



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00420

(22) Data de depozit: 13/06/2018

(41) Data publicării cererii:
30/12/2019 BOPI nr. 12/2019

(71) Solicitant:
• CENTRUL INTERNAȚIONAL
DE BIODINAMICĂ,
INTRAREA PORTOCALELOR, NR.1B,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• GHEORGHIU MIHAELA, BD. UNIRII
NR. 12, BL.7C, SC.A, AP.18, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• GHEORGHIU EUGEN, BD.UNIRII NR.12,
BL.7 C, SC.A, AP.18, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) METODĂ ȘI DISPOZITIV DE DETECȚIE A UNOR COMPUȘI
BIOACTIVI, DE EX. CITOTOXICI, UTILIZÂND SENZORI
CU CELULE STIMULATE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă și la un dispozitiv de detecție a unor compuși bioactivi, de exemplu citotoxici, dintr-o probă. Metoda, conform invenției, constă în aceea că se perturbă controlat cu un stimul ad hoc fizic, chimic sau biologic, starea uneia sau mai multor celule cu rol de senzor, după care se declanșează procese de revenire la valori fiziologice sau staționare, monitorizate prin analize cantitative electrice și/sau optice, procesele fiind influențate de tipul și prezența compușilor citotoxici din proba pusă în contact cu senzorul. Dispozitivul, conform invenției, este format dintr-un senzor (1) de tip celule cultivate pe suprafața unui traductor (2) aflat într-o incintă (3) de măsură, având integrat un sistem (4) de stimulare cu rol perturbator, o incintă (5) care asigură parametrii de mediu cu valori controlate, un sistem (6) de monitorizare/analiză, cuplat cu un sistem (7) de procesare și afișare a informației.

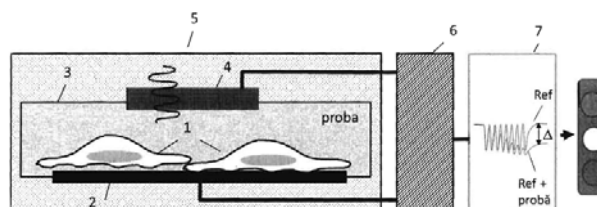


Fig. 1

Revendicări: 23

Figuri: 8



Metoda și dispozitiv de detecție a unor compuși bioactivi, de ex. citotoxici, utilizând senzori cu celule stimulate

Descriere

Invenția se referă la o metodă și dispozitiv de detecție a unor compuși bioactivi, de exemplu citotoxici, utilizând senzori cu celule stimulate, cu portabilitate ridicată, automatizabile, aplicabile în evaluarea potențialului citotoxic al unor substanțe chimice cu relevanță pentru analizele de mediu și chimico-farmaceutice.

Sunt cunoscute exemple de utilizare a celulelor ca bioreceptori (cardiomioците [1], limfocite [2], [3], epiteliale [4], fibroblaste [5]), exemple care evidențiază capacități în detecția de metale grele [1], bacterii patogene [2], [3], virusuri [4], [3], micotoxine [5], erbicide [4] cu limite de detecție într-un domeniu larg de concentrații, nM - mM, respectiv număr de unitati formatoare de colonii, în intervale de timp asociate ciclurilor celulare specifice (zile).

Sunt cunoscute platforme de analiză bazate pe senzori celulari și metode analitice optice (ex. Rezonanța Plasmonilor de Suprafață - SPR), termice (calorimetrie), pH sau electrice (bazate pe măsurători de impedanță sau electrofiziologice) de evaluare a răspunsului celular asociat detecției de compuși nocivi, prin evaluarea efectului compusului respectiv asupra adeziunii, semnalizării, a ratei de creștere sau/și a inducerii morții celulare.

Astfel, **EP2631652 A1** descrie compozițiile și metodele pentru folosirea biosenzorilor optici (bazați pe rezonanța ghidurilor de undă optice de ex. a plasmonilor de suprafață) fără agenți de contrast pentru analize celulare. Deși timpul de analiză este de câteva sute de minute (nu zile), același tip de efect este vizibil pentru o clasă mare de compuși, limitând specificitatea analizelor.

Creșterea performanțelor biosenzorilor celulari implică celule cu selectivitate și sensibilitate ridicată și totodată acces analitic la informația cu relevanță fiziologică, fără utilizarea compușilor de marcarea, portabilitatea ridicată și posibilitatea automatizării. Astfel, metodele electrice de măsură sunt preferate dat fiind caracterul lor neinvaziv, posibilitatea multiplexării și a analizelor dinamice. În **US6377057B1** este descrisă utilizarea densității spectrale a modificărilor induse asupra potențialului electric celular (în analize de electrofiziologie), ca semnătură pentru clasificarea agenților biologic activi. Având la bază înregistrări pe celule neuronale individuale metoda are dezavantajul variabilității celulare, a dificultăților de automatizare a operării, a necesității unor compuși de referință și a dependenței de compoziția matricii caracteristice a probei.

Monitorizarea celulelor aderente prin măsurători de impedanță s-a impus ca metodă utilă pentru analizele de mediu sau chimico-farmaceutice [6, 7]: există sisteme comerciale de electrozi așa cum au fost descrise în **US5187096A** pentru monitorizarea impedanței celula substrat în relație cu ECIS [8] care au fost folosite pentru diverse modele celulare. ECIS presupune creșterea celulelor pe substrate cu electrozi planari în vase de cultură până la acoperirea totală a electrozilor (confluență). Variația impedanței electrozilor este asociată modificărilor de formă sau de conectare a celulelor (între ele sau cu substratul) ca indicatori dinamici ai alterărilor celulare. **US 20160178628 A1** prezintă o metodă pentru detecția și monitorizarea atașării celulelor la un substrat ECIS pentru diagnosticul cancerului. Un dispozitiv de analiză care utilizează celule biologice sau alte substanțe chimice biologic active și detecția electrică la nivelul unor electrozi poroși pe care sunt aderate celule raportor, conform **US6280586B1** are dezavantajul că se bazează pe cinetica lentă de interacție și răspuns celular (zile) și utilizarea de celule specific modificate pentru un tip de analit țintă.

Fluctuațiile în impedanța măsurată cu rezoluții temporale mari (sub 1 s) la o singură frecvență pe durate lungi de timp corespund fluctuațiilor structurii 3 D a celulelor pe suprafața electrozilor (denumite micromișcare) se corelează cu activitatea metabolică a celulelor și cu viabilitatea lor [9]. În **US9612234B2** sunt prezentate căi de analiza a comportării electrice a cardiomiocitelor, în timp real (RTCA) în vederea evaluării efectului unor medicamente specifice sau substanțe chimice dedicate tratamentelor cu țintă cardiacă.

Dezavantajele principale ale metodelor și sistemelor descrise mai sus sunt: 1) timpii lungi de analiză, 2) limitele de detecție corespunzătoare unor concentrații relativ mari; 3) răspunsul nespecific; 4) necesitatea utilizării unor sisteme de referință; 5) utilizarea de celule specifice, particularizate tipului de analit.

Problemele tehnice pe care le rezolvă invenția care descrie o metodă și dispozitiv de detecție a unor compuși bioactivi de ex. citotoxici într-un fluid (ex. mediu lichid) utilizând senzori cu celule stimulate constau în: creșterea sensibilității și obținerea unei limite de detecție corespunzătoare unor concentrații mici ale analiților bioactivi de ex. cu potențial citotoxic, scăderea timpului de analiză la 60 ÷ 120 minute, eliminarea necesității utilizării unor sisteme de referință și a unor celule specifice unui analit țintă, prin stimularea (periodică) a unor celule model.

Invenția se referă la o **Metoda și dispozitiv de detecție a unor compuși bioactivi de ex. citotoxici utilizând senzori cu celule stimulate** cu portabilitate ridicată, automatizabile, aplicabile în evaluarea potențialului citotoxic al unor substanțe chimice, având la bază perturbarea controlată cu un stimul fizic, chimic sau biologic a stării uneia sau mai multor celule, cu rol de senzor, perturbare în urma căreia se declanșează procese de revenire la valori fiziologice, procese monitorizate prin analize cantitative electrice sau/și optice prin traductori în contact cu celulele și a căror evoluție este influențată de tipul, concentrația și potențialul citotoxic al compușilor din proba pusă în contact cu celulele de pe senzor.

Metoda face legătura dintre tipurile și concentrațiile de analiți/compuși din probă susceptibili să genereze un efect perturbator asupra celulelor și parametrii procesului celular de adaptare la stimul, modulat de acțiunea compușilor din probă precum: amplitudinea de variație, intervalul de timp până la atingerea unui nivel de staționaritate, relevat prin valoarea unui parametru caracteristic ex. electric (modul, partea imaginară sau o funcție de acești parametri ai impedanței la o anumită frecvență) și/sau a unui parametru optic (ex. unghiul pentru care apare minimul reflectivității, pentru analize SPR) la stimularea controlată a unei culturi de celule.

Prezența unui analit țintă cu efect perturbator ex. citotoxic, influențează amplitudinea și dinamica proceselor de revenire la valori fiziologice (proces care pot include, fără a fi limitativ, potențialul de membrană, semnalizarea celulară, citoscheletul de actină, morfologia și volumul celular, aderența la substrat) analiza parametrilor caracteristici permițând determinarea tipului, concentrației și potențialul citotoxic al analitului țintă.

Semnalele utile se obțin prin monitorizarea variațiilor proprietăților ex. electrice, sau/ și optice ale stratului de celule aferent unui stimul cunoscut, cauzate de expunerea celulelor, aderente la suprafața unui traductor, la un compus bioactiv de ex. citotoxic. Măsurătorile se fac prin intermediul unor traductori (ex. electrozi) care trebuie să fie compatibili cu metodele analitice rapide, fără utilizare de agenți de contrast.

În continuare prezentăm o variantă, nelimitativă, de aplicare a metodei:

În conformitate cu figura 1, una sau mai multe celule (care pot fi normale sau conținând modificări genetice) cu rol de senzor (1) sunt cultivate pe suprafața unui traductor (care poate fi electric, i.e. electrozi sau optic) (2) aflat într-o incintă de măsură (care poate fi de tip rezervor sau

prevăzută cu elemente pentru administrarea probei, ex. intrare/ieșire) (3) având integrat un sistem de stimulare (care poate fi luminos, electric, electrochimic, sau mecanic) cu rol perturbator (4) și poziționată într-o incintă (5) care asigură parametri de mediu cu valori controlate. Traductorul (2) și sistemul de stimulare (4) sunt conectați la un sistem de monitorizare/analiză (care poate fi analizor de impedanță, sistem SPR sau electro-plasmonic) (6) cuplat cu un sistem de procesare și afișare a informației relevante pentru utilizator (7).

Într-un exemplu de implementare, celulele cu rol de senzor (1) sunt supuse la intervale stabilite acțiunii stimulului perturbator (care poate fi reprezentat de un eveniment sau de o succesiune de evenimente de durate și intervale de aplicare diferite) și sunt puse în contact cu probe conținând compusul de detectat diluate într-un raport cunoscut cu mediu de cultură (în flux sau tip șarjă). Prezența unui analit cu efect perturbator ex. citotoxic influențează amplitudinea și dinamica proceselor de revenire la valori fiziologice (procese care pot include, fără a fi limitativ, potențialul de membrană, semnalizarea celulară, citoscheletul de actină, morfologia și volumul celular, aderența la substrat) reflectate în valori caracteristice ale parametrilor de măsură. Sistemul de monitorizare (6) achiziționează serii temporale de date caracteristice răspunsului celular și controlează sistemul de stimulare (4) transmițând către sistemul de procesare și afișare a informației relevante pentru utilizator (7) seria temporală a datelor măsurate pentru stabilirea tipului și anvergurii efectului celular și, corespunzător, a tipului și concentrației de compuși citotoxici. În această configurație, senzorul celular va genera date corespunzătoare răspunsului caracteristic la stimulul perturbator, cu rol de referință, și, același senzor, va genera date cu privire la efectul unui compus bioactiv prin compararea cu răspunsul referință a răspunsului caracteristic la stimul în prezența compusului.

Conceptul are avantajul că prin aplicarea stimulului perturbator se crește reactivitatea celulară, respectiv a sensibilității celulelor la variații ale condițiilor de cultivare (inclusiv la compoziția mediului) prin inducerea unei perturbări controlate a senzorului celular de la valorile fiziologice și, concomitent, declanșarea unor procese de revenire către acestea, care transformă măsurătorile uniparametrice clasice în seturi multidimensionale de informație. Amplitudinea de răspuns la stimul, semnul variației, dinamica de recuperare și valorile de prag la diverse momente de timp sunt comparate cu cele corespunzătoare expunerii senzorului celular la probe cu compuși bioactivi ex. cu potențial citotoxic pentru trasarea unor curbe de calibrare și de analiză a efectelor celulare generate de aceștia.

În continuare prezentăm mai multe variante, nelimitative, de realizare a metodei și dispozitivului conform invenției, în legătură cu figurile 2-8 care prezintă:

Figura 2: Schema bloc a dispozitivului care include control optogenetic (stimularea optica a unor senzori cu celulele modificate optogenetic) și măsurători electrice rapide

Figura 3: Detaliu schema bloc a dispozitivului care include control optogenetic și măsurători electrice rapide în flux

Figura 4: (A) Exemplu de model celular modificat optogenetic prin exprimarea canalului dependent de lumină și care permite influxul de ioni de sodiu (B) Exemplu de model celular modificat optogenetic și cu includerea unui canal de repolarizare membranară (prin ieșirea potasiului) după actuarea luminoasă.

Figura 5: (A) Exemplu de înregistrare pentru un puls de lumină; (B) Exemple de dinamică de referință a valorilor de impedanță pentru stimuli controlați pentru care variază durata pulsurilor și intervalul dintre ele.

Figura 6: Exemplu de modificarea a dinamicii de referință generată de prezența în probă a unui compus (ouabaina) care afectează specific capacitatea de homeostazie.

Figura 7: Exemple de dinamică dependentă de concentrația unui compus citotoxic, aplicat simultan cu stimulul luminos (A), aplicat în flux pe celule pre-stimulate (B).

Figura 8: (A) Exemplu de curbă de calibrare bazată pe variația nivelului de bază de după perturbare în două cazuri: aplicarea stimulării înainte, respectiv simultan cu aplicarea/expunerea senzorului celular la compusul bioactiv ex. citotoxic; (B) Exemplu de curbă de calibrare bazată pe momentul de timp la care se înregistrează variația nivelului de bază după aplicarea probei conținând compusul citotoxic în condițiile pre aplicării perturbării.

Modul de funcționare a dispozitivului conform invenției

În conformitate cu figura 2, celulele cu rol de senzor (1) sunt cultivate într-un mediu standard DMEM (în sine cunoscut) pe suprafața unui traductor electric – un set de electrozi planari (201) (în sine cunoscut) dispuși pe baza unei incinte de măsură (3) (în sine cunoscută) timp de 24 h, pentru atașare și acoperire electrozi. Sistemul de stimulare optică (401) se atașează incintei de măsură care se conectează prin elementele de conectare (pini auriti, în sine cunoscuți) de sistemul de monitorizare bazat pe determinări rapide de impedanță (601) la o singură frecvență (de exemplu 1 kHz) sau spectroscopie de impedanță într-un domeniu de frecvențe (de exemplu 100 Hz÷100 kHz) și este poziționată într-un incubator (501) (care asigură parametri de mediu e.g. temperatură, umiditate, presiune /concentrație de CO₂, O₂ la valori controlate). Se pornește monitorizarea cu setarea parametrilor de măsură (frecvența și/sau domeniul de frecvențe, amplitudinea semnalului, frecvența de achiziție, durata achiziției, durata stabilizării, durata, numărul și frecvența stimulului).

După o etapă de stabilizare, care poate fi de 5÷10 minute, celulele senzor sunt supuse la intervale prestabilite acțiunii pulsurilor luminoase (cel puțin unul) de la o sursă LED de 470 nm ca stimul perturbator (401-1) și sunt puse în contact cu probe diluate în mediul de cultură concomitent cu monitorizarea cantitativă a parametrilor caracteristici de răspuns ex. impedanța electrică (modulul și componenta reactivă a impedanței complexe), într-un domeniu de frecvențe (F1-Fn) sau la o frecvență F (701) și evaluarea cineticii parametrilor (702) corespunzători stimulului individual și recuperării (703) după aplicarea unui tren de pulsuri pentru măsurarea anvergurii efectului celular, a tipului și concentrației de compuși cu efect bioactiv ex. citotoxic (8). Conform figurii 3, contactul cu proba se poate realiza în flux, modulul 9 (care poate fi o pompă peristaltică) conectat la intrarea și ieșirea incintei de măsură (3) și putând fi comandat de modulul de monitorizare (6).

Conform figurii 4 celulele care echipează senzorul (1) sunt modificate optogenetic pentru exprimarea unei opsine (exemplu nelimitativ canalul de rodopsina (în sine cunoscut)) și (nu obligatoriu) proteine canal cu rol în menținerea homeostaziei celulare, exemplu nelimitativ canal de potasiu ROMK1.

În această configurație, potentialul de membrană al celulelor din senzorul celular este modificat specific sub acțiunea stimulului luminos conform figurii 5 (A), cu declanșarea proceselor de repolarizare către valori fiziologice, procese dependente de capacitatea de homeostazie a celulelor senzor, ai căror parametrii cinetici permit măsurarea răspunsului caracteristic atât la stimul, cu rol de referință, figura 5 (B), cât și la efectul unui compus bioactiv prin compararea cu răspunsul referință a răspunsului caracteristic la stimulul optic în prezența compusului.

Parametrii proceselor de repolarizare către valori fiziologice dar și semnul și magnitudinea răspunsului la pulsuri sunt dependente de capacitatea de homeostazie (ionică și energetică) a celulelor senzor așa cum este exemplificat în figura 6 unde se folosește ouabaina

(compus digitalic în sine cunoscut) care blochează pompa de sodiu potasiu (funcțională în toate celulele vii, în sine cunoscută) cu afectarea homeostaziei celulare.

Răspunsul caracteristic la stimul, cu rol de referință, permite cuantificarea efectului unui compus bioactiv prin compararea cu răspunsul referință a răspunsului caracteristic la stimul (optic) modulat de prezența compusului. Figurile 7 (A) și (B) evidențiază exemple de dinamică dependentă de concentrația unui compus citotoxic, aplicat simultan cu stimulul luminos (A) și respectiv aplicat în flux pe celule pre-stimulate (B). Variația nivelului de stabilizare după stimulare este funcție de concentrația compusului bioactiv, fără a limita generalitatea, ales a fi o sare a unui metal greu (CdCl_2 în sine cunoscut citotoxic) și atinge un maxim, util cuantificării concentrației maxime testate în 60 minute comparativ cu testele clasice de citotoxicitate de ordinul zilelor. Efectul perturbației controlate este și de sensibilizare a celulelor senzor făcându-le să răspundă semnificativ la domeniul de concentrații mic (ex. sub $25 \mu\text{M}$), conform Figurii 7 (B).

Seriile temporale ale datelor măsurate se analizează pentru stabilirea tipului și anvergurii efectului celular și corespunzător, a tipului și concentrației de compuși citotoksici. Figura 8 prezintă un exemplu de curbă de calibrare bazată pe variația nivelului de bază de după perturbare (A) și un exemplu de curbă de calibrare bazată pe momentul de timp la care se înregistrează variația nivelului de bază după aplicarea probei conținând compusul citotoxic în condițiile pre aplicării perturberii (B).

Bibliografie

1. Liu, Q., Cai, H., Xu, Y., Xiao, L., Yang, M. & Wang, P. (2007) Detection of heavy metal toxicity using cardiac cell-based biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*. **22**, 3224-3229.
2. Banerjee, P. & Bhunia, A. K. (2009) Mammalian cell-based biosensors for pathogens and toxins, *Trends in Biotechnology*. **27**, 179-188.
3. Rider, T. H., Petrovick, M. S., Nargi, F. E., Harper, J. D., Schwoebel, E. D., Mathews, R. H., Blanchard, D. J., Bortolin, L. T., Young, A. M., Chen, J. & Hollis, M. A. (2003) A B Cell-Based Sensor for Rapid Identification of Pathogens, *Science*. **301**, 213.
4. Kintzios, S., Pistola, E., Panagiotopoulos, P., Bomsel, M., Alexandropoulos, N., Bem, F., Ekonomou, G., Biselis, J. & Levin, R. (2001) Bioelectric recognition assay (BERA), *Biosensors and Bioelectronics*. **16**, 325-336.
5. Behm, C., Föllmann, W. & Degen, G. H. (2012) Cytotoxic Potency of Mycotoxins in Cultures of V79 Lung Fibroblast Cells, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. **75**, 1226-1231.
6. Ceriotti, L., Ponti, J., Colpo, P., Sabbioni, E. & Rossi, F. (2007) Assessment of cytotoxicity by impedance spectroscopy, *Biosensors & bioelectronics*. **22**, 3057-63.
7. Gheorghiu, M., David, S., Polonschii, C., Olaru, A., Gaspar, S., Bajenaru, O., Popescu, B. O. & Gheorghiu, E. (2014) Label free sensing platform for amyloid fibrils effect on living cells, *Biosensors & bioelectronics*. **52**, 89-97.
8. Giaever, I. & Keese, C. R. (1984) Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **81**, 3761-4.
9. Tarantola, M., Schneider, D., Sunnick, E., Adam, H., Pierrat, S., Rosman, C., Breus, V., Sonnichsen, C., Basche, T., Wegener, J. & Janshoff, A. (2009) Cytotoxicity of metal and semiconductor nanoparticles indicated by cellular micromotility, *ACS nano*. **3**, 213-22.

Patente

EP2631652 A1	US6377057B1	US5187096A
US 20160178628 A1	US6280586B1	US9612234B2

Metoda și dispozitiv de detecție a unor compuși bioactivi, de ex. citotoxici, utilizând senzori cu celule stimulate

Revendicări:

1. Metodă de detecție a unor compuși bioactivi de ex. citotoxici dintr-o probă utilizând senzori cu celule stimulate **caracterizată prin aceea că se perturbă controlat cu un stimul *ad hoc* fizic, chimic sau biologic (1) starea uneia sau mai multor celule, cu rol de senzor (2), în urma căreia se declanșează procese de revenire la valori fiziologice sau staționare (3), procese monitorizate prin analize cantitative electrice sau/și optice (4) și a căror evoluție este influențată de prezența și tipul compușilor bioactivi ex. citotoxici (5) din proba (6) pusă în contact cu senzorul.**
2. Metodă conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** evidențierea prezenței și determinarea cantitativă a concentrațiilor compușilor bioactivi ex. citotoxici se face utilizând parametri mășurați prin spectroscopie electrică de impedanță, specifici proceselor de revenire la valori fiziologice sau staționare, în prezența compușilor bioactivi, comparativ cu cei determinați în condițiile în care proba nu conține compuși bioactivi.
3. Metodă conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** celulele cu rol de senzor celular sunt celule, de ex. mamaliene, aderente care au fost modificate genetic pentru a exprima în membrană canale care se deschid la aplicarea unui stimul luminos.
4. Metodă conform revendicării 3 **caracterizată prin aceea că** celulele cu rol de senzor celular au fost modificate genetic pentru a exprima în membrană unul sau mai multe canale care permit refacerea potențialului de membrană la valori fiziologice și proteine raportor.
5. Metodă conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** perturbarea controlată se realizează anterior expunerii la probă.
6. Metodă conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** perturbarea controlată se realizează în același timp cu expunerea la probă.
7. Metodă conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** expunerea celulelor se realizează după trecerea probei printr-un sistem de separare specifică a compușilor din probă.
8. Metodă conform revendicării 2 **caracterizată prin aceea că** monitorizarea procesului de revenire la valori fiziologice sau staționare se face prin analize de impedanță electrică la o frecvență a câmpului electric alternativ.
9. Metodă conform revendicării 2 **caracterizată prin aceea că** se analizează evoluția modulului sau/și a fazei impedanței, sau a unui parametru corespunzător unei funcții cunoscute a componentelor impedanței la o frecvență a câmpului electric alternativ pentru identificarea tipului de compus bioactiv de ex. citotoxic și calcularea concentrației acestuia în probă.

10. Metodă conform revendicării 3 **caracterizată prin aceea că** asupra celulelor modificate optogenetic se aplică o serie de pulsuri de lumină cu parametrii (lungime de undă, fluentă, durată, interval între pulsuri) controlați pentru a crește sensibilitatea senzorului celular și care totodată să permită revenirea către valori fiziologice sau niveluri staționare în condițiile în care proba nu conține compuși bioactivi.
11. Metodă conform revendicării 5 **caracterizată prin aceea că** evidențierea și determinarea cantitativă a concentrațiilor compușilor bioactivi de ex. citotoxici se face prin curbe de calibrare ai parametrilor dinamici ai procesului de revenire către valori fiziologice sau niveluri staționare, de ex. amplitudini sau frecvențe caracteristice, măsurați prin analize electrice, de ex. impedanța electrică la o frecvență a câmpului electric alternativ, sau optice.
12. Metodă conform revendicării 5 **caracterizată prin aceea că** evidențierea și determinarea cantitativă a concentrațiilor compușilor bioactivi de ex. citotoxici se face prin curbe de calibrare, utilizând mărimea intervalelor de timp dintre momentul de injecție a probei, care se realizează la un interval fix ales de la finalizarea aplicării pulsurilor de lumină și momentele în care parametrul sau parametrii impedanței electrice la o frecvență a câmpului electric alternativ deviază de la nivelul fiziologic.
13. Metodă conform revendicării 9 **caracterizată prin aceea că** evidențierea și determinarea cantitativă a concentrațiilor compușilor bioactivi, de ex. citotoxici se face prin curbe de calibrare utilizând valorile parametrului sau ale parametrilor impedanței electrice la o frecvență a câmpului electric alternativ, corespunzătoare nivelelelor maxime sau nivelelor de la un moment fix, de referință de după injecția probei, care se realizează la un interval cu durată fixă de la finalizarea aplicării pulsurilor de lumină.
14. Dispozitiv de detecție a unor compuși bioactivi de ex. citotoxici dintr-o probă utilizând senzori cu celule stimulate conform metodă revendicarea 1 **caracterizat prin aceea că** include una sau mai multe celule cu rol de senzor (1) cultivate pe suprafața unui traductor (2) aflat într-o incintă de măsură (3) având integrat un sistem de stimulare cu rol perturbator (4) și poziționată într-o incintă (5) care asigură parametri de mediu cu valori controlate. Traductorul (2) și sistemul de stimulare (4) sunt conectate la un sistem de monitorizare/analiză (6) cuplat cu un sistem de procesare și afișare a informației (7).
15. Dispozitiv de detecție conform revendicarea 14 **caracterizat prin aceea că** evidențierea prezenței și determinarea cantitativă a concentrațiilor compușilor bioactivi de ex. citotoxici se face utilizând parametrii măsurați prin spectroscopie electrică de impedanță, specifici proceselor de revenire la valori fiziologice sau staționare în prezența compușilor, comparativ cu cei determinați în condițiile în care proba nu conține compuși bioactivi.
16. Dispozitiv de detecție conform revendicarea 14 **caracterizat prin aceea că** permite expunerea la proba respectivă a uneia sau mai multor celule și evidențierea prezenței și determinarea cantitativă a concentrațiilor compușilor bioactivi de ex. citotoxici se face utilizând măsurători electrice.

17. Dispozitiv de detecție conform revendicarea 14 **caracterizat prin aceea că** permite sincronizarea sistemului de măsură cu aplicarea pulsurilor de lumină.
18. Dispozitiv de detecție conform revendicării 14 **caracterizat prin aceea că** permite realizarea analizelor în flux.
19. Dispozitiv de detecție conform revendicării 14 **caracterizat prin aceea că** utilizează seturi de electrozi de măsură, iluminați identic, realizați din straturi conductoare transparente subțiri depuse de ex. pe substrat de sticlă pentru minimizarea efectelor fotoelectrice datorate iluminării directe a electrozilor.
20. Dispozitiv de detecție conform revendicării 16 **caracterizat prin aceea că** evidențierea prezenței și determinarea cantitativă a concentrațiilor compușilor bioactivi de ex. citotoxici se face utilizând măsurători rapide ale semnalului electric prin evaluări optice.
21. Dispozitiv de detecție conform revendicării 17 **caracterizat prin aceea că** celulele senzor se cultivă pe substrat cu proprietăți de ghiduri de undă optice.
22. Dispozitiv de detecție conform revendicării 20 **caracterizat prin aceea că** include un microscop sau analizor de imagine similar.
23. Dispozitiv de detecție conform revendicarea 14 **caracterizat prin aceea că** include un sistem compus, cu pipete multicanal, de stimulare luminoasă, pentru determinari electrice, pentru aplicarea locală a probei și pentru prelevare probă pentru analize complementare.

Metoda și dispozitiv de detecție a unor compuși bioactivi, de ex. citotoxici, utilizând senzori cu celule stimulate

Grafice

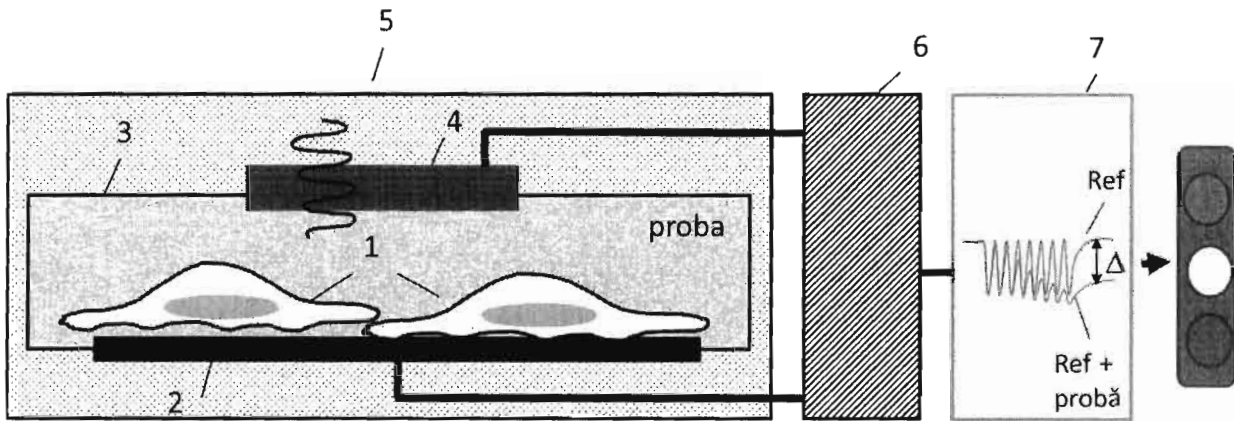


Figura 1: Concept metodă: 1-celule cu rol de senzor, 2-traductor, 3-incinta de masura, 4-sistem de stimulare, 5-incinta control condiții de mediu, 6-sistem de monitorizare, 7- sistem de procesare și afișare informației relevante pentru utilizator

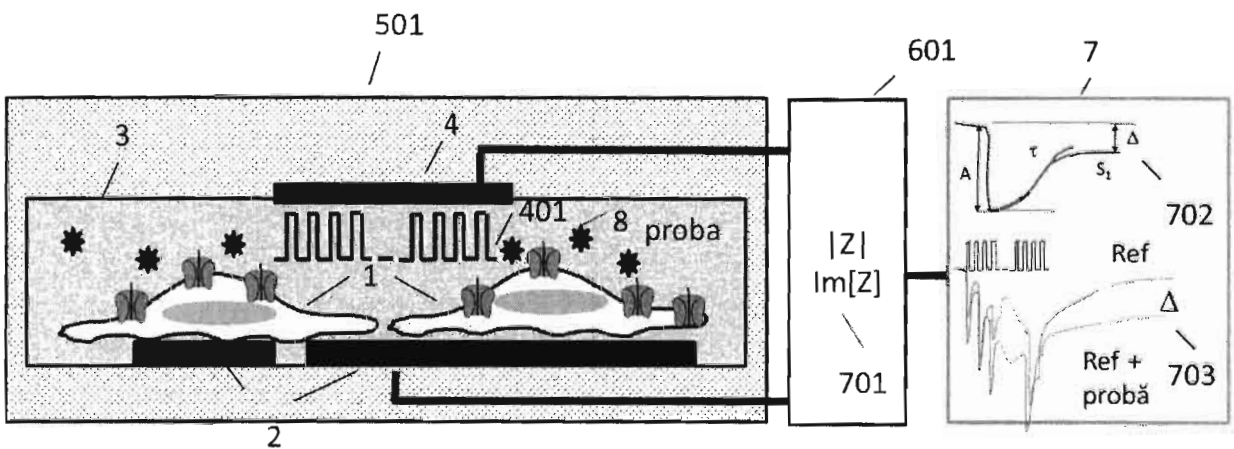


Figura 2: Schema bloc a dispozitivului care include control optogenetic și măsurători electrice rapide

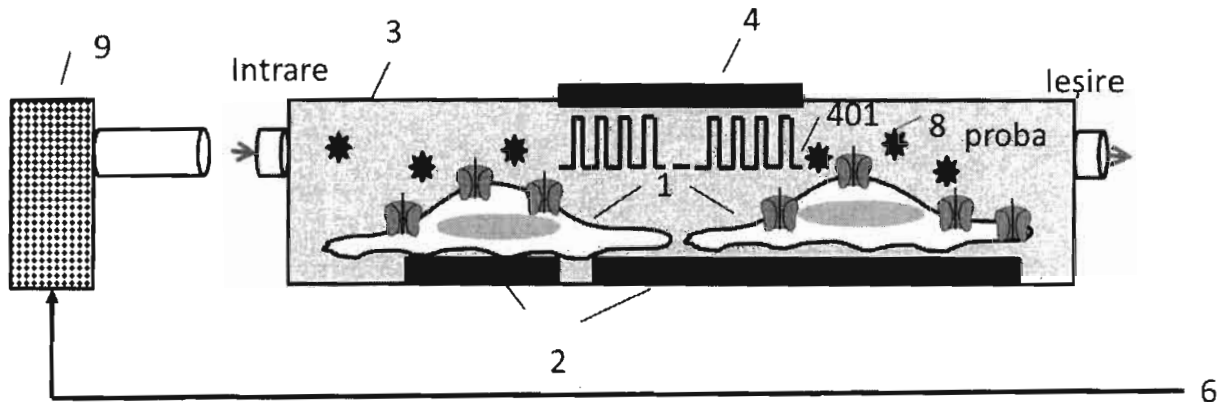


Figura 3: Detaliu schema bloc a dispozitivului care include stimularea luminoasă a unui senzor cu celule modificate optogenetic și măsurători electrice rapide în flux

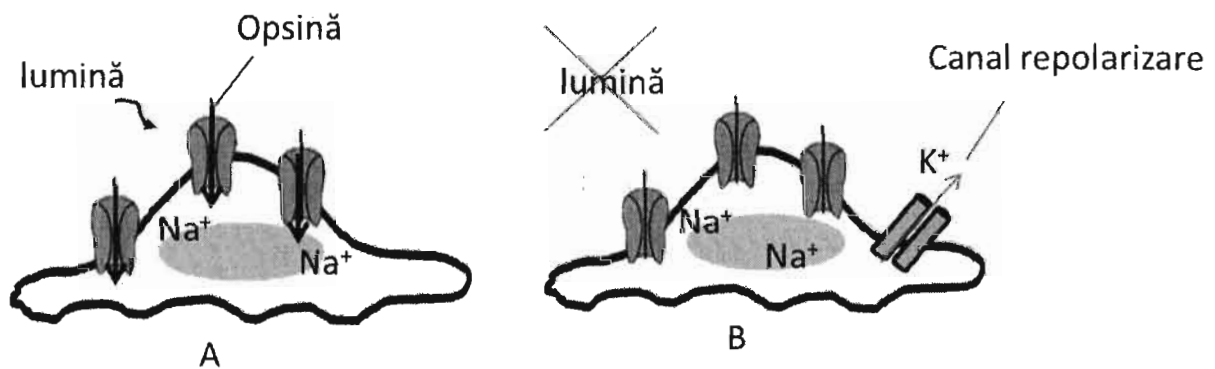


Figura 4: (A) Exemplu de model celular modificat optogenetic prin exprimarea canalului dependent de lumină și care permite influxul de ioni de sodiu (B) Exemplu de model celular modificat optogenetic și cu includerea unui canal de repolarizare membranară (prin ieșirea potasiului) după actuaarea luminoasă.

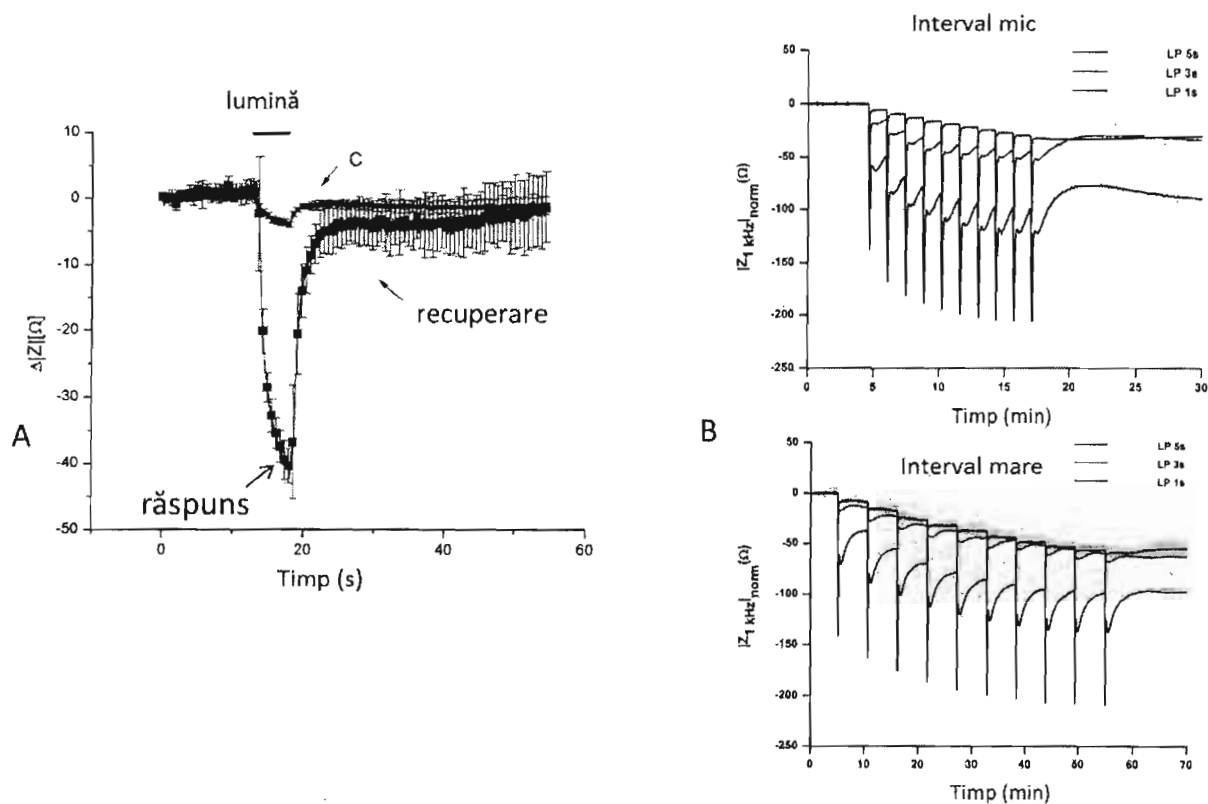


Figura 5: (A) Exemplu de înregistrare pentru un puls de lumină. (B) Exemple de dinamică de referință a valorilor de impedanță pentru stimuli controlați pentru care variază durata pulsurilor și intervalul dintre ele.

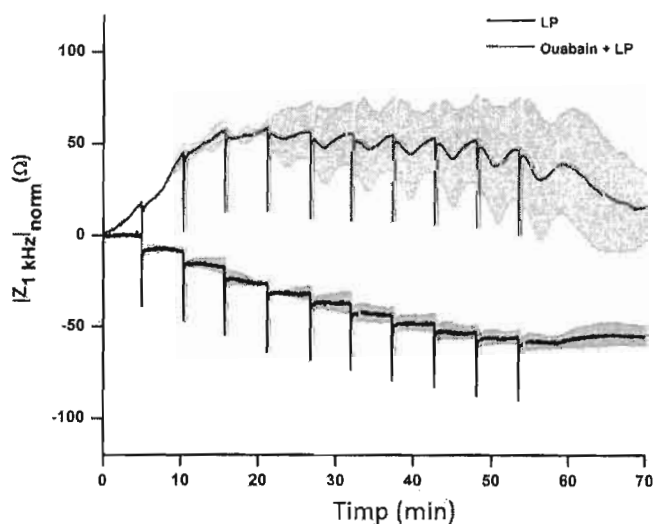


Figura 6: Exemplu de dinamică de referință (LP) și de dinamică cu evoluție modificată, generată de prezența în probă a unui compus (ouabaina) care afectează specific capacitatea de homeostazie.

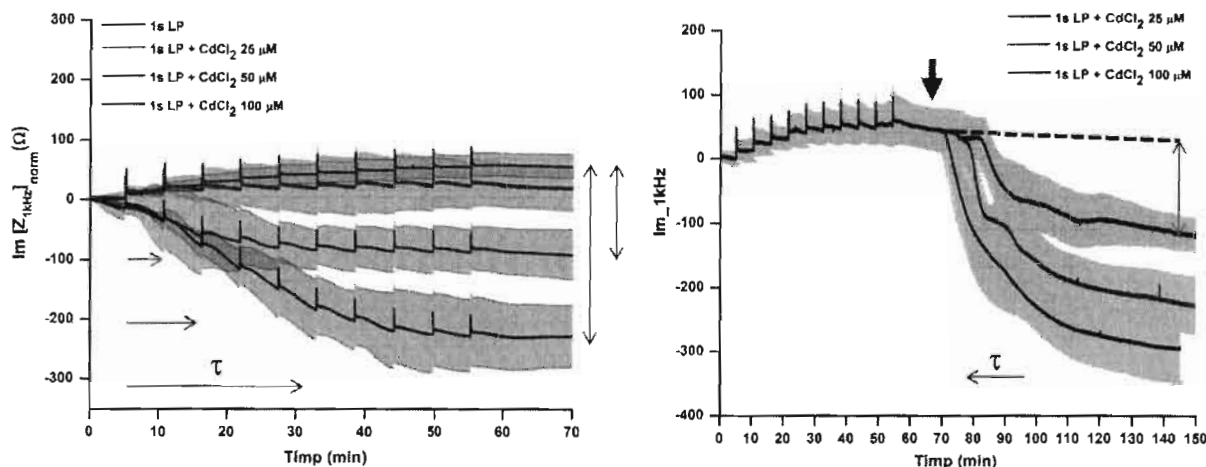


Figura 7: Exemple de dinamică dependentă de concentrația unui compus citotoxic, aplicat simultan cu stimulul luminos (A), aplicat la momentul indicat de săgeată, în flux pe celule pre-stimulate (B)

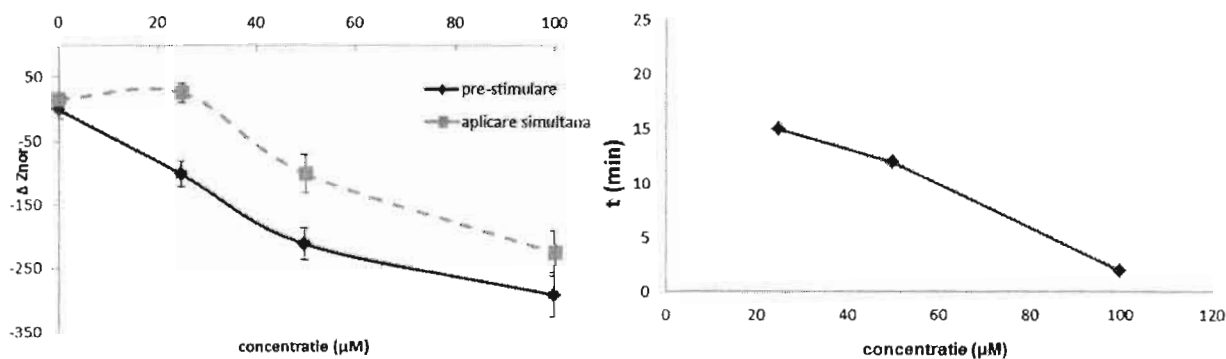


Figura 8: (A) Exemplu de curbă de calibrare bazată pe variația nivelului de bază de după perturbare în condițiile aplicării prestimulării și aplicării simultane a perturbării și compusului citotoxic; (B) Exemplu de curbă de calibrare bazată pe momentul de timp la care se înregistrează variația nivelului de bază după aplicarea probei conținând compusul citotoxic în condițiile pre aplicării perturbării.