

INSTRUMENTE ȘI TESTE DE SCREENING PENTRU DIAGNOSTICAREA
PRECOCE A CANCERULUI GASTRIC

Raport Științific

Etapa 2

A) Caracterizarea electrochimică a senzorilor

Tehnicile de caracterizare utilizate în acest studiu au inclus voltametria ciclică și spectroscopia de impedanță electrochimică (EIS). Aceste tehnici au fost utilizate pentru a analiza și evalua performanța senzorilor nemodificați, precum și a celor trei senzori modificați: nanopulbere de grafena cu oleamidă N2, grafit cu oleamidă N2 și pulbere de grafena redusă cu oleamidă N2. Pentru a examina răspunsul chimic al senzorilor s-a utilizat CV, după cum se vede în Fig.

Experimentele CV au fost efectuate cu nanopulbere de grafena, grafit, pulbere de grafena redusă.

Datele demonstrează în mod clar faptul că conductivitatea senzorului a prezentat o creștere după modificarea celor trei pulberi pe bază de carbon cu oleamidă. Unul dintre factorii care contribuie la creșterea conductivității este rolul atribuit oleamidei ca modificador. Matricile senzorilor pot oferi structuri stabile pentru canalele/porii modificadorului, în timp ce oleamida utilizată pentru modificarea matricelor a furnizat canalele/porii necesari pentru senzorii stocastici.

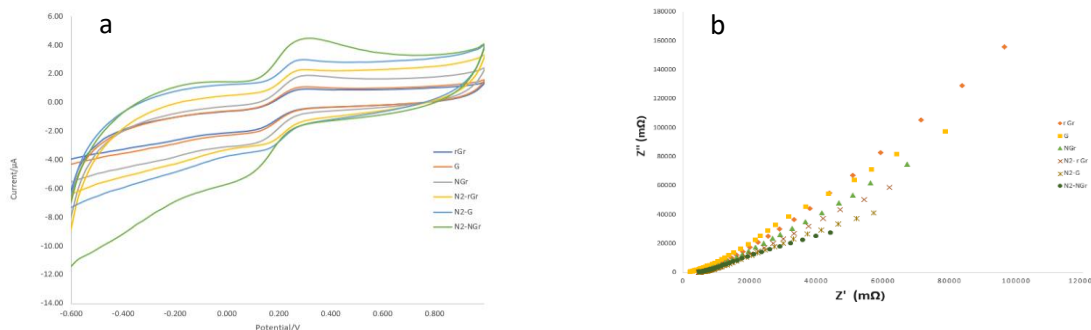


Figura 1. a) Voltamograme ciclice ale curentului în funcție de potențial (b) Spectre de impedanță electrochimică

Se poate presupune că modificarea a fost implementată cu succes, ceea ce a dus la un rezultat electrochimic îmbunătățit. Scopul investigației EIS a fost acela de a examina interacțiunea dintre senzori. Fig. b ilustrează diagramele Nyquist și faptul că pulberile de carbon prezintă o formă semicirculară distinctă la frecvențe joase. Mai mult, modificarea celor trei senzori de pulberi pe bază de carbon cu oleamidă a dezvăluit forme semicirculare din ce în ce mai mici, la aceleași frecvențe utilizate pentru senzorii nemodificați. Rezultatele EIS au prezentat o concordanță satisfăcătoare cu rezultatele obținute prin CV.

B) Diferențierea moleculară a catepsinelor B și D și a proteinei p53 și analiza lor cantitativă în probe biologice

Găsirea biomarkerilor care să poată fi utilizați în testele de screening pentru depistarea precoce a cancerului este de o importanță vitală. Dacă depistarea unui singur biomarker într-o probă biologică nu poate indica un anumit tip de cancer, prin creșterea numărului de biomarkeri care pot fi identificați și cuantificați cu ajutorul testelor de screening, se va schimba și validitatea testului de screening. Tehnicile ELISA și de chemiluminiscență utilizate în laboratoarele clinice acreditate pot determina doar un biomarker per analiză (în timp ce se dezvoltă kituri specifice); cu unele dezavantaje, cum ar fi: proba trebuie prelucrată înainte de măsurare, iar costul pe analiză este foarte mare.

Trei dintre biomarkerii care pot fi utilizați pentru diferențierea cancerelor precum cancerul gastric, cancerul de colon, cancerul de sân, sunt: catepsina B, catepsina D și p53.

Aceste două catepsine sunt implicate în dezvoltarea cancerului, proteina p53 („gardianul genomului”) are un rol în integritatea genomică. (de exemplu, atunci când are loc deteriorarea ADN-ului, p53 oprește ciclul celular).

În această lucrare, nanopulberile de diamant și grafena au fost modificate cu clorură de 2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfina mangan (III) (Mn(OAP)Cl). Microsenzorii stocastici au fost utilizați pentru diferențierea și cuantificarea simultană a catepsinelor B, D și a proteinei p53 în sângele integral, saliva, urină și țesutul tumoral. Noutatea acestei lucrări este dată de compoziția părții active a microsenzorilor stocastici, precum și de utilizarea acestora pentru a diferenția între catepsinele B, D și proteina p53 din probele biologice.

Morfologia suprafețelor active ale microsenzorilor stocastici.

Figura 2 prezintă analiza calitativă obținută prin microscopie electronică de baleiaj. După cum se poate observa din Figura 2a, analiza morfologică arată că materialul este omogen în cazul pastei pe bază de pulbere de nanodiamant (nDP). În cazul utilizării pastei pe bază de pulbere de nanografene (nGr), se poate observa că aceasta conține spații expandate între foile de grafenă. De asemenea, se observă în ambele imagini canalele necesare pentru obținerea semnalului stocastic.

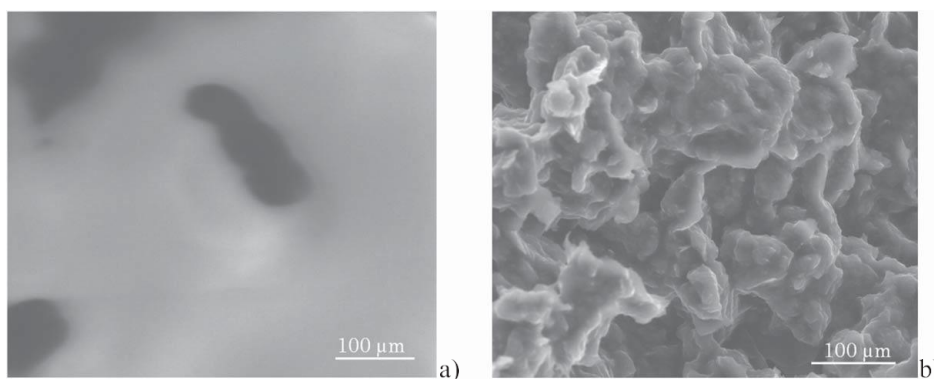


Figura 2. Imagini SEM pentru suprafața activă a (a) Mn(OAP)Cl/nDP și a Mn(OAP)Cl/nGr .
Probele biologice.

Saliva, sângele integral, urina și țesuturile tumorale au fost obținute de la pacienți confirmați cu cancere gastrice și colorectale. Proiectul de cercetare a fost aprobat cu nr. 32647/2018 acordat de către Comitetul de Etică al Spitalului Clinic Județean de Urgență Târgu-Mureș. Consimțământul informat a fost obținut de la toți pacienții implicați în proiectul de cercetare.

Metoda stocastică.

Când se aplică potențialul de 125 mV vs Ag/AgCl (tehnica cronoamperometrică), variația curentului va genera valori ale t_{off} -urilor cunoscute sub numele de semnături ale analitului, deoarece ele apar atunci când biomarkerii intră în canal (curent scade la zero), blocându-l până când molecula intră în interior, iar aceste semnături sunt specifice fiecărui biomarker; valorile t_{on} sunt măsurate în timpul celei de-a doua faze, când biomarkerul suferă în interiorul canalului procese de legare și redox (valoarea sa este măsurată între două valori t_{off}) (Fig. 3). În consecință, semnătura (valoarea t_{off}) este un parametru calitativ utilizat în recunoașterea moleculară și diferențierea biomarkerilor, în timp ce valoarea tonului este un parametru de cuantificare, utilizat pentru determinarea concentrațiilor biomarkerilor, în conformitate cu ecuația: $1/t_{on} = a + b \times C_{\text{biomarker}}$, unde $C_{\text{biomarker}}$ reprezintă 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 obținuți prin metoda regresiei liniare. Au fost obținute concentrații necunoscute de biomarkeri prin introducerea valorilor t_{on} -urilor obținute din diagrame (Fig. 3), în ecuațiile de calibrare ale fiecărui microsenzori, pentru fiecare dintre biomarkeri.

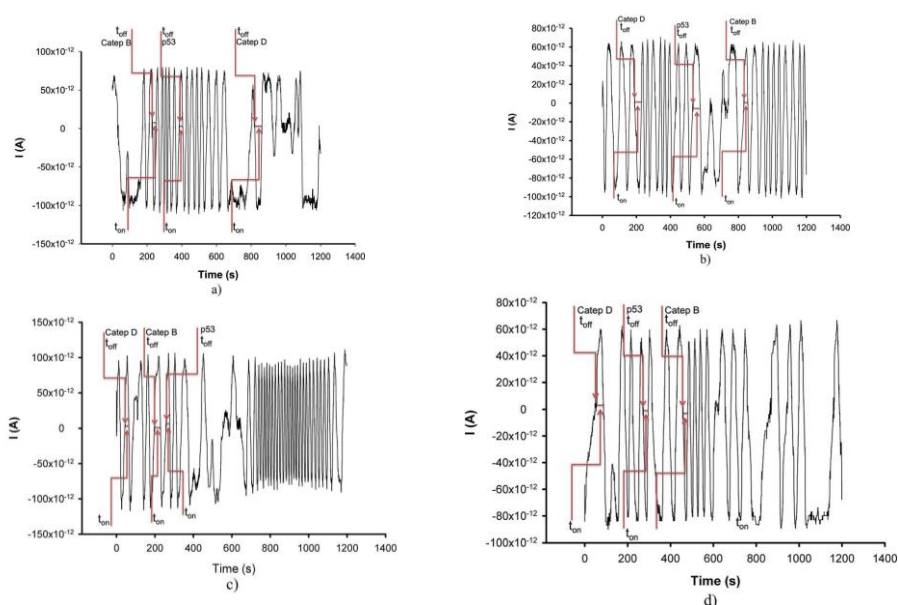


Figura 3. Diagrame obținute pentru screening, folosind microsenzorii stocastici bazați pe Mn(OAP)Cl/nDP, a (a) salivei, (b) sângelui integral, (c) țesutului tumoral și (d) urinei.

Rezultate si discutii

S-au efectuat studii de reproductibilitate și stabilitate pentru fiecare microsenzori stocastici. În acest sens, zece microsenzori stocastici din fiecare tip au fost proiectați în conformitate cu metoda descrisă mai sus, iar valorile sensibilităților au fost înregistrate și comparate timp de 30 zile. Pentru reproductibilitatea construcției senzorilor, atunci când s-au comparat, pentru fiecare tip de microsenzori, sensibilitățile, au fost obținute următoarele: RSD: 0.06% pentru microsenzori stocastici pe bază de Mn(OAP)Cl/nDP și 0.10% pentru microsenzori pe bază de Mn(OAP)Cl/nGr, sensibilitățile fiind măsurate pentru fiecare dintre cei doi microsenzori, imediat după ce a fost preparată pasta modificată. Valorile obținute au confirmat reproductibilitatea construcției celor două tipuri de microsenzori stocastici.

Pentru determinarea stabilității lor în timp, s-a efectuat zilnic determinarea sensibilității pentru toți microsenzorii. 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 dovedit o bună stabilitate în timp a pastelor modificate, precum și a microsenzoriilor stocastici.

Valorile semnăturilor biomarkerilor/substanțelor din probele biologice sunt date de selectivitatea microsenzorilor stocastici; diferențele dintre semnături au dovedit selectivitatea acestora. S-a verificat selectivitatea față de CEA, CA72-4, leucină, serină, glutamină; toate semnăturile obținute pentru aceste substanțe au fost diferite una față de cealaltă și mai mari de 2.0, dovedind selectivitatea microsenzorilor stocastici propuși.

Recunoașterea moleculară, diferențierea și cuantificarea catepsinei B, a catepsinei D și a p53 în probe biologice.

Modul stocastic descris mai sus a fost utilizat pentru recunoașterea moleculară și cuantificarea celor trei biomarkeri. Sângele integral, saliva, urina și țesuturile tumorale de la pacienți confirmați cu cancer colorectal/gastric au fost analizate fără nicio prelucrare și au fost analizate diagramele (Fig. 3). Metoda de adiție standard - când cantități cunoscute de catepsină B, catepsină D și p53 au fost adăugate în cele patru tipuri de probe biologice, și metoda de comparație urmată de o analiză prin testul Student-t când au fost comparate, rezultatele obținute cu ajutorul celor doi microsenzori stocastici, au fost utilizate pentru validarea microsenzorilor stocastici propuși.

Pentru metoda de adiție standard, determinarea catepsinei B, a catepsinei D și a p53 a fost efectuată înainte și după adăugarea unor cantități cunoscute din fiecare dintre biomarkeri în sângele integral, urină, salivă și țesut tumoral; cantitățile determinate de biomarkeri obținute după adăugarea unor cantități cunoscute de biomarkeri au fost comparate cu cantitatea inițială găsită în probele biologice (Tabelul I).

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

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

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

Senzori stocastici	Procentul de regasire, %		
	Catepsina B	Catepsina D	P53
	Sange integral		
Mn(OAP)Cl/nDP	99.14 ± 0.01	99.97 ± 0.01	99.95 ± 0.02
Mn(OAP)Cl/nGr	99.23 ± 0.02	99.96 ± 0.03	99.99 ± 0.01
	Saliva		
Mn(OAP)Cl/nDP	99.54 ± 0.04	99.88 ± 0.02	99.47 ± 0.02
Mn(OAP)Cl/nGr	99.11 ± 0.08	99.76 ± 0.03	99.97 ± 0.05
	Urina		
Mn(OAP)Cl/nDP	98.95 ± 0.03	99.15 ± 0.04	99.23 ± 0.04
Mn(OAP)Cl/nGr	99.06 ± 0.05	98.99 ± 0.03	99.14 ± 0.07
	Țesut tumoral		
Mn(OAP)Cl/nDP	98.47 ± 0.06	98.12 ± 0.02	99.00 ± 0.04
Mn(OAP)Cl/nGr	98.98 ± 0.08	98.21 ± 0.03	98.99 ± 0.03

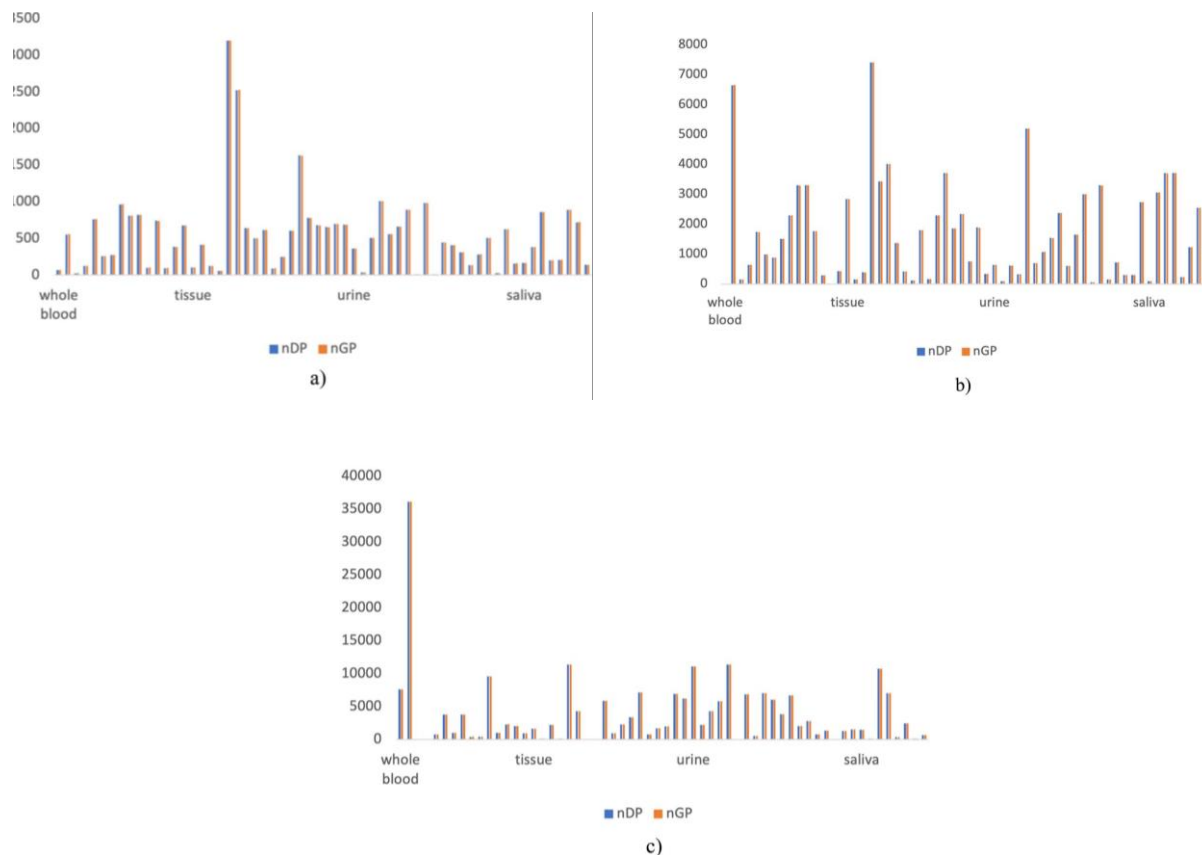


Figura 4. Comparație între rezultatele obținute cu cei doi microsenzori stocastici pe bază de Mn(OAP)Cl/ nDP și Mn(OAP)Cl/nGr pentru testarea (a) p53, (b) catepsinei B și (c) catepsinei D, în sânge integral, țesut tumoral, urină și salivă.

Figura 4 a arătat o corelație foarte bună între rezultatele obținute cu ajutorul microsenzorilor stocastici pe bază de Mn(OAP)Cl/ nDP și Mn(OAP)Cl/nGr. A fost efectuat un test t student la un nivel de confidență de 99.00% (valoarea tabulată este 4.13). Valorile obținute pentru testul-t-student au fost de 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, ceea ce demonstrează că nu există o diferență semnificativă între rezultatele obținute cu ajutorul celor doi microsenzori stocastici pe bază de Mn(OAP)Cl/nDP și Mn(OAP)Cl/nGr pentru determinarea catepsinei B, a catepsinei D și a p53. În consecință, microsenzorii stocastici propuși pot fi validați pentru recunoașterea moleculară, diferențierea și testarea catepsinei B, a catepsinei D și a p53 în probe de sânge integral, salivă, urină și țesuturi tumorale.

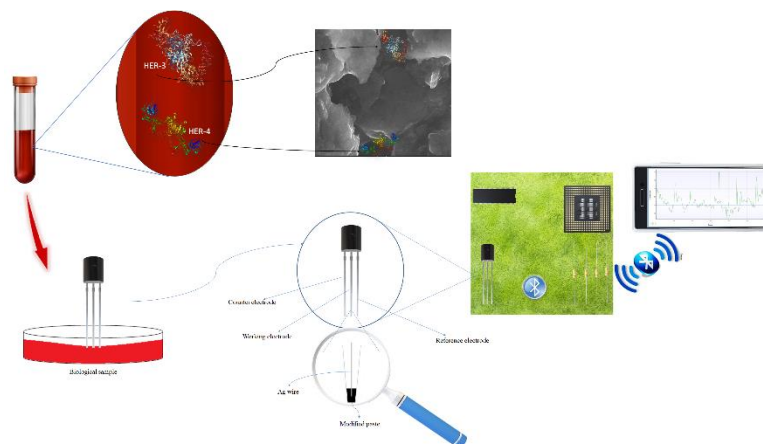
C) Analiza pe bază de nanoplatformă pentru detectarea HER3 și HER4 pentru diagnosticarea cancerului gastric

Similar cu EGFR și HER2, expresia HER3 și HER4 a fost identificată în 20.7% și 13.3% din tumorile gastrice. Mai multe studii au arătat o asocierie negativă între expresia ridicată a HER3 și supraviețuire. Cu toate acestea, HER4 în cancerul gastric a fost studiat doar cu moderație până în prezent, iar relevanța sa ca marker prognostic rămâne neclară. He et al. au constatat că supraexpresia HER4 a fost asociată cu metastaza ganglionilor tumorali, dar nu și cu supraviețuirea.

Până în prezent, există câteva cercetări care implică studii electrochimice în analiza familiei HER în probe biologice. Dezvoltarea de senzori pentru detectarea și măsurarea bioanalitilor este o aplicație de perspectivă pentru nanomaterialele funcționale, care au demonstrat că sunt candidați promițători în acest domeniu. Proprietățile remarcabile ale nanomaterialelor pe bază de ciclodextrine (CD) și derivați ai ciclodextrinelor asigură o performanță sporită a senzorilor în ceea ce privește sensibilitatea, selectivitatea, limita de detecție, timpul de răspuns și capacitatea de multiplexare.

Scopul a fost de a investiga un set de doi biomarkeri, HER3 și HER4, care nu sunt cunoscuți ca fiind specifici pentru cancerul gastric, deoarece există doar o cantitate limitată de informații disponibile cu privire la legătura dintre HER3 și HER4 și simptomele patologice clinice, precum și la rolul pe care

HER3 și HER4 îl joacă în dezvoltarea cancerului gastric. Pentru atingerea acestui obiectiv au fost utilizate nanoplatforme care încorporează senzori stocastici. Nanoparticulele de aur (Au NPs) au fost alese pentru construcția senzorilor stocastici datorită stabilității lor ridicate, precum și a conductivității ridicate.



Construcția și configurarea nanoplatformei.

Aspectele inovatoare ale acestei lucrări, în comparație cu lucrările asemănătoare, sunt: combinarea nanoplatformelor și detectarea smartphone-urilor; utilizarea nanografenei ca matrice pentru proiectarea senzorilor stocastici; utilizarea nanoparticulelor de Au și de Cu sferoidal pentru modificarea nanografenei.

Rezultate și discuții

Reproductibilitatea și stabilitatea senzorilor stocastici

Fiecare senzor a făcut obiectul unor studii de reproductibilitate. În consecință, au fost produse 10 exemplare din fiecare tip de senzor. Atunci când au fost imersate în soluții cu pH 7.40 pentru HER3 și HER4, sensibilitățile fiecărui senzor au fost determinate și comparate. Stabilitatea fiecărui senzor a fost evaluată după cum urmează: După cum se descrie în secțiunea privind proiectarea stocastică a senzorilor, au fost stocate 20 de exemplare din fiecare tip de senzor. Răspunsul fiecăruia dintre senzori a fost evaluat, iar sensibilitățile au fost comparate; a fost înregistrată o variație de 0.02% pentru fiecare tip de senzor, ceea ce dovedește reproductibilitatea proiectării senzorilor. În fiecare zi, un nou senzor a fost scos din depozit și scufundat în soluții care conțineau HER3 și HER4 cu concentrații variabile la pH 7.40; sensibilitatea fiecărei măsurători a fost înregistrată pentru comparație după o lună, când întregul lot de senzori a fost utilizat. Rezultatele de la sfârșitul perioadei au indicat un grad ridicat de stabilitate a electrozilor în timp, deoarece modificarea sensibilității în timp a fost de 0.07% față de sensibilitatea inițială pentru Cu/ α -CD-nGr sferoidal și de 0.05% față de sensibilitatea inițială pentru AuNPs/ α -CD-nGr.

Selectivitate

Valorile t_{off} măsurate pentru o varietate de interferențe posibile indică selectivitatea celor doi senzori stocastici propuși. Examine ca interferențe potențiale au fost HRG- α , HER1, HER2, p53 și CEA. Având în vedere că semnăturile substanțelor chimice selectate diferă de cele ale biomarkerilor relevanți, Tabelul 1 demonstrează că niciunul dintre aceștia nu împiedică detectarea HER3 și HER4.

Tabelul 1. Selectivitatea senzorilor stocastici utilizați pentru determinarea HER3, HER4.

Senzor stocastic bazat pe α -CD-nGr	HER 3 Semnătură (t_{off})	HER 4 Semnătură (t_{off})	HRG- α Semnătură (t_{off})	HER1 Semnătură (t_{off})	HER2 Semnătură (t_{off})	p53 Semnătură (t_{off})	CEA Semnătură (t_{off})
AuNPs	1.9	1.1	0.8	1.6	4.2	3.3	1.7
Cu sferoidal	1.2	2.3	1	1.4	1.3	4.2	1.9

HER3 și HER4: identificare și cuantificare moleculară

Doi senzori stocastici au fost utilizați pentru depistarea rapidă a probelor biologice, inclusiv a țesutului tumoral și a sângelui integral, de la pacienți cu cancer gastric. HER3 și HER4 au fost identificate în diagrame pe baza semnăturilor lor înainte ca t_{on} să fie citit și utilizat în modul stocastic pentru a determina concentrația de HER3 și HER4. Rezultatele testelor pentru probe biologice (cinci probe de sânge integral și cinci probe de țesut tumoral) sunt prezentate în Figurile 1 și 2. Se pot găsi corelații foarte bune între rezultate.

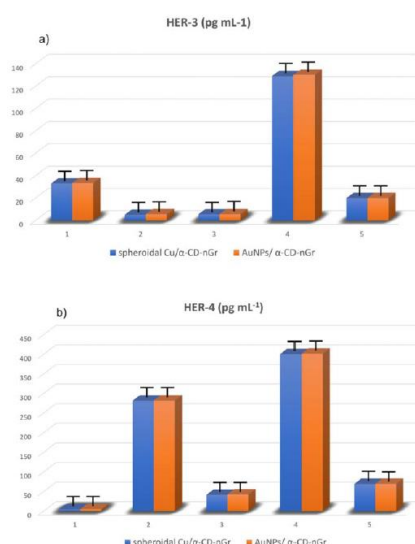


Figura 1. Rezultatele testelor de depistare a HER3 (a) și HER4 (b) în probele de sânge integral (N = 10).

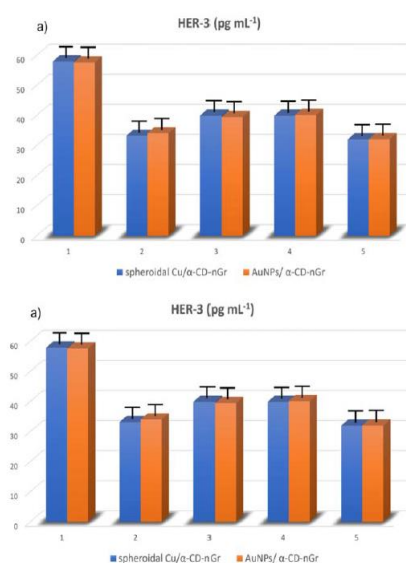


Figura 2. Rezultatele testelor de depistare a HER3 (a) și HER4 (b) în probele de țesut tumoral (N = 10).

A fost efectuat un test t cu un nivel de încredere de 99.90%. Valorile t calculate pentru fiecare tip de probă au fost mai mici decât valoarea tabulată, ceea ce indică faptul că nu există o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între rezultatele obținute cu ajutorul nanoplatformelor propuse, deoarece valorile calculate au fost de 1.98 pentru HER3 și 1.93 pentru HER4 în sângele integral și de 1.91 pentru HER3 și 2.01 pentru HER4 în țesutul tumoral și că acestea pot fi considerate fiabile pentru identificarea și cuantificarea moleculară a HER3 și HER4 în probe biologice alese. În plus, validarea a fost efectuată prin metoda convențională de adăugare, care a presupus adăugarea unor cantități cunoscute de HER3 și HER4 la fiecare tip de probă biologică, inclusiv sângele integral și țesutul tumoral. S-au obținut valori de regăsire extrem de ridicate atunci când HER3 și HER4 au fost identificate în două tipuri distincte de material biologic. Aceste rezultate au demonstrat că nanoplatforme propuse pot fi utilizate pentru a identifica și cuantifica HER3 și HER4 în probe

biologice cu fiabilitate. Testele de regăsire indică faptul că nanoplatformele propuse pot fi utilizate cu încredere pentru testarea HER3 și HER4 în sângele integral și în țesutul tumoral, deoarece toate regăsirile au fost mai mari de 98,00 %, iar valorile RSD au fost mai mici de 1.00 %.

D) Testarea simultană a CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125 în probe biologice cu microsenzori stocastici tridimensionali de tip ac

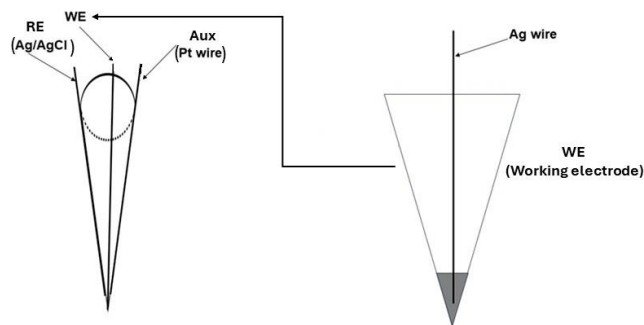
Patru dintre cei mai folosiți indicatori pentru cancerul gastric sunt CA 72-4, CA 19-9, CA 125 și CEA, și sunt cei mai folosiți markeri pentru modelele de diagnostic combinate. CA 72-4 este o mucină epitelială asociată tumorii, care se exprimă în adenocarcinoame precum cele gastrice, colonice și mamare, dar este mai scăzut în țesuturile normale. În tumorile sistemului digestiv, CA 72-4 este asociat cu sensibilitate și specificitate ridicate. CA 19-9, antigenul carbohidrat 19-9 sau antigenul sialil Lewis, este un biomarker tumoral utilizat în mare măsură pentru screening-ul și identificarea cancerului pancreatic, dar și pentru carcinoamele de tract digestiv, în special pentru cele gastrice. CA 125 este o glicoproteină prezentă în epitelii care căptușesc cavitățile corpului și este asociată cu sensibilitate și specificitate ridicate în diagnosticul mai multor carcinoame ale tractului digestiv. CEA este o glicoproteină intracelulară care este produsă de celulele tumorale epiteliale, fiind o moleculă de adeziune, și ajută la angiogeneză. Nivelul său seric este crescut în adenocarcinoamele colorectale, gastrice și alte adenocarcinoame, dar și în afecțiunile non-maligne, cum ar fi boala inflamatorie cronică intestinală, fumatul, alcoolismul și bolile hepatice.

Prin urmare, s-a propus o metodă de screening pentru sângele integral, saliva, urină și țesuturi tumorale gastrice care pot recunoaște și cuantifica simultan următorii patru biomarkeri: CA 72-4, CA 19-9, CA 125 și CEA. Instrumentele propuse sunt senzorii stocastici. Noutatea metodei este reprezentată de proiectarea microsenzorului stocastic 3D de tip ac pe baza de grafene decorate cu bor (B) și azot (N) special sintetizate în acest scop, modificate cu o oleamidă care poate asigura canalele necesare răspunsului stocastic și de abordarea analizei simultane a CA 72-4, CA 19-9, CA 125 și CEA cu fiabilitate ridicată. Conductivitatea materialului matricei a fost îmbunătățită prin încorporarea grafenei dopate cu N și B. În comparație cu materialul de grafit, unde forțele van der Waals dintre straturile de grafena pot modifica forma canalelor, utilizarea materialului de grafena s-a dovedit a fi semnificativ mai convenabilă, deoarece forma canalului nu este influențată de forțele fizice van der Waals.

Designul Microsenzorilor Stocastici

Microsenzorii stocastici 3D de tip ac s-au realizat astfel: fiecare dintre pulberi (NBGr-1 și NBGr-2) s-a amestecat cu ulei de parafină până s-a obținut o pastă omogenă. Fiecare dintre paste s-a amestecat cu o soluție etanolică de oleamidă $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ N-(2-mercapto-1 H-benzo[d]imidazol-5-il). Microconurile tridimensionale cu un diametru intern de 10 μm s-au realizat în laborator folosind o imprimantă 3D Stratasys Objet 24, care folosește tehnologia PolyJet pentru construcția modelelor tridimensionale printr-un proces strat cu strat. Materialul folosit în acest studiu a fost 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 de 10 μm . Pastele modificate au fost plasate în microconuri 3D (diametrul intern 10 μm) special concepute pentru microsenzorii stocastici 3D cu ac (Schema 1).

Electrodul de lucru (WE) a fost plasat într-un con care conține electrodul de referință (sârmă Ag/AgCl) și electrodul auxiliar (fir de Pt) (Schema 1). Când nu au fost folosiți, microsenzorii de tip ac s-au păstrat în locuri uscate, la temperatura camerei.



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

Metoda Stocastica

Metoda stocastică implică efectuarea măsurărilor t_{on} și t_{off} la o tensiune constantă (125 mV față de Ag/AgCl) prin utilizarea metodei cronoamperometrice. După efectuarea unei analize amănunțite a potențialelor cuprinse între 0 și 500 mV, a fost ales un potențial optim 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 lui t_{off} - denumite și semnături ale biomarkerilor – s-au utilizat pentru identificarea celor patru biomarkeri (CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125), iar valorile t_{on} (care se citesc între două semnături) au fost utilizate pentru determinarea concentrației fiecărui biomarker folosind ecuația de calibrare $1/t_{on} = a + b \times C_{biomarker}$, unde $C_{biomarker}$ este concentrația pentru biomarkerii determinați (CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125) folosind microsenzorii stocastici 3D de tip ac propuși, așa cum se vede în figurile 1. Parametrul cunoscut sub numele de „ t_{off} ” denotă durata necesară pentru biomarker pentru a intra pe 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 legată 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.

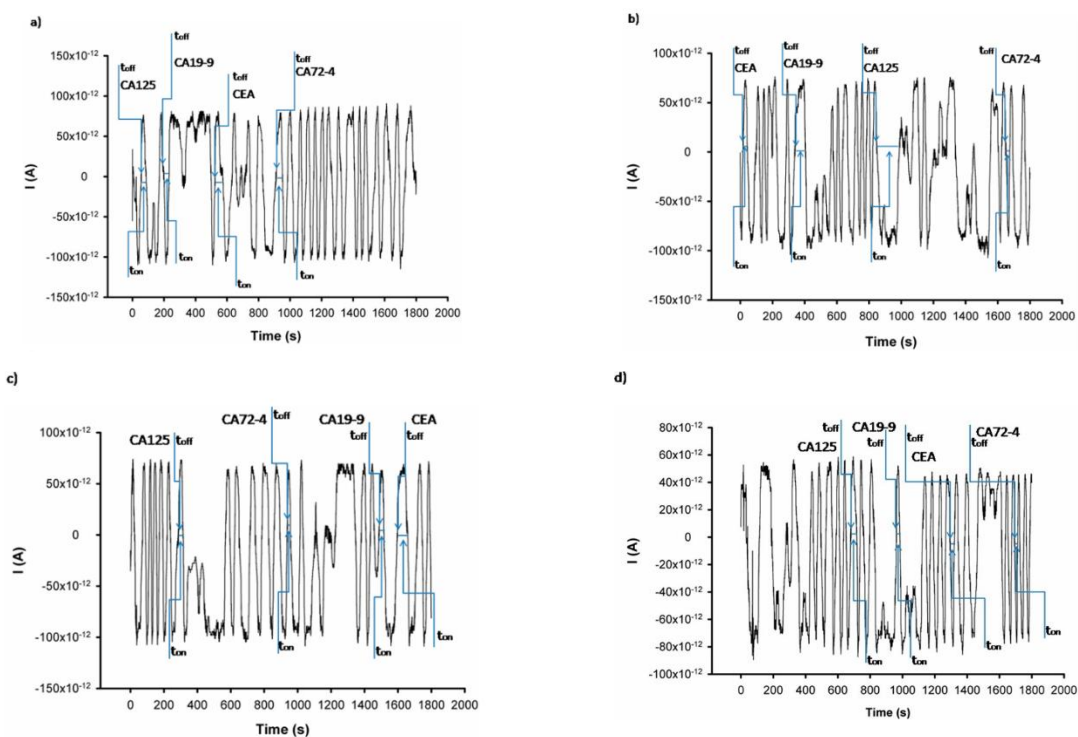


Figura 1. Exemple de diagrame obținute cu microsenzorul stocastic 3D de tip ac pe baza de NBGr-1/NBGr-2 pentru screening-ul (a) salivei, (b) sângelui integral, (c) țesutului tumoral gastric și (d) urinei.

Probele biologice

S-au colectat patru tipuri de probe (salivă, sânge integral, urină și țesut) de la pacienții confirmați cu cancer gastric, iar datele acestora s-au folosit conform avizului Comitetului de Etică nr. 32647/2018 acordat de Spitalul Județean de Urgență din Targu Mures. Consimțământul informat s-a obținut de la toți pacienții implicați în acest studiu. Toate probele biologice au fost colectate înainte de efectuarea oricărui tratament pentru cancer. Nu a fost efectuat nici un tratament al probei înainte de orice măsurătoare. Probele au fost analizate imediat ce au fost recoltate de la pacienți.

Rezultate si Discutii

Morfologia suprafeței active a microsenzorilor stocastici 3D de tip ac

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

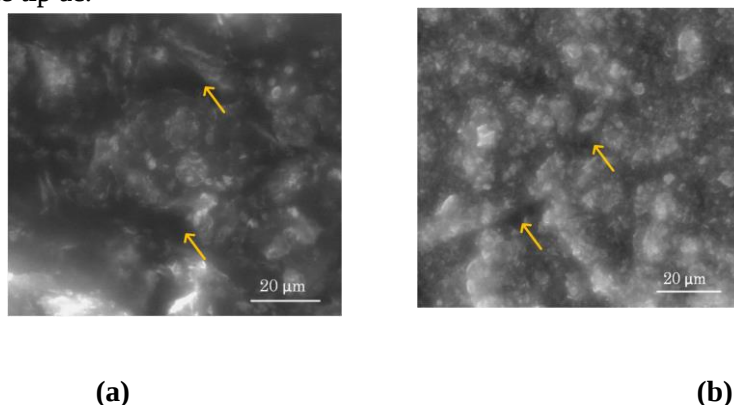


Figura 2. Imagini SEM pentru partea activă a microsenzorului stocastic de tip ac pe baza de (a) NBGr-1 și (b) NBGr-2. Săgețile arată prezența canalelor pe suprafața activă.

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 cronoamperometric. Multe studii de analiză a suprafeței au confirmat că suprafața grafenului este netedă și stabilă, facilitând stabilitatea ridicată a canalelor modificate.

S-au efectuat studii de reproductibilitate și stabilitate pentru fiecare dintre microsenzorii stocastici 3D de tip ac. Zece microsenzori stocastici 3D de tip ac din fiecare categorie au fost proiectați conform metodei descrise, iar valorile sensibilităților au fost înregistrate și comparate timp de 60 de zile. Pentru reproductibilitatea designului, sensibilitățile înregistrate pentru microsenzori de același tip au fost comparate pentru fiecare biomarker; % RSD înregistrat pentru sensibilitățile microsenzorilor stocastici 3D de tip ac au fost următoarele: pentru microsenzorul bazat pe NBGr-1, valorile înregistrate au fost de 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 pe bază de 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. Valorile obținute pentru % RSD au confirmat reproductibilitatea designului celor două tipuri de microsenzori stocastici 3D de tip ac.

Stabilitatea în timp a fost determinată prin măsurarea sensibilităților senzorilor proiectați pe parcursul a 60 de zile. Prin compararea sensibilităților obținute în această perioadă pentru fiecare tip de microsenzor stocastic 3D de tip ac, se pot face următoarele afirmații: pentru microsenzorul bazat pe NBGr-1, valorile RSD au fost de 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

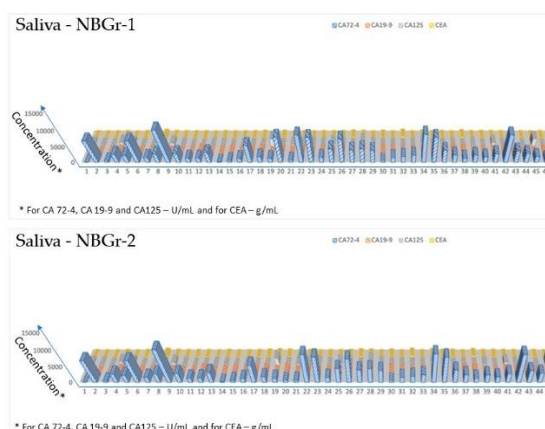
0.08% pentru CA72-4, 0.04% pentru CA19-9, 0.03% pentru CA125 și 0.03% pentru CEA. Aceste rezultate dovedesc buna stabilitate în timp a pastelor modificate și a microsenzorilor stocastici în timp.

Selectivitatea microsenzorilor stocastici este determinată utilizând valorile înregistrate ale semnăturilor asociate cu biomarkerii și alți compuși prezenți în probe biologice. Prezența diferențelor identificate între aceste semnături servește ca dovadă a selectivității microsenzorilor. Valorile t_{off} înregistrate pentru diferitele potențiale interferențe servesc ca indicatori ai selectivității celor doi senzori stocastici luați în considerare. Următoarele substanțe au fost investigate ca posibile interferențe: 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 examinați ca potențiali interferenți au avut caracteristici distincte fata de biomarkerii ipotezați, confirmând astfel selectivitatea senzorilor. Când s-a folosit microsenzorul stocastic 3D de tip ac bazat 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-a folosit microsenzorul stocastic 3D de tip ac bazat 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 unele de altele și mai mari de 2.3 s, dovedind selectivitatea microsenzorilor stocastici 3D de tip ac propuși pentru testarea CA 19-9, CA 72-4, CA 125 și CEA în probe biologice. În consecință, microsenzorii stocastici 3D de tip ac pot fi utilizați selectiv pentru testarea CA 19-9, CA 72-4, CA125 și CEA în probe biologice.

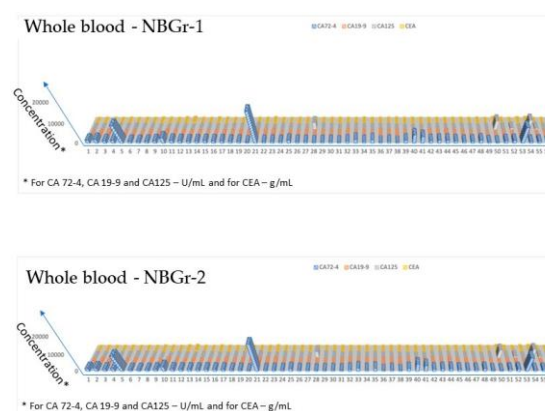
Determinarea ultrasensibilă a celor patru biomarkeri din toate cele patru fluide biologice

Domeniile largi de concentrație, limitele scăzute de determinare și posibilitatea determinării simultane a CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125 au făcut posibilă utilizarea microsenzorilor stocastici 3D de tip ac pentru testele de screening ale sângelui integral, salivara, urina și tesuturile 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 t_{on} . Valorile t_{on} s-au utilizat pentru determinarea cantitativă a CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125 în sângele integral, salivă, urină și țesut tumoral, conform procedurii modului stocastic. Nivelele celor patru biomarkeri au fost evaluate în toate cele patru tipuri de fluide biologice (sânge integral, salivă, urină și probe de țesut) cu ambii senzori, iar rezultatele sunt prezentate în Figura 3.



(a)



(b)

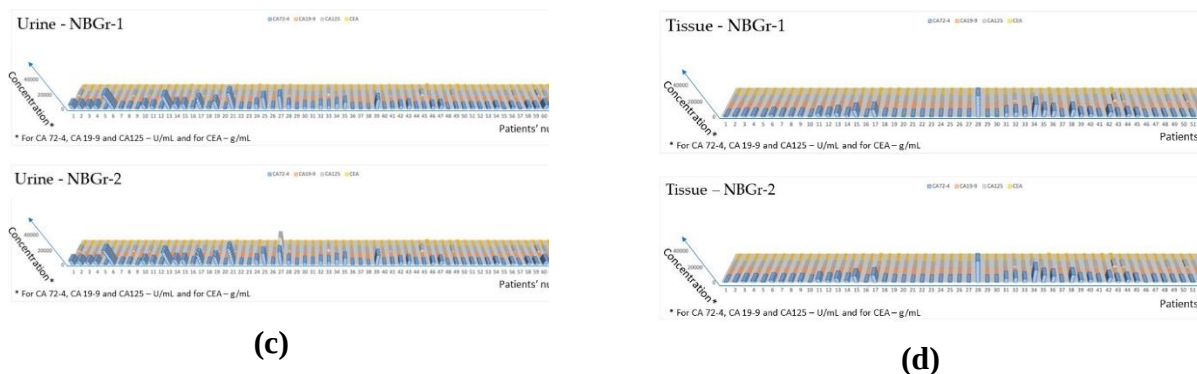


Figura 3. Comparație între rezultatele obținute cu microsenzorii stocastici 3D de tip ac pe baza de NBGr-1 și NBGr-2 pentru testarea celor patru biomarkeri în probe de (a) salivă, (b) sânge integral, (c) urină și (d) țesut gastric tumoral.

Testul *t*-Student s-a 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, mai mici decât valoarea tabelată, demonstrând că nu există o diferență semnificativă statistic între rezultatele obținute folosind cei doi microsenzori stocastici 3D de tip ac. A fost de asemenea efectuat testul *F* la un nivel de încredere de 95%, pentru zece probe de fiecare fel. Valoarea *F* tabelată a fost de 3.18. Rezultatele obținute la compararea abaterilor standard obținute pentru microsenzorii stocastici 3D de tip ac au fost mai mici de 1.00, deci 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 de tip ac și că abaterile standard nu depind de probele analizate. În consecință, microsenzorii propuși pot fi utilizați pentru screeningul sângelui integral, salivei, urinei, precum și al țesuturilor tumorale pentru cei patru biomarkeri.

Cel de-al doilea test efectuat pentru validarea senzorilor stocastici 3D de tip ac și al metodei de screening a fost testul de recuperare. Cantități cunoscute din fiecare biomarker (CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125) a fost adăugat în sângele 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 a fost comparată cu cantitatea cunoscută adăugată în eșantion pentru fiecare dintre biomarkeri. Rezultatele obținute la testele de recuperare sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabel 2. Teste de recuperare pentru CA72-4, CA19-9, CA125 și CEA folosind microsenzorii stocastici 3D de tip ac (N = 10).

Needle 3D Stochastic Microsensor Based on	Biomarker	Whole Blood	Saliva	Urine	Tumoral Tissue
%, Recovery					
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 arată valori ridicate de recuperare pentru toți biomarkerii (CA 72-4, CA 19-9, CA 125 și CEA) atunci când sunt recuperați din sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral. Au fost raportate, de asemenea, valori % RSD foarte scăzute.

Pe baza celor doua teste de validare, se poate concluziona că microsenzorii stocastici 3D de tip ac

propuși pot fi utilizați în mod fiabil 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 utilizat ca test de screening în masă al populației pentru diagnosticul precoce al cancerului gastric.

E) Electroanaliza maspinului în sângele integral

Biomarkerul cunoscut sub numele de Maspin, care a fost identificat pentru prima dată în 1994, aparține familiei serpinelor. Astfel, a fost utilizat ca și biomarker în scopul diagnosticării cancerelor de sân, prostata, piele, plămâni, stomac și colon. Utilizarea electrozilor pentru electroanaliza maspinului în sângele integral este susținută de următoarele avantaje: Prelevarea de probe nu este necesară, deoarece electrodul poate fi introdus direct în proba de sânge pentru a determina nivelurile de biomarkeri, cum ar fi maspin. Analiza este finalizată rapid, de obicei în câteva minute. Utilizarea instrumentelor miniaturizate permite screening-ul eficient al populațiilor mari. Mai mult, această metodă se dovedește a fi rentabilă datorită nivelului ridicat de robustețe și fiabilitate al electrocului, așa cum a susținut studiile anterioare. Originalitatea acestui studiu constă în utilizarea unui electrod construit prin modificarea unei paste de grafit decorată cu Cu sferoidal cu β -ciclodextrină, în testele de screening de sânge integral pentru maspin.

Design-ul senzorului

O pastă omogenă a fost obținută prin combinarea a 200 mg de grafit cu 2 mg de Cu sferoidal, urmată de adăugarea de ulei de parafină. În pastă a fost adăugată o soluție de β -ciclodextrină cu un nivel de concentrație egal cu 10^{-3} mol L^{-1} , rezultând în crearea unei paste modificate. După ce pasta a fost modificată, aceasta a fost introdusă în interiorul unui tub din plastic care a fost fabricat folosind tehnologia de imprimare 3D, cu diametrul interior de 100 μm . Pentru a construi o legătură stabilă între pasta utilizată și circuitul exterior, a fost utilizat un fir de Ag ca și contact electric. Senzorul a fost ținut la temperatura camerei atunci când nu a fost utilizat.

Procedura de analiza

Voltametria cu impulsuri diferențiale (DPV) a fost folosită pentru toate analizele. Intervalul de scanare utilizat a fost de la -1V la +1V, menținând constant în același timp o rată de scanare de 90 mV s^{-1} . Tehnica regresiei liniare a fost folosită pentru a determina parametrii ecuației de calibrare. Prin introducerea valorii intensității curentului în ecuația de calibrare pentru maspin, au fost determinate prin calcul concentrațiile de maspin în sângele integral, concentrații care erau necunoscute anterior.

Probele biologice

Pacienților cu cancer de stomac și de colon li s-au recoltat sânge integral. Înainte de efectuarea studiului, probele de sânge nu au fost tratate. Probele utilizate în acest studiu au fost procurate de la două instituții medicale: Spitalul Clinic de Urgență Județean Târgu-Mureș și Spitalul Clinic Județean Târgu-Mureș. Cercetarea s-a desfășurat cu aprobarea comisiilor de etică respective, Spitalul Clinic de Urgență primind autorizație la data de 14 decembrie 2018 (număr aviz 32647/14.12.2018), iar Spitalul Clinic primind autorizație la data de 28 februarie 2019 (număr aviz 3206/28.02.2019). Toți pacienții au dat consimțământul în cunoștință de cauză.

Rezultate și discuții. Caracteristicile de răspuns ale senzorului utilizat în electroanaliza maspinului

Toate caracteristicile de răspuns au fost obținute folosind DPV, la 25°C. Un interval de concentrație de lucru cuprins între 5,12 pg mL^{-1} și 400 ng mL^{-1} , cu o limită de determinare, definită de cea mai scăzută concentrație observată în intervalul de concentrație liniară, în conformitate cu ghidul IUPAC actualizat (Uniunea Internațională de Chimie Pură și Aplicată) (paragraf 3.36, Nota 3), de 5,12

pg mL⁻¹ și o limită de detecție (calculată ca și concentrația pentru care valoarea intensității curentului este de 3 ori valoarea curentului de fond) de 2,05 pg mL⁻¹ au fost determinate. Ecuația de calibrare a electrodului obținut cu ajutorul DPV (Figura 1) este:

$$I = 851.30 + 185.69 \times C_{\text{maspin}} \quad (1)$$

unde I reprezintă puterea curentului măsurată în A și C_{maspin} denotă concentrația maspinului măsurată în ng mL⁻¹. S-a obținut un coeficient de corelație de 0.9982.

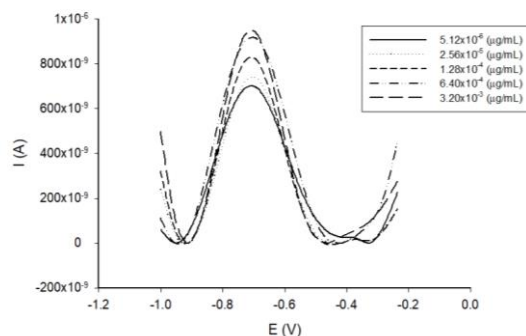


Figura 1. Curba de calibrare a senzorului utilizat în procesul de analiză a maspinului.

Selectivitatea senzorului

HER3, HER4, L-serină, L-acid aspartic, L-triptofan și D-leucină au fost considerați ca și posibile interferenți. Pentru a testa selectivitatea senzorului propus, a fost utilizată tehnica soluției mixte. Un raport de 1:10 (mol/mol) între maspin și presupusul interferent a fost utilizat, atunci când s-au preparat soluțiile mixte sintetice. Au fost determinați coeficienții de selectivitate amperometrici cu următoarele valori: 5.2×10^{-4} pentru HER3, 3.0×10^{-4} pentru HER4, 3.1×10^{-4} pentru L-serină, 2.6×10^{-4} pentru L-acid aspartic, 2.9×10^{-4} pentru L-triptofan și 3.2×10^{-4} pentru D-leucină. Aceste valori au arătat că o posibilă interferență din partea HER3, HER4, L-serină, L-acid aspartic, L-triptofan, D-leucină în determinarea maspinului nu a fost observată.

Electroanaliza maspinului în probe de sânge integral

Figura 2 afișează o voltamogramă reprezentativă obținută în timpul utilizării senzorului pentru analiza maspinului în sânge integral.

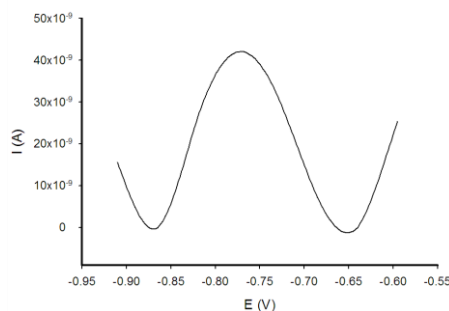


Figura 2. Voltamogramă tipică înregistrată pentru măsurarea nivelurilor de maspin din sânge integral.

Probele de sânge integral au fost analizate fără niciun fel de tratament preliminar. A fost efectuată o analiză comparativă între rezultatele obținute prin utilizarea senzorului sugerat și cele obținute prin

metoda ELISA, care servește ca tehnică stabilită aplicată în laboratoarele clinice. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabel 1. Electroanaliza maspinului în sângele integral (N=10).

Numar proba	DPV	ELISA
	Maspin, pg mL ⁻¹	
1	144.97±0.12	143.20±0.65
2	253.03±0.17	254.00±0.87
3	296.50±0.23	295.70±0.43
4	170.52±0.14	170.30±0.67
5	279.36±0.15	280.00±0.34

Rezultatele unui test t care a avut un grad de încredere de 99.00% (cu o valoare tabelată de 4.13) au fost efectuate pentru a compara rezultatele obținute în urma folosirii metodei ELISA și folosirii senzorului propus prin tehnica de voltametrie cu impulsuri diferențiale (DPV). Această comparație a fost creată cu scopul de a determina dacă metoda DPV a avut rezultate mai precise. Deoarece valoarea rezultată de 1.87 este mai mică decât valoarea tabelată, acest lucru indică faptul că nu există o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între cele două metode.. Acest lucru sugerează că senzorul propus poate fi considerat un instrument de screening fiabil folosind tehnica voltametriei cu impulsuri diferențiale (DPV) pentru a măsura nivelurile de maspin în probele de sânge.

F) Determinarea VSIG în pacienții cu cancer gastric

VSIG1 este o IgSF tipică, cu două domenii extracelulare asemănătoare Ig și un scurt domeniu citoplasmatic. Datorită exprimării sale abundente în stomac, VSIG1 a fost studiată pe larg în cancerul gastric.

Proiectarea microsenzorului stocastic imprimat 3D

Pentru a obține o pastă omogenă, pulbere de NS-Gr a fost amestecată cu ulei de parafină. O cantitate de C4-tetrol au fost adăugate pentru a obține pasta modificată. Ulterior, pasta a fost transferată într-un tub imprimat 3D, care a prezentat proprietăți neconductive. Contactul cu circuitul extern a fost posibil prin inserarea unui fir de Ag în pasta modificată.

Proiectarea senzorului stocastic de unică folosință 2D

Suprafața electrodului stocastic serigrafiat și suprafața electrodului auxiliar sunt pe bază de pelicule de aur, în timp ce suprafața electrodului de referință este pe bază de argint. Suprafața activă a electrodului serigrafiat stocastic a fost modificată cu ajutorul unei soluții de C4-tetrol; înainte și după fiecare măsurare, senzorul a fost curățat cu apă deionizată.

G) Determinarea antigenul carbohidrat (CA) 72-4 si alfa-fetoproteinei in probe biologice utilizand metoda stocastica

Rata ridicată a mortalității cauzate de cancerul gastric se datorează depistării sale târzii și rezecției chirurgicale în stadii avansate ale bolii. Markerii tumorali pot fi utilizați clinic pentru monitorizarea recidivei tumorale și pot fi folosiți ca factori de prognostic, deoarece s-au observat niveluri mai ridicate în cazul bolii avansate. Pentru cancerul gastric, CA 72-4 a fost markerul care a prezentat cea mai mare sensibilitate. Cancerul gastric care produce alfa-fetoproteină a fost asociat cu un prognostic slab din cauza activității proliferative ridicate, apoptozei slabe și neovascularizării bogate, în comparație cu cea a cancerelor gastrice AFP-negative. Aceste caracteristici biologice ale cancerului gastric producător de AFP reflectă comportamentul agresiv al tumorii și prognosticul slab al pacienților cu acest tip de cancer.

Sinteza nanoparticulelor Pd-Ni-rGO

Pentru a obține compozitul dorit, s-a preparat o soluție prin dizolvarea de oxid de grafenă în apă deionizată. Soluția a fost apoi supusă încălzirii într-o baie cu ultrasunete la o temperatură crescută, timp de 1 oră, până la obținerea unei dizolvări totale. Soluția rezultată a fost apoi introdusă în vasul de reacție. Configurația experimentală a inclus utilizarea unui balon cu trei gâturi poziționat pe o placă de agitare, care funcționează într-un mediu reducător obținut prin introducerea hidrogenului gazos. Soluția care conținea precursorii metalici, a fost introdusă cu grijă și treptat în soluția de grafenă din interiorul vasului de reacție. Reducerea precursorilor metalici și a GO a fost realizată cu succes prin introducerea de borohidridă de sodiu în soluția încălzită. Reacția a fost menținută timp de 6 ore la temperatură crescută în prezența unui mediu de hidrogen până când precursorul metalic și GO au fost complet reduse. După răcirea amestecului de reacție, s-a adăugat etanol și, ulterior, amestecul a fost menținut la o temperatură joasă timp de 12 ore. Materialele compozite au fost supuse unei centrifugări, urmată de un proces de uscare. Ulterior, materialele au fost supuse calcinării.

Fabricarea senzorului de arginina

Electrodul screen-printed nemodificat a fost supus unui proces de curățare cu apă deionizată și apoi a fost activat folosind tehnica de voltametrie ciclică (CV) într-o soluție de H_2SO_4 . O dispersie omogenă de nanoparticule binare a fost generată prin dizolvarea mai întâi de nanoparticule sintetizate în apă deionizată. Soluția a fost apoi supusă sonicării pentru o. Ulterior, SPCE a fost modificat prin adăugarea de nanoparticule binare. Aceasta a fost apoi lăsată să se usuce la temperatura camerei timp de o oră. Senzorul a fost fabricat prin polimerizarea electrochimică a argininei. După fabricarea lor, toți electrozii modificați au fost păstrați în condiții ambientale.

Toate obiectivele care au fost planificate pentru a doua etapă a proiectului au fost realizate și îndeplinite. S-au implementat cu succes alegerea matricilor, a modificatorilor, au fost efectuate morfologiile suprafețelor active ale senzorilor stocastici, pentru a se demonstra modificarea cu succes a pastelor pe baza de carbon. Modificatorii au fost aleși astfel încât conductivitatea senzorilor să fie crescută. Matricile senzorilor pot oferi structuri stabile pentru canalele/porii modificatorului, în timp ce oleamidele, β -ciclodextrină, clorură de 2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfina mangan (III), α -ciclodextrina, C4-tetrol și nanoparticule Pd-Ni-rGO, utilizate pentru modificarea matricelor a furnizat canalele/porii necesari pentru dezvoltarea semnalului stocastic. Domeniile largi de concentrație, limitele scăzute de determinare și posibilitatea determinării simultane a CA 72-4, CA 19-9, CEA, CA 125, HER3, HER4, cathepsinei B, a cathepsinei D, p53 și maspinului au făcut posibilă utilizarea microsenzorilor stocastici pentru testele de screening ale sângelui integral, saliva, urina și tesuturile tumorale. Au fost determinate corelații foarte bune între rezultate obținute din probele de sange, saliva, urina și tesut tumoral, provenite de la pacienții cu cancer gastric. S-au efectuat studii de reproductibilitate, stabilitate și selectivitate dovedind faptul că senzorii stocastici propusi pot fi utilizați cu succes pentru testarea biomarkerilor specifici cancerului gastric, în probe biologice.

Trei lucrări au fost publicate în reviste ISI, a patra lucrare a fost acceptată, iar alte două lucrări au fost trimise la reviste ISI și sunt în curs de evaluare. Un capitol de carte, ce are la baza rezultate pe baza utilizării grafenei, a fost publicat la nivel internațional. Rezultate obținute în această etapă au fost prezentate în cadrul a doua conferințe, o conferința internațională și o conferința națională.

Diseminare

Capitole de cărți

Capitolul 16. Nanocompozite pe bază de grafena pentru detectarea hormonilor, în Detectarea la diagnosticare a senzorilor de nanocompozit pe bază de grafen, **R. Ilie-Mihai**, D. Gheorghe, and R. Stefan-van Staden, ed. S. K. Swain and S. Patra, Royal Society of Chemistry, 2023, vol. 60, ch.16, pp. 457-488, Hardback ISBN: 978-1-83767-067-3, PDF ISBN: 978-1-83767-184-7.

Articole publicate în reviste de specialitate de circulație internațională

1. Alexandru-Adrian Bratei, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, **Ruxandra-Maria Ilie-Mihai**, Damaris-Cristina Gheorghe, Simultaneous Assay of CA 72-4, CA 19-9, CEA and CA 125 in Biological Samples Using Needle Three-Dimensional Stochastic Microsensors, *Sensors*, 23, 8046, doi: 10.3390/s23198046, 2023, eISSN 1424-8220.
2. Alexandru-Adrian Bratei, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, **Ruxandra-Maria Ilie-Mihai**, Damaris-Cristina Gheorghe, Molecular Differentiation of Cathepsins B and D, and of p53 Protein, and their Quantitative Assay in Biological Samples, *J. Electrochem. Soc.* 170 097503, DOI10.1149/1945-7111/acf622, 2023.
3. Damaris-Cristina Gheorghe, Raluca-Ioana Stefan-Van Staden, **Ruxandra-Maria Ilie-Mihai** (Corresponding Author), Paula Sfirloaga, Nanoplatfrom-based analysis for the detection of HER3 and HER4 for gastric cancer diagnosis, *Nanotechnology*, 34, 345101, DOI: 10.1088/1361-6528/acd9d3, 2023.
4. Alexandru-Adrian Bratei, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, **Ruxandra-Maria Ilie-Mihai** (Corresponding Author), Electroanalysis of maspin in whole blood, *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, 2023, Accepted.

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

Participarea la conferințe

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.
2. 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, Euroanalysis XXI, Geneva, Switzerland, 27-31 August, 2023.
3. Catalina Cioates Negut, Raluca Ioana Stefan van Staden, Ruxandra Maria Ilie Mihai, Maria Coros, 3D stochastic microsensor based on graphene for the simultaneous determination of p53, HER-3, and HER-4, Euroanalysis XXI, Geneva, Switzerland, 27-31 August, 2023.
4. Catalina Cioates Negut, Raluca Ioana Stefan van Staden, Ruxandra Maria Ilie Mihai, Maria Coros, 3D stochastic microsensor based on graphene for the simultaneous determination of p53, HER-3, and HER-4, 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.

Rezumat al progreselor înregistrate

Livrabilele asociate fiecarui pachet de lucru au fost indeplinite. Selectarea și caracterizarea materialelor și matricelor nanostructurilor active pentru proiectarea senzorilor stocastici combinați, au fost efectuate. Caracterizarea morfologică a materialelor nanostructurate selectate a fost efectuată cu ajutorul SEM. Au fost determinate: proiectarea și evaluarea senzorilor stocastici combinați, determinarea caracteristicilor de răspuns pentru fiecare dintre biomarkerii selectați și testele de recuperare a fiecărui biomarker în amestecuri sintetice și în fluide biologice, precum și cantitățile de biomarkeri propuși. Articolele ce conțin rezultatele obținute, au fost scrise împreună cu echipa și trimise (și unele acceptate) în reviste cu factor de impact ridicat. Diseminarea rezultatelor obținute în această etapă au fost prezentate la conferințe internaționale și naționale. Site-ul www.screenedia.ro a fost actualizat cu informații și rezultate obținute în cadrul proiectului.

Rezumat Executiv

În această etapă a proiectului, s-au obținut rezultate foarte bune, care au condus la îndeplinirea livrabililor și indicatorilor de rezultat. Pentru a demonstra că pastele pe bază de carbon pot fi modificate eficient, morfologiile suprafeței active ale senzorilor stocastici, alegerile matricei și modificatorii au fost toate executate cu succes. Modificatorii au fost aleși cu scopul de a face senzorii mai conductivi. S-au obținut domeniile largi de concentrație, limitele scăzute de determinare atunci când s-au utilizat senzorii propuși. Au fost analizate probe de sânge, salivă, urină și țesut tumoral de la persoane cu cancer de stomac, iar rezultatele s-au dovedit a avea corelații foarte bune între ele. Pe lângă afișarea caracteristicilor răspunsului, sunt prezentate și exemple de diagrame tipice care au fost obținute prin utilizarea metodei stocastice. Pentru a demonstra că senzorii stocastici sugerați sunt capabili să evalueze eficient biomarkerii specifici cancerului de stomac în probe biologice, au fost efectuate teste pentru a investiga reproductibilitatea, stabilitatea și selectivitatea acestora. Au fost programate întâlniri cu echipa în mod regulat pentru a monitoriza progresul etapei, și a determina problemele care trebuiau rezolvate. Integrarea cercetătorilor tineri în echipă s-a realizat treptat și li s-a oferit asistență pentru fiecare etapă a proiectului. Diseminarea rezultatelor obținute s-a realizat prin publicarea unor articole în reviste ISI care au avut un factor de impact ridicat, precum și prin prezentarea datelor la conferințe atât naționale, cât și internaționale.

Referinte

- Y. Yao, Y. Ding, Y. Bai, Q. Zhou, H. Lee, X. Li, and L. Teng, *Front Genet*, 11, 591515 (2021).
- M. Tsujiura, D. Ichikawa, H. Konishi, S. Komatsu, A. Shiozaki, and E. Otsuji, *World J Gastroenterol*, 20, 3265 (2014).
- V. Turk, V. Stoka, O. Vasiljeva, M. Renko, T. Sun, B. Turk, and D. Turk, *Biochim. Biophys. Acta*, 1824, 68 (2012).
- Arteaga C L and Engelman J A 2014 *Cancer Cell* 25 282
- Hynes N E and Lane H A 2005 *Nat. Rev. Cancer* 5 341
- Li Q, Zhang R, Yan H, Zhao P, Wu L, Wang H, Li T and Cao B 2017 *Oncotarget* 8 67140
- Vivanco I and Sawyers C L 2002 *Nat. Rev. Cancer* 2 489
- Wu X, Chen Y, Li G, Xia L, Gu R, Wen X, Ming X and Chen H 2014 *Med. Oncol.* 31 903
- He X X, Ding L, Lin Y, Shu M, Wen J M and Xue L 2015, *J. Clin. Pathol.* 68 374
- Stefan-Van Staden R I, Negut C C and Sfirloaga P 2023, *J. Electrochem. Soc.* 170 037503
- Zheng, T.H.; Zhao, J.L.; Guleng, B. Advances in molecular biomarkers for gastric cancer. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2015, 25, 299–305.
- Matsuoka, T.; Yashiro, M. Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective. *World J. Gastroenterol.* 2018, 24, 2818–2832.
- Guo, L.; Wang, Q.; Chen, K.; Liu, H.P.; Chen, X. Prognostic value of combination of inflammatory and tumor markers in respectable gastric cancer. *J. Gastrointest. Surg.* 2021, 25, 2470–2483.
- Zhang, Z.G.; Xu, L.; Zhang, P.J.; Han, L. Evaluation of the value of multiparameter combined analysis of serum markers in the early diagnosis of gastric cancer. *World J. Gastrointest. Oncol.* 2020, 12, 483–491.
- S. Tang, Z. Ling, J. Jiang, X. Gu, Y. Leng, C. Wei, H. Cheng, X. Li, “Integrating the tumor-suppressive activity of maspin with p53 in returning the epithelial homeostasis: a working hypothesis and applicable prospects”, *Front.Oncol.*, vol. 12, 2022, 1037794
- A.A. Bratei, R.I. Stefan-van Staden, “Minim invasive and fast diagnosis of gastric cancer based on correlations between maspin concentration levels in different biological samples and pathological features in gastric cancer patients”, *Diagnostics*, vol. 13, 2023, 1857
- D.B. Hibbert, E.H. Korte, U. Örnemark, “IUPAC Recommendations. Metrological and quality concepts in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2021)”, *Pure Appl. Chem.*, vol. 93, 2021, pp. 997–1048.

Director de proiect