

Raport științific final (2022 - 2024)

1. Prezentarea generală a obiectivelor ale proiectului, cu punerea în evidență a rezultatelor și gradul de realizare a obiectivelor. Prezentarea trebuie să includă explicații care să justifice diferențele (dacă există) dintre activitățile preconizate și cele realizate.

Principalele obiective ale proiectului sunt:

- Identificarea de noi materiale și matrici nanostructurate pentru proiectarea de senzori stocastici, caracterizate complet folosind tehnici AFM, SEM și TEM.
 - ✓ 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, XRD și EDX.
- Proiectarea de noi senzori fiabili pentru testarea antigenului carbohidrat (CA 72-4), a alfa-fetoproteinei, a antigenului carbohidrat (CA 12-5), a factorului de creștere epidermică (EGFR).
 - ✓ Senzorii stocastici au fost creați ca senzori combinați constând din senzorul stocastic, electrodul de referință (Ag/AgCl) și electrodul auxiliar (fir de Pt).
 - ✓ Compușii activi pentru proiectarea senzorilor stocastici funcționali au făcut parte din clasa oleamidelor. Ca materiale matriciale, au fost studiate nanografenele de tip carbon, nanoparticulele de aur (AuNP) și nanoparticulele de cupru (CuNP). Aceste materiale au fost alese în principal pe baza capacității lor de a menține o formă stabilă pentru canalele materialelor nanostructurate alese, care sunt utilizate în senzorii stocastici.
 - ✓ Pentru analiza biomarkerilor sugerați, senzorii combinați au fost calibrați. Semnăturile fiecărui biomarker sugerat au fost determinate pentru fiecare senzor combinat. Acest lucru a facilitat efectuarea unei analize calitative a biomarkerilor în fluidele biologice, dar și evaluarea parametrilor cantitativi pentru fiecare biomarker, care includ limita de cuantificare, sensibilitatea și intervalul de concentrație de lucru.
- Validarea metodei și a senzorilor folosind fluide biologice reale (sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral) de la pacienți cu cancer gastric confirmat.
 - ✓ Validarea senzorilor propuși a fost făcută folosind probe biologice reale (sânge integral, salivă, urină și țesut tumoral) de la pacienți confirmați cu cancer gastric.
 - ✓ Au fost determinate corelații foarte bune între rezultate obținute din probele de sange, saliva, urina și țesut tumoral, provenite de la pacienții cu cancer gastric.
 - ✓ S-au efectuat studii de reproductibilitate, stabilitate și selectivitate dovedind faptul că senzorii stocastici propuși pot fi utilizați cu succes pentru testarea biomarkerilor specifici cancerului gastric, în probe biologice
- Diseminarea rezultatelor în reviste ISI cu factor de impact mare, conferințe.
 - ✓ Diseminarea rezultatelor obținute s-a realizat prin publicarea a 5 articole în reviste ISI care au un factor de impact ridicat, 2 articole sunt în evaluare, 3 articole sunt

trimise spre publicare, doua capitole de carte publicat in RSC si Springer, precum și prin prezentarea datelor la conferințe atât naționale, cât și internaționale.

- Implicarea și formarea tinerilor la nivel de doctorat pentru cercetare.
 - ✓ Integrarea cercetătorilor tineri în echipă s-a realizat treptat și li s-a oferit asistență pentru fiecare etapă a proiectului.

2. Prezentarea și argumentarea nivelului de maturitate tehnologică (TRL) la finalul proiectului.

Toate obiectivele vizate pentru fiecare etapă a proiectului au fost atinse cu succes. Senzorii electrochimici oferă o soluție rentabilă și portabilă pentru diverse aplicații analitice, oferind capacități de detecție atât sensibile, cât și selective. Producția electrodului senzorului, care servește drept componentă a traductorului, este o etapă crucială și solicitantă. Din fericire, există deja o gamă diversă de materiale inovatoare disponibile care posedă o conductivitate electrică excelentă. Selecția de materiale pentru modificarea senzorilor include oleamide, ciclodextrine și metale nobile datorită capacității lor de a crea complexe de incluziune, care îmbunătățesc detectarea analiților țintă. În plus, modificarea electrozilor duce la dezvoltarea unor senzori electrochimici foarte selectivi. Senzorii stocastici utilizează matrici compuse din materiale grafenice datorită capacității lor de a oferi o sensibilitate excepțională în detecția electrochimică, o rată rapidă de transfer de electroni, o rezistență minimă la transferul de sarcină și o conductivitate electrică și termică remarcabilă. Aceste proprietăți sporesc viteza de răspuns și sensibilitatea senzorilor. Pentru a analiza mai mulți biomarkeri ai cancerului gastric, au fost efectuate măsurători preliminare cu ajutorul senzorilor stocastici. S-au obținut sensibilități ridicate și s-au măsurat, de asemenea, limite de cuantificare de până la câteva fg/mL, cu un interval de concentrație de lucru cuprins între câteva fg/mL și câteva mg/mL. Atunci când s-au observat recuperări ridicate (peste 98,0 %), senzorii au fost evaluați în continuare pentru patru tipuri diferite de probe biologice, inclusiv probe de sânge integral, salivă, urină și țesuturi. Aceste studii au dus la o nouă eră a analizei biomarkerilor cu ajutorul senzorilor stocastici, care pot oferi un răspuns fiabil atât pentru analiza calitativă, cât și cantitativă a diferitelor probe, demonstrând totodată eficacitatea utilizării senzorilor stocastici pentru detectarea cancerului gastric. Am pornit de la un TRL 2, conceptul tehnologiei fiind cunoscut și aplicațiile formulate și am ajuns TRL 4 în care instrumentele de screening propuse au fost complet validate în laboratorul de cercetare, utilizând probe reale: sange, saliva, urina și tesut. Student t-test efectuat în cadrul validării la nivel de confidență de 99%, a demonstrat că instrumentele propuse pot fi utilizate fiabil la scanarea probelor reale, sange, saliva, urina și tesut.

3. Gradul de atingere a rezultatelor estimate (prezentarea produsului/tehnologiei sau a serviciului rezultat al proiectului).

Senzorii stocastici oferă o alternativă viabilă la senzorii electrochimici convenționali și la procedurile cromatografice. Aceștia au capacitatea de a determina simultan atât calitatea, cât și cantitatea mai multor analiți în cadrul unei singure analize. Introducerea acestora ca instrumente în analiza biomedicală și în nanomedicină are potențialul de a spori limitele de detecție a substanțelor chimice semnificative din punct de vedere biologic, abordând astfel provocarea identificării timpurii a bolilor. Aceștia pot identifica în mod individual analiții dintr-un amestec, luând în considerare factori precum dimensiunea, geometria, capacitatea de desfășurare (pentru proteine) și viteza analiților în raport cu dimensiunea și forma canalului senzorului.

Obiectivul principal al acestui proiect a fost de a avansa în detectia unor noi biomarkeri pentru cancerul de stomac și de a valida abordarea tehnologiei de laborator prin identificarea biomarkerilor de cancer gastric în probe biologice. Rezultate așteptate: (1) senzori stocastici combinați concepuți și complet caracterizați pentru analiza biomedicală; (2) tehnologie validată în laborator, pentru testarea antigenului carbohidrat (CA) 72-4, alfa-fetoproteinei, antigenului carbohidrat (CA) 12-5, factorului de creștere epidermică (EGFR) în probe biologice; (3) proiectul va genera o serie de rezultate de înaltă calitate care vor fi publicate în reviste internaționale de top; (4) formarea de tineri cercetători și doctoranzi va fi continuată pe parcursul proiectului. Toate rezultatele estimate dar și stabilite pentru fiecare etapă a proiectului au fost îndeplinite. Selecția matricelor, a modificatorilor și a morfologiilor stocastice ale suprafețelor active ale senzorilor au fost executate în mod eficient pentru a demonstra modificarea cu succes a pastelor pe bază de carbon. Modificatorii au fost aleși pentru a îmbunătăți conductivitatea senzorilor. Domeniile largi de concentrație, limitele scăzute de determinare și capacitatea de a determina simultan un panel de biomarkeri fac ca senzorii stocastici să fie potriviți pentru testele de screening ale sângelui integral, salivei, urinei și țesuturilor canceroase. Rezultatele probelor de sânge, salivă, urină și țesuturi tumorale de la pacienți cu cancer de stomac au arătat corelații foarte excelente. S-au efectuat investigații privind reproductibilitatea, stabilitatea și selectivitatea pentru a demonstra că senzorii stocastici propuși pot fi utilizați cu succes pentru evaluarea biomarkerilor specifici cancerului de stomac în probele biologice și pentru validarea metodei de screening.

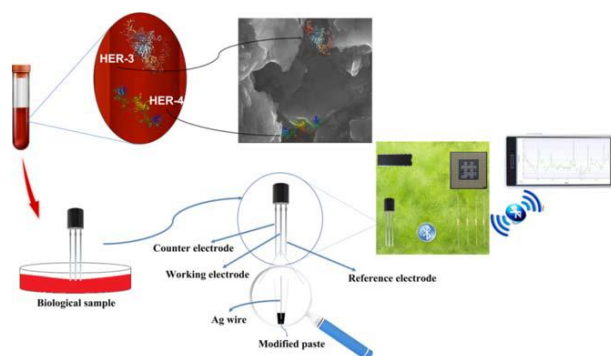
4. Impactul rezultatelor obținute, cu sublinierea celui mai semnificativ rezultat obținut.

- Șansele de supraviețuire, starea generală de bine și costul tratamentului medical sunt influențate în mare măsură de rapiditatea cu care este diagnosticată această afecțiune. Reducerea ratelor de mortalitate și îmbunătățirea prognosticului general pentru cei afectați de cancer de stomac depind de identificarea rapidă a bolii. Reducerea ratelor de mortalitate poate fi atribuită, în parte, utilizării sporite a tehnologiilor de screening pentru identificarea precoce a cancerului gastric.
- Avantajul utilizării senzorilor stocastici pentru astfel de măsurători este, în primul rând, posibilitatea identificării fiabile a biomarkerilor în fluidele biologice - utilizate așa cum au fost prelevate de la pacient - și cuantificarea fiabilă a acestora pe baza utilizării ecuațiilor de calibrare obținute pentru fiecare analit cu un anumit senzor combinat. De asemenea, senzorii stocastici pot fi utilizați pentru detectarea mai multor analiți, cu un cost foarte mic per analiză. Identificarea timpurie a acestei boli specifice are un efect major asupra șanselor de supraviețuire, asupra calității generale a vieții și asupra costurilor intervenției medicale.
- S-a identificat și selectat cele mai eficiente matrici și modificatori pentru proiectarea senzorilor stocastici. A fost explicată procedura de imobilizare a diversilor modificatori, inclusiv oleamide, α -CD, porfirine, nanoparticule metalice, nanograft, grafit, grafena, diamant, grafena exfoliată, nano-grafena, particule sintetizate. A fost definită metoda de obținere a grafenei exfoliate, iar pastele modificate au fost caracterizate prin SEM, XRD și EDX. Senzorii stocastici au fost dezvoltați, caracterizați și validați în scopul identificării biomarkerilor asociați cancerului gastric (Catepsina B, Catepsina D, CEA, CA19-9, p53, CA72-4, CA12-5, HER3, HER4, maspin, VSIG1, MMP1, MMP2, EGFR, AFP) într-o varietate de probe biologice. Au fost prezentate exemple de grafice tipice obținute prin metoda stocastică, pe lângă caracteristicile de răspuns. S-au efectuat studii de reproductibilitate, stabilitate și selectivitate dovedind faptul că senzorii stocastici propuși pot fi utilizați cu succes pentru testarea biomarkerilor specifici cancerului

gastric, în probe biologice. Metoda cronoamperometrică a fost utilizată pentru a efectua măsurători stocastice la un potențial de 0,125 V pe mai multe dispozitive potențimetrice (EmStatPico, EmSTAT4S, EMStat4H, software-ul PSTrace) care au fost conectate la un computer. Saliva, sângele integral, urina și țesuturile tumorale au fost colectate de la persoane care au fost diagnosticate cu tumori maligne ale stomacului. Proiectul de studiu a primit aprobarea Comitetului de Etică al Spitalului Clinic Județean de Urgență Târgu-Mureș, cu numărul de referință 32647/2018. Toți pacienții implicați în proiectul de cercetare și-au dat consimțământul informat.

Utilizarea unei nanoplatforme pe baza de ciclodextrina pentru determinarea HER3 și HER4 în probe biologice

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. Pulberea de nanografenă a fost aleasă pentru senzorii stocastici datorită numeroaselor sale avantaje și a fost modificată ulterior cu α -ciclodextrină (α -CD) pentru a oferi porii necesari pentru detecția stocastică. În acest studiu au fost utilizate patru tipuri diferite de probe biologice de la pacienți care fuseseră deja diagnosticați cu cancer gastric.

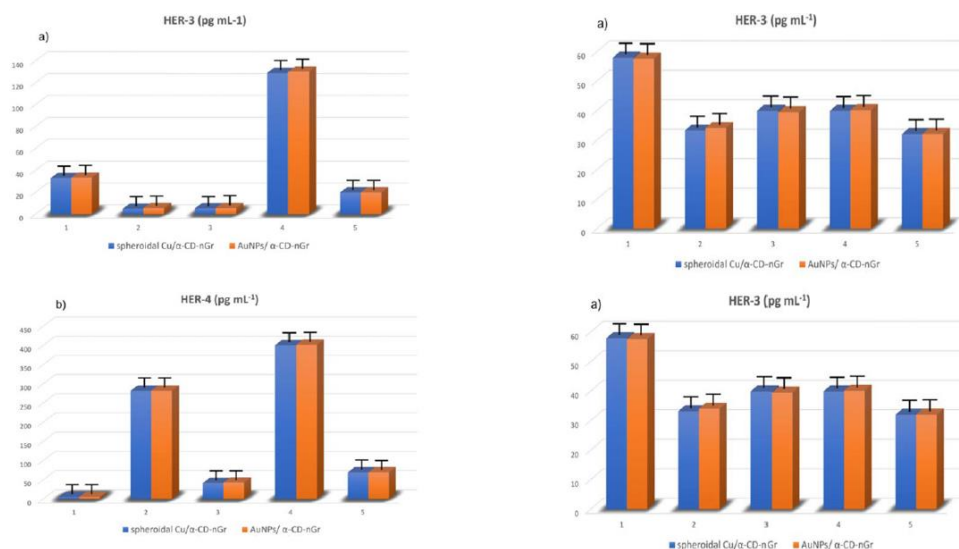


Construcția și configurarea nanoplatformei

Etapa 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.

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 ton să fie citit și utilizat în modul stocastic pentru a determina concentrația de HER3 și HER4. Rezultatele testelor pentru probele biologice (cinci probe de sânge integral și cinci probe de țesut tumoral) sunt prezentate în figurile de mai jos.



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

Diferențierea moleculară a catepsinelor B și D și a p53 și determinarea cantitativă a acestora în probe biologice

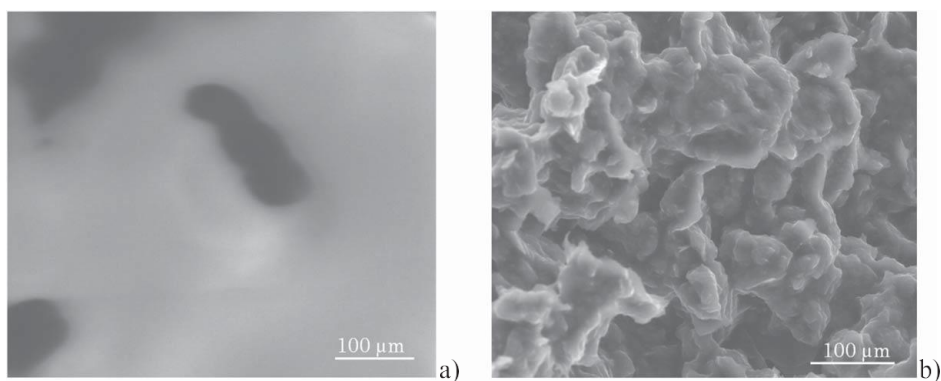
Aproximativ 40 de ani de cercetare au fost dedicați înțelegerii legăturii dintre catepsine și creșterile maligne. Distrugerea și modificarea matricei extracelulare (ECM) în micro-mediul tumoral este accelerată de prezența mai multor catepsine, care contribuie la dezvoltarea și invazia tumorală.

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.

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 100 mg de pulbere s-a adăugat ulei de parafină. În continuare, pastele de diamant și nanografene au fost modificate cu 100μL de soluție de clorură de 2,3,7,8,12,12,17,18 -Octaetil-21H,23H-porfirină de mangan (III) (10^{-3} M în THF), obținându-se doi senzori, denumiți Mn(OAP)Cl/nDP și Mn(OAP)Cl/nGr. 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.

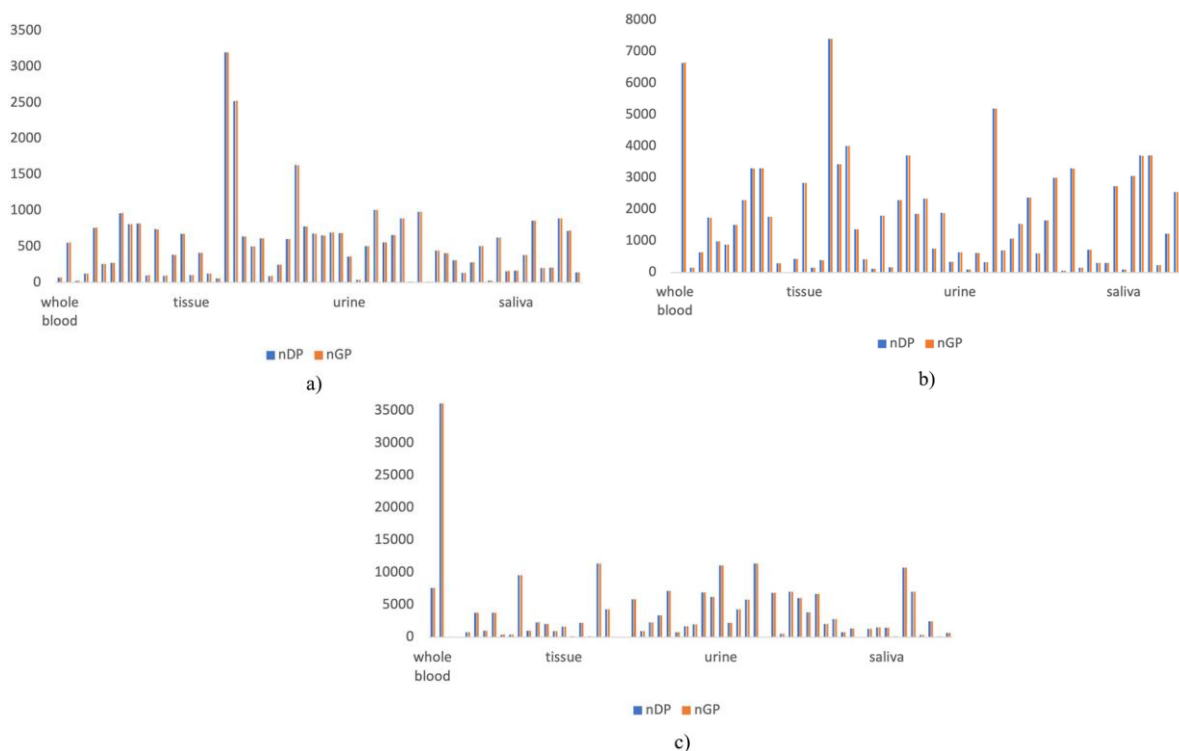
Morfologia suprafețelor active ale microsenzorilor stocastici.

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.



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

Modul stocastic a fost utilizat pentru recunoașterea moleculară și cuantificarea celor trei biomarkeri. Sângele integral, saliva, urina și țesuturile tumorale de la pacienții confirmați cu cancer gastric au fost analizate fără nicio prelucrare. Nivelurile celor trei biomarkeri au fost evaluate în probele biologice folosind ambii microsenzori stocastici.



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) catepsina B și (c) catepsina D, în sânge integral, țesut, urină și salivă.

Exista 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.

Determinarea simultană a CA 72-4, CA 19-9, CEA și CA 125 în probe biologice cu ajutorul unui senzor stocastic 3D de tip ac

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 celei 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 celei electrochimice, a fost utilizat un fir de argint.

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.

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

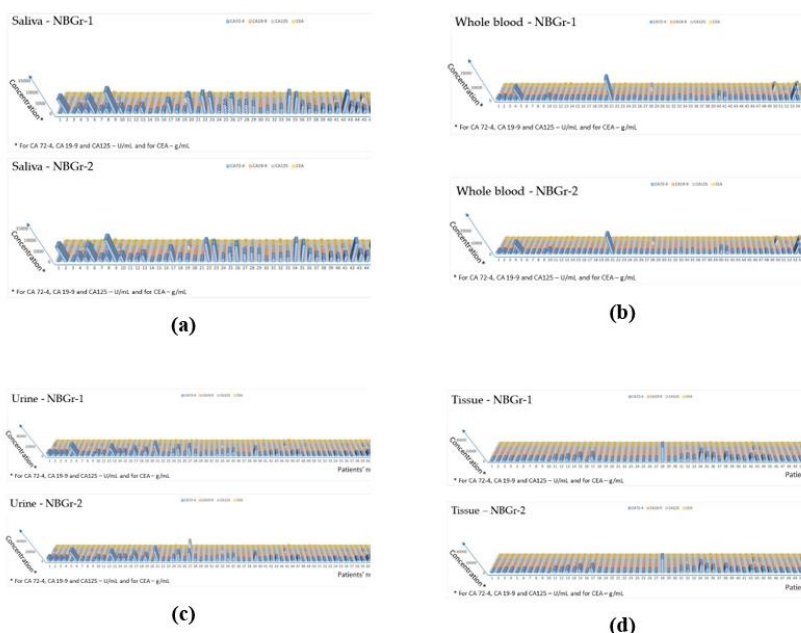
Senzori stocastici	Domeniu de concentrație de lucru	Ecuația de calibrare și r^*	t_{off} (s)
CA72-4**			
N8/ EGR-1 (SPEXF91)	0.004 - 4000	$1/ton=0.07+1.43 \times 10^{-5}C$ $R=0.9977$	1.0
N8/ EGR-2 (SPEXF96)	4.00×10^{-11} - 4000	$1/ton=0.04+1.06 \times 10^{-5}C$ $R=0.9923$	1.6
CA12-5**			
N8/ EGR-1 (SPEXF91)	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

* $<1/ton> = s^{-1}$; **< CA72-4/ CA12-5/ CA19-9> - concentrație = U mL⁻¹; ***<CEA> - concentrație = μg mL⁻¹, <r> - coeficient de corelație

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, saliva, urina și țesuturile 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 ton. Valorile ton 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. Nivelurile 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 de mai jos.



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.

Senzor stocastic bazat pe C4/tetrol pentru determinarea VSIG1 in probe biologice

Datorită exprimării sale abundente în stomac, VSIG1 a fost studiată pe larg în cancerurile gastrice. Mai mult, reducerea VSIG1 a fost corelată în mod semnificativ cu o supraviețuire generală slabă și cu un rezultat clinic prost, la pacienții cu cancer gastric, sugerând că VSIG1 poate funcționa ca o genă supresoare de tumori. Cuantificarea VSIG1 în probe reale s-a realizat cu ajutorul senzorului stocastic C4-tetrol/NS-Gr imprimat 3D și cu senzorului stocastic 2D de unică folosință C4-tetrol/ Au.

Senzor stocastic portabil bazat pe poliarginină și nanoparticule bimetalice ancorate pe oxid de grafena redusa pentru determinarea simultană a alfa-fetoproteinei și a CA 72-4

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. Prezentul studiu dezvoltă un nou senzor stocastic portabil pe baza a unui electrod de carbon serigrafat modificat cu poli-arginină și nanoparticule bimetalice sintetizate. Acest senzor permite detectarea simultană a AFP și CA 72-4 în diferite probe biologice, cum ar fi sângele integral, saliva și țesutul tumoral gastric.

Senzori stocastici 2D utilizati la determinarea MMP1 si MMP2 in probe biologice

Nivelurile crescute de MMP au fost asociate în mod constant cu stadii tumorale mai avansate, invazivitate crescută și rate de supraviețuire generală nefavorabile în aproape toate formele de tumori solide, inclusiv cancerul gastric. Astfel, MMP1 și MMP2 sunt indicatori ai progresiei bolii și au potențialul de a fi ținte de intervenție terapeutică.

Dezvoltarea a trei senzori stocastici bidimensionali pe bază de mătase, care au fost modificați cu heptakis(2,3,4-tri-O-metil)-beta-ciclodextrină, reprezintă aspectul inovator al acestui studiu. Acești senzori sunt concepuți pentru a efectua o analiză cantitativă simultană a MMP1 și MMP2 într-o varietate de probe biologice, inclusiv urină, salivă, sânge integral și țesut tumoral gastric.

Determinarea simultană a HER-1 și CA 125 in probe biologice

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. Valorile HER-1 și CA 125 au fost măsurate simultan în probe biologice, cum ar fi saliva, sângele integral și tumorile din țesutul stomacal, utilizând senzorul portabil proiectat. Compararea metodei stocastice din studiul actual cu metodele anterioare de determinare a HER-1 și CA 125 dezvăluie mai multe beneficii. Această metodă este foarte intuitivă și poate identifica atât HER-1, cât și CA 125 în același timp, ceea ce nu este posibil cu tehnicile analitice convenționale. Cu toate acestea, senzorul stocastic s-a comportat mai bine decât studiile anterioare în ceea ce privește intervalul său de concentrație liniară și limita de cuantificare.

Determinarea simultană a CA12-5, CA72-4, EGFR și AFP in probe biologice utilizand senzori stocastici 3D

Descoperirea biomarkerilor care pot fi utilizați în testele de screening pentru a facilita depistarea precoce a cancerului este de o importanță capitală. În cazul în care detectarea unui singur biomarker într-o probă biologică este insuficientă pentru a identifica un anumit tip de cancer, validitatea testului de screening va fi alterată de creșterea numărului de biomarkeri care pot fi identificați și cuantificați cu ajutorul ecranelor. Tehnicile ELISA și de chemiluminescență utilizate în laboratoarele clinice acreditate sunt limitate la identificarea unui singur biomarker per analiză. Aceste tehnici prezintă mai multe dezavantaje, inclusiv cerința ca proba să fie prelucrată înainte de măsurare și costul exorbitant per analiză. CA 72-4 este o mucină epitelială asociată tumorilor care este exprimată în adenocarcinoame, inclusiv în cancerule gastrice, de colon și de sân, dar este prezentă în cantități mai mici în țesuturile normale. CA 72-4 este asociat cu o sensibilitate și o specificitate ridicată în cazul tumorilor sistemului digestiv.

În diagnosticul a numeroase carcinoame ale tractului digestiv, CA 125 este o glicoproteină care este prezentă în epiteliul care căptușește cavitățile corpului și este asociată cu o sensibilitate și o specificitate ridicate. În prezent, există o lipsă de cercetări care încorporează studii electrochimice în

analiza HER-1 și AFP în probele biologice. Aplicația potențială a nanomaterialelor funcționale în detectarea și măsurarea analiților este dezvoltarea de senzori, care și-au demonstrat potențialul ca fiind candidați promițători în acest domeniu.

În acest studiu, pudre de grafena, grafit și nano-grafena au fost modificate cu o soluție de oleamidă N2. Senzorii stocastici au fost utilizați pentru diferențierea și cuantificarea simultană a CA12-5, CA72-4, EGFR și AFP în sângele integral, saliva, urină și țesutul tumoral. Noutatea acestei lucrări este dată de compoziția părții active a senzorilor stocastici, precum și de utilizarea acestora pentru a diferenția între cei patru biomarkeri din probele biologice.

5. Detalii privind exploatarea și diseminarea rezultatelor proiectului.

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.
- 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, In: Swain, S.K., Biswal, A. (eds) Chitosan Nanocomposites. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. Springer, Singapore, 2023, pp 109–133, ISSN 1618-7210.

Participare la conferințe

- 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.
- 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.
- 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.
- Damaris-Cristina Gheorghe, Raluca Ioana Stefan-van Staden, Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, Fast screening of biological fluids for VSIG1 – a diagnostic tool for gastric cancer, Euroanalysis XXI, Geneva, Switzerland, 27-31 August, 2023.
- 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.

- 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

Articole publicate in reviste de specialitate de circulatie internationala

- Catalina Cioates Negut, Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, Raluca-Ioana Ștefan-van Staden, Determinarea metaloproteinei matriceale 2 în probe biologice utilizând un microsenzor stocastic 3D bazat pe oxid de grafenă / nanoparticule de Au/(Z)-N-(piridin-4-il-metil) octadec-9-enamidă, Int. J. Mol. Sci. 2024, 25(12), 6720; <https://doi.org/10.3390/ijms25126720>
- Alexandru-Adrian Bratei, Raluca-Ioana Ștefan-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.
- Alexandru-Adrian Bratei, Raluca-Ioana Ștefan-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.
- Catalina Cioates Negut, Raluca-Ioana Ștefan-van Staden¹, Ruxandra-Maria Ilie-Mihai¹, Maria Coroș, 3D Stochastic Microsensors for Simultaneous Assay of p53, HER-3, and HER-4 - a Key Factor in the Early Detection of Gastric Cancer, Journal of The Electrochemical Society, 2023, 170, 127513.
- Damaris-Cristina Gheorghe, Raluca-Ioana Ștefan-Van Staden, Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, 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.
- Alexandru-Adrian Bratei, Raluca-Ioana Ștefan-van Staden, Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, Electroanalysis of maspin in whole blood, U.P.B. Sci. Bull., Series B, Vol. 86, Iss. 1, 2024.

Articole in curs de evaluare sau trimise spre publicare:

- Van Staden Raluca-Ioana, Gheorghe Damaris Cristina, Mihai Ruxandra-Maria, Molecular Recognition of VSI1 in Biological Samples for Fast Diagnosis of Gastric Cancer
- Georgescu Ramona, Comnea Ionela-Raluca, Van Staden Raluca-Ioana, Mihai Ruxandra-Maria, Portable stochastic sensor based on poly-arginine and bimetallic nanoparticles anchored on reduced graphene oxide for simultaneous determination of alpha-fetoprotein and CA 72-4 in the early detection of gastric cancer
- Damaris-Cristina Gheorghe, Raluca-Ioana Ștefan-van Staden, Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, Marius Badulescu, Rapid and Simultaneous Analysis of MMP1 and MMP2 in Gastric Cancer Using 2D Disposable Stochastic Sensors
- Ionela Raluca Comnea-Stancu, Ramona Georgescu-State, Raluca-Ioana Ștefan-van Staden, Razvan Nicolae State, Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, Senzorul stochastic portabil ca instrument de screening pentru determinarea simultană a HER-1 și CA 125 - un factor cheie în recunoașterea rapidă a cancerului gastric

- Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, Tuchi Bianca, Raluca-Ioana van Staden, Paula Sfirloaga, Early gastric cancer: simultaneous three-dimensional stochastic sensor screening of CA12-5, CA72-4, EGFR, and AFP

6. Prezentarea livrabililor/indicatorilor obținuți la finalul proiectului comparativ cu cei propuși.

Nr. crt.	Livrabile/indicatori planificați	Nr.	Livrabile/indicatori realizați	Nr.
1.	Tehnologie pentru design senzori	1	Senzori construiți utilizând paste	3
2.	Tehnologie pentru fabricare senzori 2D	0	Senzori construiți pe baza de matase/screen printed/filme	2
3.	Tehnologie pentru fabricare senzori 3D (TRL 4)	1	Senzori 3D fabricați în laborator (TRL 4)	6
4.	Validare metoda de laborator	4	Validare prin utilizarea probelor biologice	11
5.	Prezentări orale la conferințe naționale/internationale	1	Prezentări orale la conferințe naționale/internationale	1
6.	Prezentări postere la conferințe naționale/internationale	2	Prezentări postere la conferințe naționale / internationale	5
7.	Articole științifice în reviste ISI	2	Articole științifice în reviste ISI	11
8.	Capitole de carte	0	Capitole de carte la edituri în străinătate	2
9.	Rapoarte științifice	3	Rapoarte științifice anuale	3
10.	Website proiect	1	Website proiect realizat și actualizat	1

Notă:

Pe lângă cele menționate mai sus, raportul final trebuie să conțină și o prezentare succintă (2-3 paragrafe) a rezultatelor obținute în cadrul proiectului, rezultate ce urmează să fi diseminate de Autoritatea Contractantă în materiale de promovare a rezultatelor obținute în cadrul programelor de finanțare. Menționăm că acest text trebuie să fie pe înțelesul publicului.

Prezentarea trebuie să fie însoțită de 2-4 poze reprezentative pentru proiect (format JPG).

Acestea trebuie să se regăsească și pe pagina web a proiectului.

Biomarkerii proteici care au legătură cu cancerul sunt în special asociați cu bolile oncologice. Existența lor în fluidele biologice sau în țesuturi poate furniza date vitale pentru programele de screening clinic și pentru identificarea precoce a cancerului, ceea ce are ca rezultat beneficii economice uriașe pentru societate și pentru sistemele de sănătate. Prin urmare, necesitatea unor abordări analitice fiabile pentru identificarea biomarkerilor tumorali în stadiile incipiente ale carcinogenezei este extrem de semnificativă.

Obiectivul principal al acestui proiect a fost de a identifica noi biomarkeri pentru cancerul de stomac și de a valida tehnologia la nivel de laborator, din probe biologice. Depistarea precoce a cancerului, atunci când există o probabilitate mai mare de terapie și vindecare, este posibilă datorită acestor indicatori tumorali. Senzorii stocastici oferă o alternativă viabilă la senzorii electrochimici convenționali și la procedurile cromatografice. Aceștia au capacitatea de a determina simultan atât calitatea, cât și cantitatea mai multor analiți în cadrul unei singure analize. Domeniile largi de concentrație, limitele scăzute de determinare și capacitatea de a determina simultan un panel de biomarkeri fac ca senzorii stocastici să fie potriviți pentru testele de screening ale probelor biologice.

Rezultatele probelor de sânge, salivă, urină și țesuturi tumorale de la pacienți cu cancer de stomac au arătat corelații foarte bune fata de metoda clasica. Studiile de reproductibilitate, stabilitate și selectivitate pentru a demonstra că senzorii stocastici propuși pot fi utilizați cu succes pentru evaluarea biomarkerilor specifici cancerului de stomac în probe biologice și pentru validarea metodei de screening.

