Multimode microsensors based on micro and nanostructured materials, with applications in biomedical analysis

Project Acronym: MULTIMODESCREEN

Contract Nr. 22/2014 Acest proiect este finantat de catre Unitatea Executiva pentru Finantarea Invatamantului Superior, a Cercetarii, Dezvoltarii si Inovarii

PN-II-PT-PCCA-2013-4-1097

Project Leader (PL):CSI Dr. Habil. Raluca-Ioana van Staden

PL's Project Laboratory: Laboratory of Eectrochemistry and PATLAB Bucharest

PL's Host Institution for the project: National Institute of Research and Development for Electrochemistry and Condensed Matter (INCEMC), Timisoara

Project duration in months: 24 months (2014-2016)

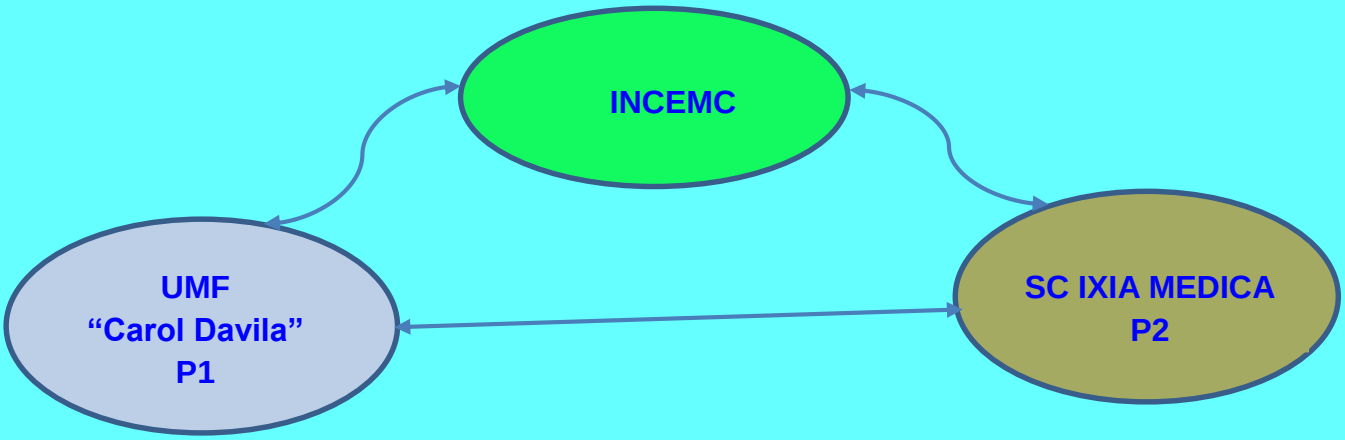
Project budget: 1.437.500RON

Project Summary

The project is proposing the design and validation of a new type of microsensors, namely multimode microsensors and the associated screening methods for early detection of colorectal cancer and its personalized treatment. The multimode microsensors will be able to perform qualitative and quantitative determinations of specific biomarkers for colorectal cancer in biological fluids such as whole blood, and saliva. The proposed microsensor, is called multimode because the same microsensor will be used in different electrochemical modes (without taking it off from the solution/sample) such as: stochastic (for qualitative and quantitative analysis), amperometric, e.g., differential pulse voltammetry (for quantitative analysis), potentiometric (for quantitative analysis) and/or surface plasmon resonance (SPR) (for certain type of matrices, e.g., gold, when qualitative and quantitative determinations can be performed). Switching modes is a common

characteristic of the modern full controlled equipments and will be relatively easy to implement in the new designed dedicated equipment for biomedical analysis. The microsensors will be designed with new type of electrochemically active substances/new nanomaterials or/and nanostructured materials in new matrices using reliable technologies. The prime selected field of applications is biomarker detection in whole blood and saliva, and also based on it, finding of a personalized treatment. The biomarkers selected will be specific for colorectal cancer, the main goal of the project being to have highly sensitive and reliable tools and methods for screening populations at low cost as well as the possibility to perform a personalized treatment of the patients with such diseases.

Partners:



Team Members

INCEMC

Name	Role in the project
Raluca-Ioana van Staden, Dr habil., CSI	Director of Project
Jacobus Frederick van Staden, DSc, Prof., CSI	Key person
Carmen-Cristina Surdu-Bob, PhD, CSIII	Key person
Bogdan Calenic, PhD	Postdoc
Iuliana Moldoveanu, MSc	PhD student
Livia Alexandra Gugoasa, MSc	PhD student
Ionela Raluca Comnea, MSc	PhD student
Ramona Georgescu, MSc	PhD student
Oana Elena Stoica, MSc	Technician

P1 UMF “CAROL DAVILA”

Name	Role in the project
Narcis Zarnescu, MD	Responsible for P1
Maria Sajin, MD, PhD, Prof.	Key person
Stefan Neagu, MD, Prof	Key person
Costel Savlovschi, MD, PhD, Prof	Key person
Camelia Gavan, MD	PhD student
Meda Comandasu, MD	PhD student
Iurie Turcanu, MD	PhD student

P2 SC IXIA MEDICA

Name	Role in the project
Ghioca Alina, Head of laboratory	Responsible for P2
Razvan Vintilescu, General Manager	Key person
Calugarescu Ionelia	Member
Voinea Ionela, MD	Member
Ciprian Tiganesteanu	Member
Diana Anton	Member
Bogdan Isculescu	Member
Mihaela Tica	Member

Objectives

The following are the main objectives of the project:

O1 To identify the best micro and nanostructured materials to be used in multimode microsensors technology;

O2 To prepare/obtain the new micro and nanostructured materials for microsensors and characterize them, using complementary bulk and surface analysis techniques;

O3 To identify and perform tests for the best matrix for their immobilization, and to optimize size and geometry of multimode microsensors;

O4 Characterization of the new designed multimode microsensors, regarding response characteristics, selectivity.

O5 Validation of the new method of screening using the new designed multimode microsensors for determination of different biomarkers for colorectal cancer in blood and saliva;

O6 Validation of screening method using the new developed multimode microsensor vs the cells counting method for building cytostatograms used in personalized treatment for colorectal cancer;

O7 Integration of young researchers in the laboratory teams.

Methodology

Intermediate milestones:

- **December 2014**
  - **new nanostructured materials for multimode microsensor's design;**
  - **protocol for the biological samples;**
  - **starting of collection of biological samples;**
  - **design of the first sensors for screening for colorectal cancer biomarkers.**
- **December 2015**
  - **design of new multimode sensors based on nanostructured materials and their validation for analysis of specific biomarkers for colorectal cancer;**
  - **evaluation of the protocols and results of cytostatograms obtained using cell cultures and preliminary results for tumoral tissues.**
- **June 2016**
  - **validated method for screening for colorectal cancer;**
  - **validated protocol for cytostatogram.**

The project is structured in the following work packages:

WP1 Development of multimode microsensors for biomarkers specific for colorectal cancer

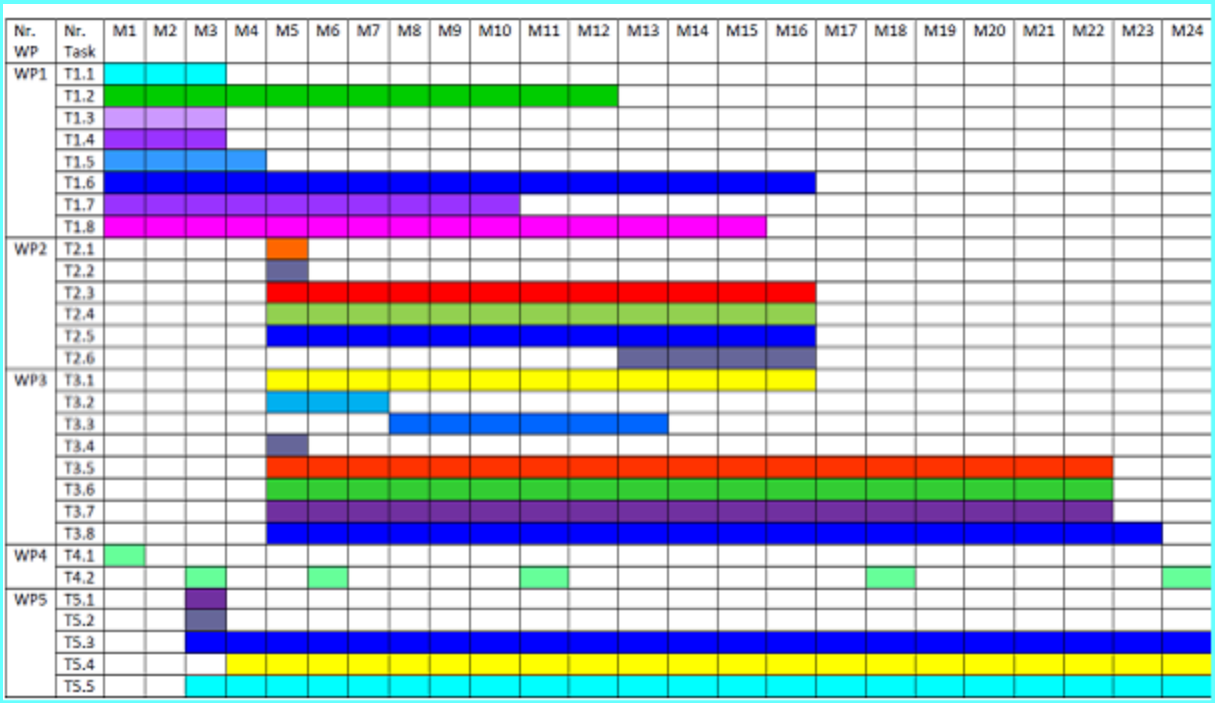
WP2 Screening method for early detection of colorectal cancer

WP3 Method for building cytostatograms for personalized treatment of colorectal cancer

WP4 Management

WP5 Dissemination

Gantt chart of WPs of the project



Dissemination

Papers:

1. **New Stochastic Microsensors Based on Oleamides**
   C. Cioates Negut, R.I. Stefan-van Staden, I. Moldoveanu, E.M. Ungureanu
   Electrochem.Comm., Accepted.

Papers submitted to ISI journals:

1. **Paper based disposable sensors for the assay of CEA**
   R.I. Stefan-van Staden, I. Moldoveanu, C.C. Surdu-Bob
   Submitted to ISI journal

RAPORTARE STIINTIFICA Decembrie 2014

RST - Raport stiintific si tehnic in extensor

Rezumatul etapei

In cadrul acestei etape s-au initiat procedurile pentru obtinerea aprobarii comitetului de etica al UMF "Carol Davila". S-au facut studii preliminare si s-au selectat noi material pentru designul senzorilor multimode. Pentru CEA s-au facut primele determinari in moodul stochastic pentru opt senzori. Sase senzori bazati pe pasta de grafit modificata cu oleamide si doi senzori de unica folosinta construiti pe suport de hartie. Doua lucrari au fost trimise spre publicare la reviste ISI.

Protocolul stabilit de partenerii din UMF "Carol Davila" si IXIA

Acest protocol impreuna cu formularul de informare va fi utilizat pentru prelevarea de probe biologice.

PROTOCOL CLINIC

In cadrul proiectului PN-II-PT-PCCA-2013-4 „Microsenzori de tip multimode bazati pe materiale micro si nanostructurate, cu aplicatii in analiza biomedicala".

Probele biologice (tesuturi si produse biologice) prelevate de la dumneavoastra vor fi folosite in studii de cercetare in cadrul proiectului: PN-II-PT-PCCA-2013-4 „*Microsenzori de tip multimode bazati pe materiale micro si nanostructurate, cu aplicatii in analiza biomedicala*", pentru validarea unor metode noi, rapide, fiabile si mai ieftine de screening care pot ajuta la detectarea precoce, in timp scurt a unor biomarkeri specifici cancerului colorectal. Reusita studiilor va duce la omologarea acestor metode in vederea detectarii precoce a acestui tip de cancer.

Se folosesc produse biologice si tesut tumoral de la pacientii diagnosticati cu tumori colorectale, in vederea diagnosticului prin determinarea de biomarkeri tumorali, printr-o metoda rapida si inceperea tratamentului de specialitate in timp util.

Tesutul tumoral se va preleva prin urmatoarele metode:

- LAPARATOMIE

- LAPAROSCOPIE

- COLONOSCOPIE

Produsele biologice (sange, saliva) se vor preleva prin urmatoarele metode:

- PUNCTIE ARTERIALA

- PUNCTIE VENOASA

- TAMPONAMENT STERIL

Pentru realizarea studiului, este necesar cca 1 cm³ de tesut biologic normal sau tumoral.

Laparatomia este realizata prin interventiile chirurgicale clasice, in vederea extirparii tumorale si/sau a biopsiei. Prelevarea de tesut tumoral se realizeaza cu ajutorul penselor clasice de biopsie si/sau excizie tumorala.

Laparoscopia se realizeaza prin crearea unei pneumoperitoneu, cu un gaz inert, care creaza camera de lucru si dupa plasarea trocarelor pentru camera video si pentru instrumentar, in vederea prelevarii de biopsie si/sau a exciziei tumorale, cu ajutorul unui instrumentar special.

Endoscopia se realizeaza cu ajutorul endoscopului si a instrumentarului specializat, in vederea prelevarii de biopsii de la nivelul tubului digestiv inferior.

Transportul recipientelor cu produsele biologice si a recipientelor cu tesuturi tumorale catre PATLAB, se va face in recipiente speciale, de catre personalul autorizat.

Pentru realizarea studiului, este necear cca 1ml de produs biologic, care se recolteaza in eprubeta speciala de hemoleucograma.

Produsele biologice (sange, saliva), se realizeaza prin urmatoarele metode:

Recoltarea sangelui se face prin punctie arteriala si venoasa, centrala si periferica.

Recoltarea salivei se realizeaza cu ajutorul unui tampon steril.

Transportul recipientelor cu produsele biologice si a recipientelor cu tesuturi tumorale catre PATLAB, se va face in cutii speciale, de catre personalul autorizat.

Dupa finalizarea studiului, produsele biologice si tesuturile patologice vor fi distruse conform protocoalelor internationale.

ACORDUL PACIENTULUI IN VEDEREA FOLOSIRII DE TESUTURI SI PRODUSE BIOLOGICE (SANGE, SALIVA)

Subsemnatul(a)_____, domiciliat in jud._____, Localitatea_____, str _____, nr__, ap__, posesor al actului de identitate_____, seria_____, nr_____, eliberat la

data de_____, de catre_____,avand CNP _____, declar ca sunt/ nu sunt de acord ca probele biologice prelevate de la dumneavoastra vor fi folosite in studiul de cercetare in cadrul PN-II-PT-PCCA-2013-4 „*Microsenzori de tip multimode bazati pe materiale micro si nanostructurate, cu aplicatii in analiza biomedicala*”, pentru validarea unor metode noi, rapide, fiabile si mai ieftine de screening care pot ajuta la detectarea precoce, in timp scurt a unor biomarkeri specifici cancerului colorectal. Reusita studiilor va duce la omologarea acestor metode in vederea detectarii precoce a unor cancere, cu urmatoarele:

1.Distrugerea tesuturilor si a probelor biologice care raman dupa utilizarea lor in scop diagnostic (la 12 luni de la definitivarea procedurilor de diagnostic);

DA_____, NU_____, si in acest caz ma oblig sa distrug tesuturile ramase prin incinerare la crematoriul uman, pentru a nu aduce prejudicii sanatatii publice; in plus, ma oblig sa aduc o adeverineta scrisa de la crematoriul uman in acest sens.

2.Folosirea unor fragmente tisulare, a produselor biologice care imi sunt recoltate, in studii medicale .DA_____, NU_____.

3. Folosirea in scop stiintific/ didactic al imaginilor fotografice a tesuturilor si a produselor biologice recoltate si examinate, cu conditia pastrarii secretului identitatii mele.

DA_____, NU_____,

DATA,

CONSIMTAMANT IN VEDEREA TRATAMENTULUI

Subsemnatul,_____, domiciliat in_____,

Legitimat cu B.I. seria_____, nr._____,

In calitate de pacient internat in sectia/catedra CHIRURGIE ____, a Spitalului Universitar de Urgenta Bucuresti, consimt sa urmez OPERATIA/TRATAMENTUL urmator: _____.

Natura si scopul, beneficiile si riscurile neefectuarii acestei operatii/tratament si a celorlalte optiuni terapeutice mi-au fost explicate pe intelesul meu de DR._____, pe care il desemnez pentru a efectua operatia/tratamentul specificat mai sus.

Probele biologice prelevate de la dumneavoastra vor fi folosite in studii de cercetare in cadrul proiectului PN-II-PT-PCCA-2013-4 „*Microsenzori de tip multimode bazati pe materiale micro si nanostructurate, cu aplicatii in analiza biomedicala*”, pentru validarea unor metode noi, rapide, fiabile si mai ieftine de screening care pot ajuta la detectarea precoce, in timp scurt a unor biomarkeri specifici cancerului colorectal. Reusita studiilor va duce la omologarea acestor metode in vederea detectarii precoce a acestui tip de cancer.

Mi-au fost prezentate riscurile asociate, precum si riscurile imprevizibile (inclusiv riscul oricat de mic de deces), consecintele pe care le presupune interventia/tratamentul, cat si riscurile pe care le impun interventiile speciale ce fac parte din operatia/tratamentul pe care urmeaza sa-l efectuez.

Declar ca sunt constient de aceste riscuri si le accept, intrucat scopul interventiei/tratamentului este inspre binele meu.

Ca urmare, inteleg necesitatea acestei operatii/tratament pe care doresc sa o efectuez si declar ca nu am primit nici o garantie sau asigurare in ceea ce priveste rezultatul final.

In cazul in care, in timpul interventiei terapeutice apar situatii si conditii neprevazute, care impun proceduri suplimentare fata de cele descrise mai sus, ca fiind acceptate de catre mine (inclusiv transfuzia), accept ca medicul desemnat sa actioneze in baza pregatirii sale profesionale, in consecinta, doar daca aceste proceduri sunt absolut justificate din motive medicale si numai in in interesul meu personal si inspre binele meu; de la acest accept face exceptie _____.

In scopul realizarii operatiei, consimt de asemenea la administrarea anesteziei care mi-a fost indicata (generala/alt tip de anestezie) _____.

Riscul actului anestezic mi-au fost explicate cu ocazia consultarii mele de catre Dr._____, medicul care va proceda la efectuare anesteziei in operatia la care voi fi supus.

In consecinta, in conditiile precizate, dau liber la consimtamant, in cunostinta de cauza, pentru operatia/tratamentul prezentat.

In cazul in care medicii desemnati de catre mine, din motive de forta majora, nu au putut efectua operatia/tratamentul pentru care le-am acordat consimtamantul meu, declar nula prezenta, si inteleg, si accept sa semnez un alt consimtamant cu un alt medic.

Certific ca am citit, am inteles si accept pe deplin cele de mai sus, si ca urmare, le semnez.

_____ ____/_____/_____

Semnatura pacient zi luna an

Noi microsenzori stocastici bazați pe oleamide pentru determinarea CEA

Introducere

Antigenul carcinoembrionar (CEA) este un marker tumoral utilizat în diagnostice clinice și evaluarea tratamentului pentru diferite tipuri de cancer [1]; a fost selectat ca model analitic pentru noi microsenzori stocastici proiectați. CEA este o glicoproteină celulară de suprafațp înalt glicozilată (180-200 kDa), care aparține unui grup de substanțe cunoscute sub numele de antigene asociate tumorii (TAA) [2,3]. Concentrația acestui antigen este la nivel de 4.6 ng mL^{-1} la persoanele sănătoase, în timp ce la pacienții care sufera de unele forme de cancer, cum ar fi cancer colorectal, cancer de ficat și cancer de pancreas, concentrația medie de CEA este în mod evident mai mare decât pentru persoanele sănătoase. O detecție sensibilă a markerilor tumorali este semnificativă în diagnosticele clinice incipiente și evaluarea pacienților pentru recuperare [4-7]. Măsurătorile din laborator a markerilor tumorali, cum ar fi CEA [8-11], markerul citokeratina fragment 19 (CYFRA 21-1) [12,13], α-fetoproteina (AFP) [13] și antigenul 125 (CA125) [14,15] au fost folosite pentru diagnostice, evaluarea și monitorizarea tratamentului pacientilor cu cancer [16-19].

Sase noi microsenzori bazați pe pasta de grafit modificată fizic cu oleoiletanolamide (1), (Z)-N-[(1S)-2-hidroxi-1-(fenilmetil)etil]-9octadecenamide (2), N-fenetiloleamide (3), N-[2-(4-metoxifenil)etil]oleamide (4), N-[1] naftiloleamide (5), N-ciclohexiloleamide (6), (Figura 1) s-au utilizat pentru analiza antigenului carcinoembrionic, direct din probele de sânge, utilizand .

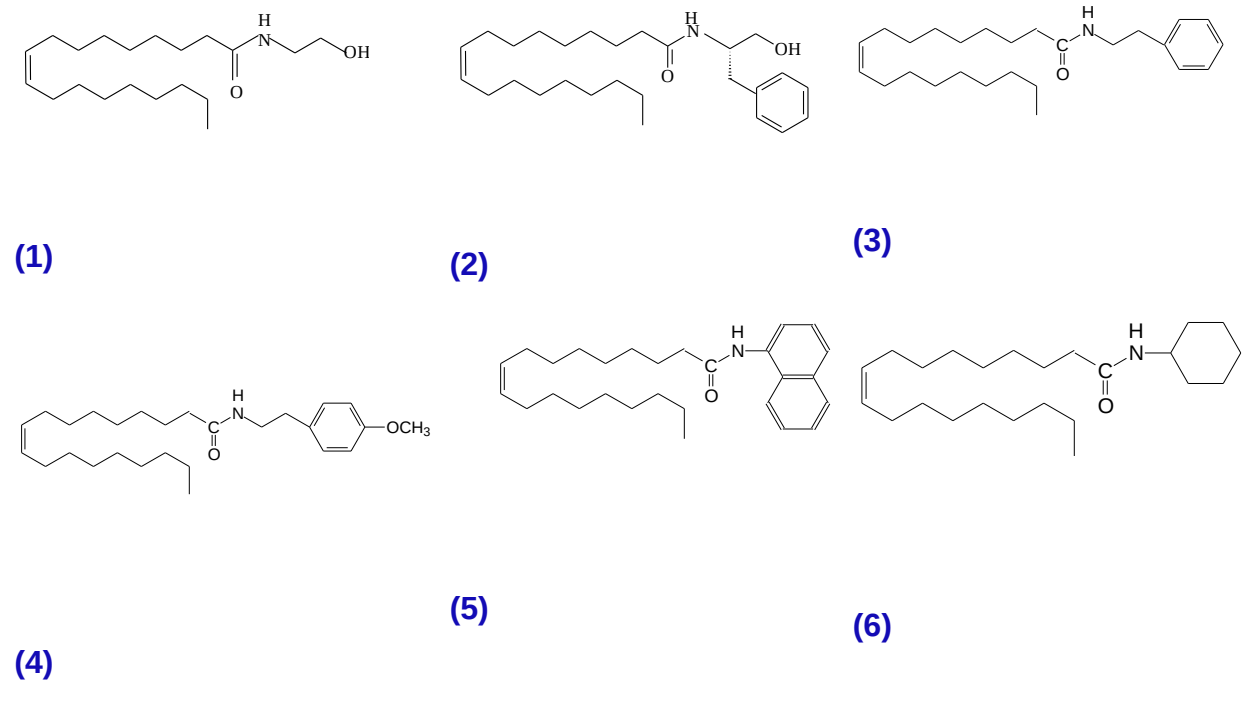


Fig. 1. Structurile oleamidelor 1-6, utilizate la construcția microsenzorilor stocastici.

Preparare probe

Probele de sânge au fost furnizate de Universitatea de Medicina și Farmacie "Carol Davila" (UMF). Probele de sânge au fost obținute de la UMF cu consimțământul pacienților, aceștia fiind informați în conformitate cu normele Comitetului de etică nr. 11/2013. Probele au fost măsurate în condițiile prevăzute de spital.

Aparatură

Toate măsurătorile au fost înregistrate utilizând un potențiostat/galvanostat PGSTAT 302 (de la Methrom) legat la un calculator prin intermediul unui Software versiune 4.9, Chemie Eco (Utretch, Olanda). Celula electrochimică este formata din trei electrozi, Ag/AgCl ca electrod de referință, electrod de platină sevind ca electrod auxiliar și electrodul de lucru (microsenzorii propuși).

Construcția microsenzorilor

Soluție de oleamide (10^{-3} mol/L în etanol absolut), a fost utilizată ca modificator în designul microsenzorilor stocastici. Pasta modificată a fost obținută prin adaugarea a 100 µL soluție oleamide peste pasta de grafit (100 mg pudră de grafit cu 30 µL ulei de parafină). Pasta modificată a fost presată într-un tub de plastic, diametrul suprafeței active a microsenzorilor a fost de 300 µm. Contactul electric a fost obținut introducând în pasta modificată un fir de Ag. Suprafața electrodului poate fi reînnoită prin șlefuire cu hârtie de aluminiu. Microsenzorii au fost depozitați într-o stare uscată, departe de lumina zilei și la temperatura camerei.

Modul stocastic

Pentru recunoașterea la nivel molecular a analit model – CEA și pentru a determina caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor propuși, soluții standard de CEA au fost proaspat preparate în intervalul de concentrații 10^{-11} - 10^{-2} mg/mL. Toate măsuratorile stocastice au fost efectuate la un potențial constant de 125 mV. t_{off} și t_{on} au fost măsurate pentru diagramele obținute. Analiza calitativă a CEA s-a bazat pe semnătura acestui analit pentru fiecare senzor, (valoarea t_{off} fiind identificată în diagramele obținute ale probelor de sânge analizate). $1/t_{on}$ a fost reprezentat grafic în funcție de concentrația analitului CEA ($1/t_{on}$ = A +BxConc.$_{CEA}$) pentru fiecare microsenzor propus, utilizând măsurătorile obținute pentru soluția standard din domeniul liniar de concentrație. Concentrațiile necunoscute de CEA au fost determinate prin introducerea în ecuație de calibrare a fiecarui microsenzor a valorii măsurate t_{on} din diagramele obținute pentru fiecare proba de sânge, respectiv microsenzor. Toate măsuratorile au fost efectuate la 25^0C.

Rezultate și discuții

Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor propuși

Analiza stocastică se bazează pe conductivitate canalul [1]: în prima etapă analitul trece prin canal blocându-l (timpul în care canalul este blocat se numește t_{off} și valoarea sa reprezintă semnătura analitului); în a doua etapă analitul este legat de peretele canalului favorizând procese electrochimice - timpul de echilibrare - t_{on} este măsurat și utilizat pentru analiza cantitativă a concentrației de analit (CEA). Ecuația utilizată pentru calculul concentrației este:

$$1/t_{on} = a + b \times Conc_{CEA}.$$

Procesul care are loc în canal este:

$$Ch_{(i)} + CEA_{(i)} \Leftrightarrow Ch\ CEA_{(i)}$$

unde Ch este canalul, și i reprezintă interfața.

Tabel 1. Caracteristicile de răspuns ale microsenzorilor stocastici bazați pe oleamide.

Microsenzori stocastici bazați pe pastă de grafit & oleamide	Semnătura analitului t_{off} (s)	Ecuația de calibrare și coeficientul de corelație*	Domeniul liniar de concentrație (mg mL^{-1})	Sensibilitate (s^{-1}/mg mL^{-1})	Limita de determinare (mg mL^{-1})
1	1.8	$1/t_{on} = 1.29 \times 10^6 \times C + 0.0321$; r = 0.9998	1.6×10^{-10} - 1.6×10^{-7}	1.29×10^6	1.6×10^{-10}
2	1.5	$1/t_{on} = 1.06 \times 10^4 \times C + 0.0480$; r = 0.9982	1.6×10^{-8} - 1.6×10^{-6}	1.06×10^4	1.6×10^{-8}
3	3	$1/t_{on} = 6.99 \times 10^5 \times C + 0.0311$; r = 1.0000	1.6×10^{-9} - 1.6×10^{-7}	6.99×10^5	1.6×10^{-9}
4	2	$1/t_{on} = 8.97 \times 10^6 \times C + 0.1793$; r = 0.9996	1.6×10^{-10} - 1.6×10^{-8}	8.97×10^6	1.6×10^{-10}
5	2.4	$1/t_{on} = 2.65 \times 10^5 \times C + 0.0460$; r = 1.0000	1.6×10^{-9} - 1.6×10^{-7}	2.65×10^5	1.6×10^{-9}
6	2	$1/t_{on} = 1.66 \times 10^5 \times C + 0.0555$; r = 0.9970	1.6×10^{-9} - 1.6×10^{-6}	1.66×10^5	1.6×10^{-9}

*$1/t_{on}$ (s^{-1}), C (mg mL^{-1})

Semnăturile determinate (valorile t_{off}) pentru CEA, utilizând diferiți microsenzori stocastici sunt prezentate în Tabelul 1; aceste valori au fost utilizate pentru identificarea analitului în probele de sânge. Valorile t_{on} au fost utilizate pentru determinarea domeniului liniar de concentrație pentru fiecare microsenzor din cei șase contruiți, precum și sensibilitate și limitele de determinare. Cea mai mare sensibilitate s-a înregistrat la utilizarea microsenzorului bazat pe pasta de grafit modificată cu oleamida 4. O sensibilitate bună s-a înregistrat deasemenea și pentru microsenzorul bazat pe pastă de grafit modificată cu oleamida 1. Microsenzorii bazați pe oleamida 1 și 4 au prezentat cele mai mici limite de determinare (0.1pg/mL).

Aplicații analitice

Analiza CEA a fost făcută din proba de sânge integral cu ajutorul microsenzorilor stocastici. Măsurătorile în modul stocastic (fig. 2), a contribuit la analiza calitativă

a CEA în probe de sânge (prin identificarea pe diagrama obținută a semnăturii sale specifice), precum și la analiza cantitativă (utilizând valoarea t_{on} citită din diagramă) (Tabelele 2 și 3).

Tabel 2. Test de regasire pentru CEA din probe de sânge utilizând senzori stocastici bazați pe pastă de grafit & diferite oleamide (1 - 6).

Microsenzor bazat pe pastă de grafit si oleamida	CEA, Regasit (%)
1	99.98 ± 0.12
2	94.28 ± 0.12
3	98.00 ± 0.10
4	95.95 ± 0.17
5	99.95 ± 0.13
6	97.50 ± 0.12

Tabel 3. Determinarea antigenului CEA din probe de sânge utilizând senzori stocastici bazați pe pastă de grafit & diferite oleamide (1 - 6) și ELISA.

Microsenzor bazat pe pasta de grafit & oleamida	CEA, pg/mL			
	Proba 1	Proba 2	Proba 3	Proba 4
1	221 ± 2	186 ± 1	233 ± 2	136 ± 2
2	200 ± 3	144 ± 1	268 ± 2	150 ± 2
3	229 ± 1	216 ± 2	216 ± 1	144 ± 1
4	213 ± 2	159 ± 3	213 ± 3	130 ± 3
5	200 ± 3	169 ± 2	270 ± 4	140 ± 4
6	213 ± 2	167 ± 2	213 ± 3	140 ± 2
ELISA	197 ± 12	132 ± 10	200 ± 9	129 ± 10

Testul de regasire a CEA in probele de sange a fost efectuat în probele de sânge integral. Concentrația de CEA a fost măsurată inița în proba de sânge integral, după care o anumită cantitate din soluția standard de CEA (concentrația soluției standard de CEA se încadrează în domeniul liniar al fiecărui microsenzor) a fost adăugată în proba de sânge. Procentul de CEA regasit (%) a fost calculat comparând valoarea concentrației de CEA adăugată (valoare teoretică), cu valoarea CEA descoperită în proba de sânge analizată. Pentru toți microsenzorii stocastici propuși s-au înregistrat valori de recuperare (%) mai mari de 94,00% cu RSD mai mic de 0,20 (Tabel 2).

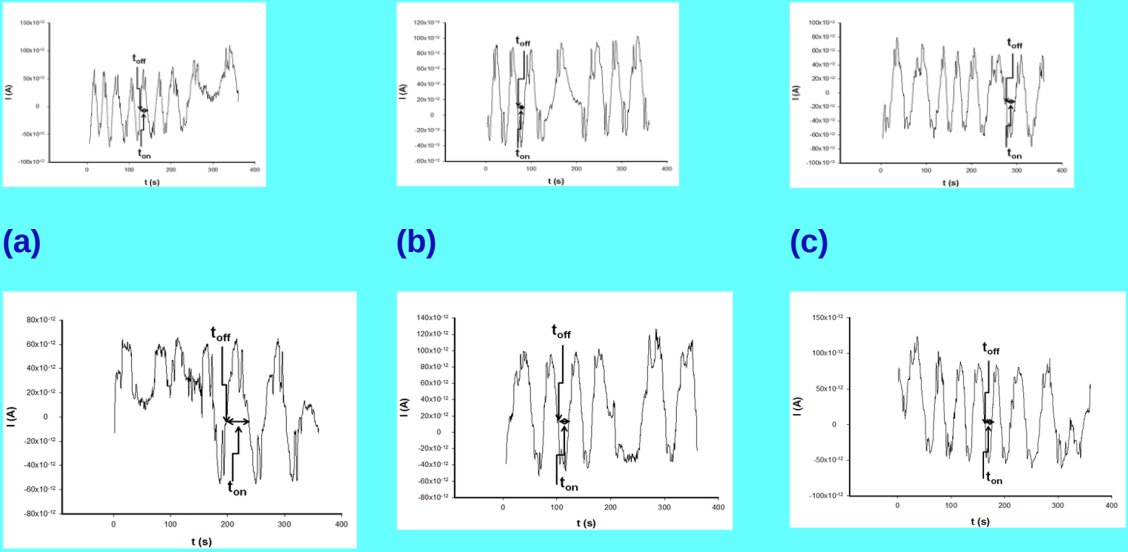


Figura 2. Diagrame înregistrate pentru detecția CEA în probe de sânge utilizând microsenzorii bazați pe pasta de grafit & diferite oleamide: 1 (a); 2 (b); 3 (c); 4 (d); 5 (e); 6 (f), în modul stocastic.

S-au efectuat teste de screening pentru patru probe de sânge integral. În diagramele obținute (exemple sunt prezentate în figura 2), a fost identificat analitul model CEA pe baza semnăturii acestuia, și cuantificat utilizând valorile t_{on}. Rezultatele obținute cu ajutorul metodei propuse sunt într-o bună concordanță cu cele obținute în spital folosind metoda de analiza standard (ELISA) (Tabelul 3).

Microsenzori de unica folosinta pentru determinarea CEA

Materiale noi, filme subțiri de carbon adsorbant și carbon lucios depuse pe hârtie, modificate cu 5,10,15,20-tetrafenil-21H, 23H-porfirină (P) au fost folosite la designul senzorilor de unica folosinta pentru antigenului carcinoembrionar din fluide biologice.

Designul microsenzorilor stocastici

Filmele subțiri de carbon adsorbant, respectiv carbon lucios depuse pe hârtie, obținute de la INFLPR, au fost imersate timp de 6 ore în soluție de 5,10,15,20-tetrafenil-21H, 23H-porfirină (P) de concentrație 10^{-3} mol/L. După imersare au fost lăsate la uscat timp de 24 ore, după care folosite la analiză ca senzori de lucru.

Modul stocastic

Pentru detectarea stocastică a fost utilizată o tehnică cronoamperometrică pentru măsurătorile de t_{on} și t_{off} la un potențial de 125mV. Electrozii au fost scufundați într-o celulă cu soluții care au conținut antigen în concentrații diferite cunoscute. t_{off} și t_{on} au fost măsurate pentru diagramele obținute. Ecuația de calibrare 1/ton = f (concentrație) pentru CEA a fost determinată cu ajutorul calculelor statistice. Concentrațiile necunoscute de CEA în probele de sânge au fost determinate din ecuațiile de calibrare.

Rezultate și discuții

Caracteristicile de răspuns ale senzorilor utilizați pentru screeningul antigenului CEA.

Principalul avantaj al senzorilor stocastici este acela că acești senzori pot fi folosiți atât pentru analiza calitativă a analitului (bazându-se pe valoarea t_{off} a analitului) cât și pentru analiza cantitativă a CEA ($1/t_{on}$ se utilizează în ecuația curbei de calibrare a fiecărui senzor propus) (Tabelul 4). Valorile t_{on} obținute din diagrame au fost utilizate pentru evaluarea caracteristicilor de răspuns ale senzorilor stocastici, precum și pentru evaluarea cantitativă a CEA în fluidele biologice (probe de sânge). Cea mai bună sensibilitate (5.34×10^{5} s mg/mL) și cea mai joasă limită de determinare (1.6×10^{-9} mg/ml) au fost obținute utilizând senzorul bazat pe C ads/P.

Tabel 4. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici, C ads/P și C lucios/P.

Senzori stocastici bazați pe	Semnătura analitului, t_{off} (s)	Domeniul liniar de concentrație (mg/mL)	Sensibilitate (s mg/mL)	Limita de determinare (mg/mL)
C ads/P	3.4	$1.6x10^{-9}$-$1.6x10^{-7}$	$5.34x10^{5}$	$1.6x10^{-9}$
C lucios/P	3	$1.6x10^{-7}$-$1.6x10^{-4}$	$7.99x10^{1}$	$1.6x10^{-7}$

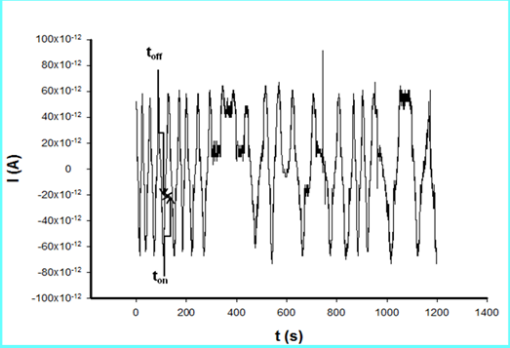
Aplicații analitice

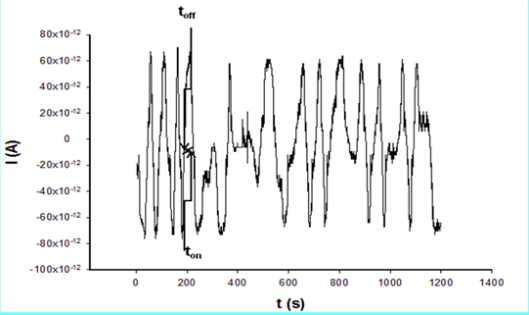
Analiza calitativă și cantitativă a CEA din probe de sânge.

Probele de sânge au fost obținute de la cinci pacienţi cu diagnostic confirmat de la Spitalul Universitar din București (aprobarea comitetului de etică nr. 11/2013). Aceste probe au fost utilizate pentru testele de screening folosind senzorii stocastici propuși, fără nicio preparare a probelor, utilizând analiza stocastică. Recunoașterea moleculară a antigenului CEA bazată pe semnătura sa, a fost realizată utilizând diagramele înregistrate (Figura 3).

Tabel 5. Analiza cantitativă a CEA din probe de sânge utilizând senzorii stocastici C ads/P și C lucios/P

Proba nr.	CEA, ng/mL	
	Microsenzor bazat pe	
	Cads/P	C lucios/P
1	1.50	2.15
2	2.30	2.20
3	1.65	1.25
4	1.70	1.57
5	1.20	1.70





(a) **(b)**

Figura 3 Diagrame inregistrate pentru detecția CEA în probe de sânge utilizand senzorii bazați pe (a) C ads/P; (b) C lucios/P în modul stocastic.

Semnătura antigenului (valoarea t_{off}) a fost identificată în diagramele înregistrate (Figura 3) pentru probele de sânge - aceste rezultate fiind în corelație cu rezultatele obținute cu metoda standard (ELISA), efectuate în laboratoarele clinice ale spitalului. În Tabelul 5 sunt prezentate cantitățile de CEA găsite în cele cinci probe de sânge utilizând atât detectarea stocastică, precum și testul ELISA (metoda standard).

Noi materiale pentru senzorii multimode

Alte materiale cum ar fi matricile de aur si materialele textile au fost sintetizate si examinate prin SEM si AFM pentru a determina marimea si forma porilor/canalelor pentru masuratori.

Au – microsphere:

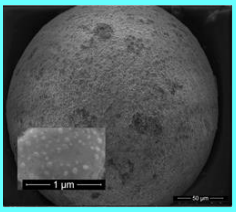


Figura 4 Imagine SEM a unei microsphere de Au.

Material textil – acoperit cu diamant:

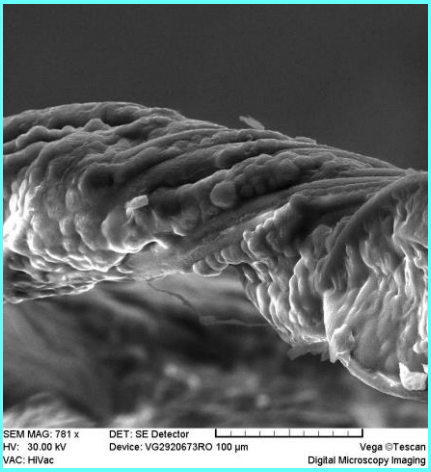


Figura 5 Imagine SEM a materialului textile acoperit cu diamant.

Concluzii

Microsenzorii stocastici bazați pe pastă de grafit modificată cu oleoiletanolamide (1), (Z)-N-[(1S)-2-hidroxi-1-(fenilmetil)etil]-9octadecenamide (2), N-fenetiloleamide (3), N-[2-(4-metoxifenil)etil]oleamide (4), N-[1] naftiloleamide (5), N-ciclohexiloleamide (6), s-au dovedit a fi instrumente de screening sigure pentru recunoașterea la nivel molecular a antigenul carcinoembrionar (CEA) în probe de sânge. Cei mai sensitivi microsenzori sunt cei bazați pe oleamida 4 și oleamida 1 imobilizate în pasta de grafit. Deasemenea, aceeași microsenzori prezintă cele mai mici limite de determinare (0.1pg/mL). Testele de recuperare, precum și testele de screening efectuate pentru recunoașterea moleculară a analitului model CEA, dovedesc că noii senzori stocastici pot fi utilizați cu încredere pentru analiza acestui analit din probe de sânge total.

Noi senzori stocastici bazați pe materiale noi, filme subțiri de carbon adsorbant și carbon lucios depuse pe hârtie, modificate cu material nanostructurat, 5,10,15,20-tetrafenil-21H, 23H-porfirină (P), au fost folosiți pentru bioanaliza stocastică a antigenului carcinoembrionar din fluide biologice. Antigenul carcinoembrionar (CEA) a fost utilizat ca analit model pentru a dovedi comportamentul stocastic al noilor senzori propuși. Stabilitatea și sensibilitatea senzorilor au fost măsurare timp de 1 lună. Intervalul liniar de concentrație pentru senzorul stocastic C ads/P este cuprins între $1.6x10^{-9}$-$1.6x10^{-7}$ mg/mL, iar pentru senzorul stocastic C lucios/P între $1.6x10^{-7}$-$1.6x10^{-4}$ mg/mL. Cele mai bune caracteristici de răspuns, precum și cea mai joasă limită de determinare s-au obținut utilizând ca electrod de lucru în sistem senzorul C ads/P. Rezultatele obținute în laboratorul nostru, utilizând acești senzori propuși au fost comparate cu rezultatele obținute pe aceleași probe, în

spital, utilizând ca tehnică de analiză ELISA; există o bună corelație între aceste rezultate obținute prin metode diferite, în laboratoare diferite.

Bibliografie

1. **Z. Chen, Y. Lei, Z. Liang, F. Li, L. Liu, C. Li, F. Chen, A highly sensitive label-free resonance light scattering assay of carcinoembryonic antigen based on immune complexes, Anal. Chim. Acta 747 (2012) 99 – 105.**
2. **E.W. Martin, Jr, J.P. Minton, L.C. Carey, CEA-directed second-look surgery in the asymptomatic patient after primary resection of colorectal carcinoma, Ann. Surg. 202 (1985) 310–317.**
3. **M. Grunnet, J.B. Sorensen, Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer, Lung Cancer, 76 (2012) 138-143.**
4. **M.J. Duffy, Clinical uses of tumor markers: a critical review, Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 38 (2001) 225–262.**
5. **B. Zhang, X. Zhang, H.H. Yan, S.J. Xu, D.H. Tang, W.L. Fu, A novel multi-array immunoassay device for tumor markers based on insert-plugmodel of piezoelectric immunosensor, Biosens. Bioelectron. 23 (2007) 19–25.**
6. **R. Liu, X. Liu, Y.R. Tang, L. Wu, X.D. Hou, Y. Lv, Highly sensitive immunoassay based on immunogold-silver amplification and inductively coupled plasma mass spectrometric detection, Anal Chem 83 (2011) 2330–2336.**
7. **Y.J. Zhao, X.W. Zhao, X.P. Pei, J. Hu, W.J. Zhao, B.A. Chen, Z.Z. Gu, Multiplex detection of tumor markers with photonic suspension array, Anal.Chim.Acta 633 (2009) 103–108.**
8. **M.J. Goldstein, E.P. Mitchell, Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer, Cancer Invest. 23 (2005) 338–351.**
9. **W.H. Allum, H.J. Stokes, F. Macdonald, J.W. Fielding, Demonstration of carcinoembryonic antigen (CEA) expression in normal, chronically inflamed, and malignant pancreatic tissue by immunohistochemistry, J. Clin. Pathol. 39 (1986) 610 – 614.**
10. **J. Lundin, P.J. Roberts, P. Kuusela, C. Haglund, The prognostic value of preoperative serum levels of CA 19-9 and CEA in patients with pancreatic cancer, Br. J. Cancer 69 (1994) 515–519.**

11. M.D. Seemann, T. Beinert, H. Fürst, U. Fink, An evaluation of the tumour markers, carcinoembryonic antigen (CEA), cytokeratin marker (CYFRA 21-1) and neuron-specific enolase (NSE) in the differentiation of malignant from benign solitary pulmonary lesions, Lung Cancer 26 (1999) 149 – 155.

12. C. Andreadis, S. Touloupidis, G. Galaktidou, A.H. Kortsaris, A. Boutis, D. Mouratidou, Serum Cyfra 21-1 in patients with invasive bladder cancer and its relevance as a tumor marker during chemotherapy, J. Urol. 174 (2005) 1771–1776.

13. S.D. Beck, M.I. Patel, J. Sheinfeld, Tumor Marker Levels in Post-Chemotherapy Cystic Masses: Clinical Implications for Patients With Germ Cell Tumors, J. Urol. 171 (2004) 168–171.

14. A. Gadducci, S. Cosio, A. Carpi, A. Nicolini, A.R. Genazzani, Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer, Biomed. Pharmacother. 58 (2004) 24–38.

15. K. Mealy, J. Feely, I. Reid, J. McSweeney, T. Walsh, T.P. Hennessy, Tumour marker detection in oesophageal carcinoma, Eur. J. Surg.Oncol. 22 (1996) 505–507.

16. A. Gadducci, R. Tana, S. Cosio, A.R. Genazzani, The serum assay of tumour markers in the prognostic evaluation, treatment monitoring and follow-up of patients with cervical cancer: a review of the literature, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 66 (2008) 10–20.

17. K. Fizazi, F. Farhat, C. Theodore, O. Rixe, A. Le Cesne, E. Comoy, T. Le Chevalier, Ca125 and neuron-specific enolase (NSE) as tumour markers for intra-abdominal desmoplastic small round-cell tumours, Br. J. Cancer 75 (1997) 76–78.

18. Y. Suminami, S. Nagashima, N.L. Vujanovic, K. Hirabayashi, H. Kato, T.L. Whiteside, Inhibition of apoptosis in human tumour cells by the tumour-associated serpin, SCC antigen-1, Br. J. Cancer 82 (2000) 981–989.

19. Z.L. Bandi, I. Schoen, M. DeLara, Highly sensitive qualitative methods for serum choriogonadotropin (hCG): clinical specificity studies, Clin. Chem. 33 (1987) 677–681.

20. G. Banfi, A. Zerbi, S. Pastori, D. Parolini, V. Di Carlo, P. Bonini, Behavior of tumor markers CA19.9, CA195, CAM43, CA242, and TPS in the diagnosis and follow-up of pancreatic cancer, Clin. Chem. 39 (1993) 420–423.