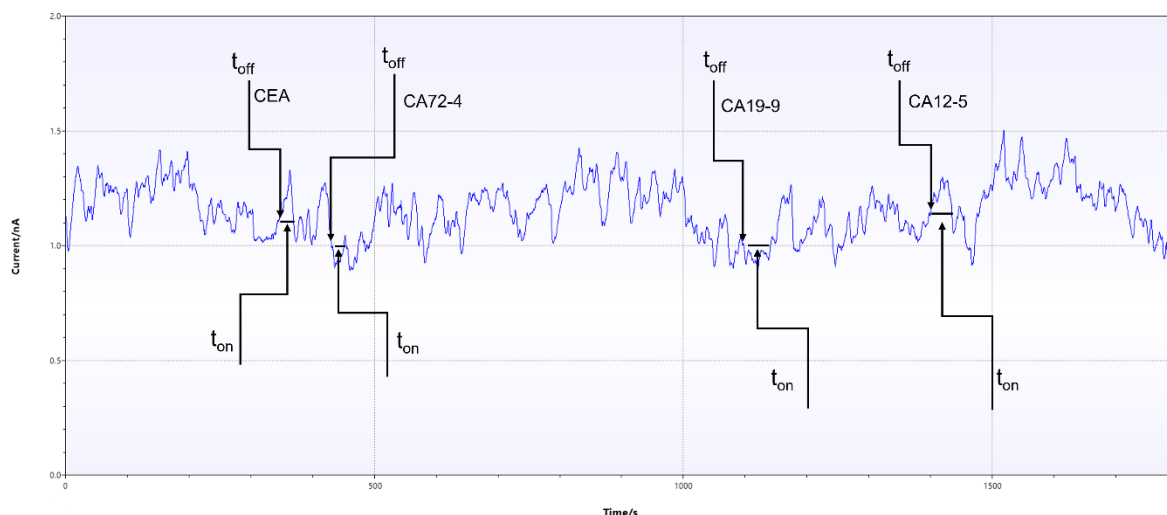


Figura 5. Exemplu de recunoaștere a modelelor CA72-4, CA12-5, CA19-9 și CEA în probe de sânge integral, utilizând senzori stocastici.

Valoarea lui t_{off} , care reprezintă semnăturile analiților, este cea care este utilizată pentru a determina cât de selectivi sunt senzorii stocastici. În cazul în care semnăturile analiților pot fi monitorizate cu același senzor stocastic, dar produc rezultate diferite, acest lucru indică faptul că senzorul este selectiv. Selectivitatea senzorilor stocastici sugerați a fost demonstrată prin semnăturile care au fost prezentate pentru catepsina B, catepsina D, CEA, CA19-9, p53, CA72-4, CA12-5.

Toate obiectivele care au fost planificate pentru prima etapă a proiectului au fost realizate și îndeplinite. Senzorii electrochimici pot fi proiectați pentru o varietate de aplicații analitice cu costuri moderate și portabilitate, combinate cu o detecție sensibilă și selectivă. Fabricarea electrozodului senzorului, care acționează ca element transductor, este una dintre cele mai semnificative și mai dificile etape. Din fericire, există în prezent o selecție largă de materiale noi și noi cu conductivitate electronică ridicată. Materialele utilizate pentru modificarea senzorilor au fost alese din clasa oleamidelor, ciclodextrinelor și a metalelor nobile, deoarece acestea au capacitatea de a forma complexe de incluziune, pentru a spori detecția analiților țintă și modificarea electrozilor oferă senzori electrochimici foarte selectivi. Matricile care stau la baza senzorilor stocastici sunt constituite din materiale grafene, datorită capacității lor de a oferi o sensibilitate ridicată în detecția electrochimică, o rată rapidă de transfer de electroni și o rezistență scăzută la transferul de sarcină și o conductivitate electrică și termică excelentă, ceea ce îmbunătățește viteza de răspuns și sensibilitatea de detecție a senzorilor.

Diseminare

Capitole în cărți

Capitolul 5: Chitosanul funcționalizat și dispozitivele biomedicale, în Nanocomposite de chitosan-Aplicatii Bionanomecanice

D.-C. Gheorghe, R.-M. Ilie-Mihai, C. Cioates Negut, R.-I. Stefan-van Staden, Springer Nature, Singapore, în curs de apariție.

Participarea la conferințe

Senzori stocastici pe bază de nanopulberi de carbon pentru testarea ultrasensibilă a CA 15-3, CEA și HER2 în sângele integral

Oana-Raluca Mușat, Raluca-Ioana Ștefan-van Staden, Damaris-Cristina Gheorghe, Ruxandra-Maria Ilie-Mihai și Jacobus (Koos) Frederick van Staden

Simpozionul internațional "Prioritățile chimiei pentru o dezvoltare durabilă" PRIOCHEM Ediția a XVIII-a 26-28 octombrie 2022, București, România

Trei lucrări au fost trimise la reviste ISI și sunt în curs de evaluare.

Rezumat al progreselor înregistrate

Pentru prima etapă a proiectului, toate rezultatele așteptate au fost obținute. Au fost alese cele mai bune materiale și matrici nanostructurate pentru a obține senzori fiabili, capabili să testeze biomarkeri ai cancerului gastric din diferite probe biologice. Materialele nanostructurate au fost caracterizate morfologic cu ajutorul SEM. Diseminarea rezultatelor a fost realizată prin crearea unui site web care conține informații generale, un rezumat, precum și obiectivele și etapele proiectului. Site-ul www.screentdia.ro va fi actualizat periodic cu informații și rezultate obținute în cadrul proiectului. Trei articole sunt în curs de finalizare și vor fi trimise spre publicare în reviste ISI. Un poster a fost prezentat la Simpozionul Internațional "Prioritățile chimiei pentru o dezvoltare durabilă" PRIOCHEM Ediția a XVIII-a. Un capitol de carte a fost acceptat în Springer.

Rezumat Executiv

Pentru prima etapă a proiectului, au fost identificate și selectate cele mai bune matrici și modificatori pentru proiectarea senzorilor stocastici. A fost explicată procedura de imobilizare a diferiților modificatori, cum ar fi oleamidele, α -CD, porfirinele, nanoparticulele metalice pe materiale de carbon, nanografenele, grafitul, grafenul, diamantul și grafenul exfoliat, a fost definită metoda de obținere a grafenului exfoliat, iar pastele modificate au fost caracterizate topografic cu ajutorul SEM. Senzorii stocastici au fost proiectați, caracterizați și validați pentru determinarea biomarkerilor cancerului gastric în diferite probe biologice. Sunt prezentate caracteristicile de răspuns, precum și exemple de diagrame tipice obținute prin metoda stocastică. Biomarkerii analizați sunt proteine care sunt eliberate în organismul oamenilor afectați de diferite stadii ale cancerului gastric, dar pentru unii biomarkeri se cunosc puține informații privind legătura lor cu cancerul gastric. Astfel, a fost făcut un prim pas în demonstrarea rolului biomarkerilor Catepsina B, Catepsina D, CEA, CA19-9, p53, CA72-4, CA12-5 în cancerul gastric.

Director de proiect

Referințe

Sloane BF, Dunn JR, Honn KV. Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential. *Science*. 1981;212:1151–1153.

Xu L, Peng S, Zhang N, Liu R, Huang Q, Li X, Wang J. Expression status of cathepsin B may as a prognostic marker for human gastric carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2016;9:6988–6998.

Ikeguchi M, Fukuda K, Oka S, Hisamitsu K, Katano K, Tsujitani S, Kaibara N. Micro-lymph node metastasis and its correlation with cathepsin D expression in early gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2001;77:188–194.

Soond SM, Savvateeva LV, Makarov VA, Gorokhovets NV, Townsend PA, Zamyatnin AA Jr. Making Connections: p53 and the Cathepsin Proteases as Co-Regulators of Cancer and Apoptosis. *Cancers*. 2020; 12(11):3476.

Emoto S, Ishigami H, Yamashita H, Yamaguchi H, Kaisaki S, Kitayama J. Clinical significance of CA125 and CA72-4 in gastric cancer with peritoneal dissemination. *Gastric Cancer*. 2012 Apr;15(2):154-61.

Stefan-van Staden, Raluca-Ioana; Ilie-Mihai, Ruxandra-Maria; Gurzu, Simona (2020). Simultaneous Determination of Carcinoembryonic Antigen (CEA), Carbohydrate Antigen 19-9 (CA19-9), and Serum Protein p53 in Biological Samples with Protoporphyrin IX (PIX) Used for Recognition by Stochastic Microsensors. *Analytical Letters*, 2020, 53, 1–14.