



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00367**

(22) Data de depozit: **29/06/2022**

(41) Data publicării cererii:
29/12/2023 BOPI nr. **12/2023**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
FIZICA MATERIALELOR,
STR. ATOMIȘTILOR NR. 405A,
MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **IGNAT-BARSAN MĂDĂLINA- MARIA,
STR.CRIZANTEMELOR NR.21A, AP.6,
MĂGURELE, IF, RO;**

• **GOMEZ CAROLINE, STR. FIZICIENILOR
NR.40, AP.1, MĂGURELE, IF, RO;**
• **ALDEA ANCA, BD.DINICU GOLESCU,
NR.39, BL.5, SC.2, AP.37, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **OPREA BRATU DANIELA,
STR.SURĂNEȘI, NR.4, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ENACHE TEODOR ADRIAN, SAT NANOV,
COMUNA NANOV, TR, RO**

(54) **METODĂ DE DETECȚIE ELECTROCHIMICĂ *IN SITU*
A RADICALULUI SUPEROXID ÎN CULTURI CELULARE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de detecție electrochimică *in situ* a concentrațiilor nanomolare de superoxid eliberat de culturi celulare. Metoda, conform invenției, constă în cuantificarea cantității de superoxid eliberată de celule sub acțiunea unui declanșator de stres celular injectat în celula electrochimică ce integrează ca dispozitiv de detecție un biosenzor electrochimic pe bază de aur, enzima superoxid dismutază (SOD) și celule crescute direct pe suprafața acestuia, în proximitatea

stratului enzimatic (Au/SOD/celule), prin aplicarea metodei de cronoamperometrie la potențial fix și spectroscopie de impedanță electrochimică și evaluarea efectului superoxidului asupra celulelor prin metode de imagistică uzuale.

Revendicări: 2
Figuri: 3



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. ... 2022 00367
Data depozit ... 29-06-2022

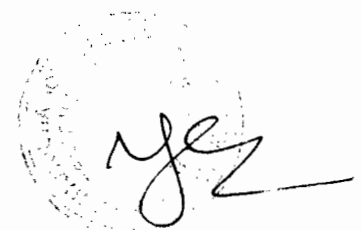
DESCRIEREA BREVETULUI DE INVENȚIE

Titlu: Metode de detecție electrochimică in situ a radicalului superoxid în culturi celulare

Elaborat de: Ignat-Bârsan Mădălina-Maria, Gomes Caroline, Aldea Anca, Bratu Oprea Daniela, Enache Teodor Adrian.

Prezenta invenție se referă la două metode de detecție electrochimică in situ a radicalului superoxid generat în culturi celulare sub acțiunea unui declanșator de stres celular. Mecanismul de detecție se bazează pe eliberarea proporțională de superoxid de către celule sub acțiunea unui declanșator de stres celular injectat în celula electrochimică ce integrează ca dispozitiv de detecție un biosenzor electrochimic pe bază de aur, superoxid dismutază (SOD) și celule crescute direct pe suprafața acestuia, în proximitate cu stratul enzimatic (Au/SOD/celule).

Radicalul superoxidul este un marker al stresului oxidativ, iar producția necontrolată și/sau eliminarea inefficientă a acestuia de către sistemul antioxidant endogen poate rezulta în apariția mai multor afecțiuni, ca de exemplu arteroscleroza, hipertensiune arterială, diabet, miocardita, etc. Astfel, o monitorizare in vivo a variației concentrației de superoxid este importantă în medicina preventivă. Metodele de detecție ale superoxidului în culturi celulare folosesc microscopia de fluorescență sau citometria în flux, care se bazează pe utilizarea de coloranți cu permeabilitate celulară crescută, care în urma interacțiunii cu superoxidul generează un produs fluorescent. Două metode de detecție spectrofotometrice (UV-vis și fluorimetrică) a superoxidului în mediu celular care utilizează colorantul fluorescent 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol au fost brevetate în SUA (US20060188997A1). O altă metodă flurimetrică a fost dezvoltată pentru detecția simultană a mai multor specii reactive de oxigen în mediu celular, folosind o serie de coloranți fluorescenți (US 2010/0081159 A1). În prezent, există pe piață kit-uri de detecție flurimetrică a superoxidului. Pe lângă metodele spectrofotometrice, metodele electrochimice sunt și ele utilizate cu succes în detecția superoxidului, cele din urmă având anumite avantaje precum: costuri reduse, portabilitatea și timpi reduși de achiziție și analiză a datelor. Astfel, a fost brevetat un senzor electrochimic non-enzimatic de superoxid a cărei detecție se bazează pe interacțiunea dintre complexul molecular porfirina-fier cu radicalul superoxid (WO2005088290). Mai mult, utilizarea biosenzorilor



enzimatici electrochimici prezintă o selectivitate superioară conferită de enzima superoxid dismutază, care catalizează reacția de disproporționare a radicalului superoxid, și care poate fi cuantificată electrochimic.

Principalele provocări legate de detecția superoxidului in vivo în culturi celulare sunt: i) cantitatea mică de superoxid, de ordinul nanomolar, eliberată de culturile celulare și ii) biocompatibilitatea materialelor utilizate, în special în cazul utilizării metodelor electrochimice bazate pe biosenzori.

Două metode extrem de sensibile pentru detecția de radical superoxid în culturi celulare au fost dezvoltate și sunt descrise în acest brevet. Aceste metode cuantifică cantitatea de superoxid eliberată de celulele crescute direct pe dispozitivul de detecție (Au/SOD/celule), sub acțiunea unor compuși chimici cu efect de declanșare a stresului celular, utilizând conversia enzimatică a superoxidului la oxigen, catalizată de SOD imobilizată pe dispozitivul de detecție electrochimic, în proximitate cu cultura celulară. Prima metodă cuantifică cantitatea de superoxid produsă de celule prin metoda cronoamperometrică la o valoare pozitivă a potențialului aplicat, care să permită regenerarea centrului activ enzimatic în urma conversiei enzimatică a superoxidului și care duce la o creștere a curentului anodic; această creștere de curent prezintă o dependență liniară cu concentrația de superoxid. A doua metodă de detecție utilizează spectroscopia de impedanță electrochimică la potențialul de circuit deschis, și corelează o creștere a valorilor de impedanță reală la frecvențe înalte spre medii cu creșterea concentrației de superoxid produsă de celule.

Metodele de detecție electrochimică brevetate rezolvă problemele detecției in situ a radicalului superoxid în culturi celulare utilizând metodele spectrofotometrice, diminuând considerabil timpul experimental, costurile crescute și valorile limitelor de detecție. Mai mult, metodele de detecție cuantifică concentrația totală de superoxid eliberat de celulă în urma stimulilor chimici externi, nu doar cea de la nivelul mitocondriei sau a reticulului endoplasmatic.

Cele două metode de detecție electrochimică din prezenta invenție au următoarele avantaje:

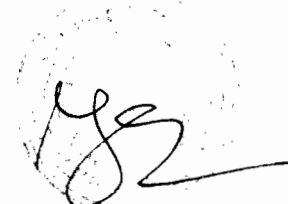
- i) detecția foarte precisă a superoxidului, oferită de proximitatea dintre cultura celulară și stratul enzimatic existent la suprafața dispozitivului de detecție, ceea ce determină un timp foarte scăzut între producția și măsurarea concentrației de superoxid eliberată de culturi celulare, limitând disproporționarea chimică a acestuia;



- ii) măsurarea concentrației totale a superoxidului generat de celule sub acțiunea declanșatorului de stres celular;
- iii) biocompatibilitatea ridicată a materialelor utilizate în fabricarea dispozitivului de detecție, oferită de utilizarea aurului în compoziția transductorului electrochimic și a nanostructurilor de oxid de zinc, care cresc hidrofilitatea suprafeței, și totodată și aderența atât a enzimei SOD cât și a celulelor pe suprafața dispozitivului de detecție;
- iv) valori scăzute ale limitei de detecție conferite atât de metodele de detecție utilizate, cronoamperometria la potențial fix și spectroscopia de impedanță electrochimică, dar și de suprafața nanostructurată a biodispozitivului Au/SOD/celule;
- v) posibilitatea utilizării biodispozitivului de detecție Au/SOD/celule pentru evaluarea efectului superoxidului asupra celulelor, prin metode de imagistică, precum microscopia de fluorescență și cea electronica de baleiaj, și comparând morfologia și numărul de celule vii înainte și după efectuarea testelor de stres chimic care duc la generarea radicalului superoxid.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției în legătura cu **Figura 1-** A) Reprezentare schematică generală a celulei electrochimice utilizată pentru efectuarea măsurărilor electrochimice cu următoarele componente: 1-corpul celulei, 2-electrodul de lucru (biosenzorul Au/SOD/celule), 3-electrodul de referință și 4-electrodul auxiliar; B) componentele biosenzorului Au/SOD/celule cu 1-transductorul electrochimic, 2-strat enzimatic SOD și 3-cultura celulară; **Figura 2-** Metoda cronoamperometrică la potențial aplicat de +0.3 V vs. Ag/AgCl înregistrat la biosenzorul Au/SOD/celule înainte și după 5 injecții consecutive ale declanșatorului de stres și B) Curba de calibrare corespunzătoare construită considerând valoarea variației de curent aferentă fiecărei concentrații de declanșator de stres și concentrația declanșatorului de stres și **Figura 3-** Metoda de spectroscopie de impedanță electrochimică de cuantificare a superoxidului produs de celule cu A) Spectre de impedanță Nyquist înregistrate la potențialul de circuit deschis la biosenzorul Au/SOD/celule înainte și după 5 injecții consecutive ale declanșatorului de stres și B) Curba de calibrare construită considerând valoarea impedanței reale la o frecvență de 10 kHz și concentrația de declanșator de stres celular.

Figura 1 reprezintă celula electrochimică utilizată pentru efectuarea măsurărilor electrochimice. Biosenzorul utilizat în aceste măsurători a fost construit utilizând un transductor electrochimic de Au pe care s-a imobilizat enzima SOD prin intermediul agenților de reticulare 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimidă și N-hidroxisuccinimidă. Ulterior, celulele au fost



însămânțate pe biosenzorul Au/SOD și lăsate să crească timp de 48 h sub formă de culturi aderente, în condiții controlate. Măsurătorile fluorimetrice au permis estimarea numărului și morfologia celulelor crescute pe substratul Au/SOD, atât înainte, cât și posterior efectuării măsurătorilor electrochimice care au implicat utilizarea declanșatorului de stres. După popularea biosenzorului Au/SOD cu celule, acesta a fost montat pe fundul corpului celulei electrochimice reprezentată în Figura 1, și celula închisă etanș. Măsurătorile s-au efectuat în mediu de cultura celulară cu un pH de 7.5 și utilizând pe lângă electrodul de lucru Au/SOD/celule, electrodul de referință de Ag/AgCl și electrodul auxiliar, o plăcuță de platină cu o arie geometrică superioară celei a electrodului de lucru.

Figura 2A arată un răspuns cronoamperometric tipic înregistrat cu biosenzorul Au/SOD/celule, în prezența a 5 concentrații de declanșator de stres. În urma injecției declanșatorului de stres, celulele eliberează radical superoxid, proporțional cu concentrația declanșatorului de stres, care poate fi monitorizat la Au/SOD pe baza mecanismului de detecție următor, la un potențial de +0.3 V vs. Ag/AgCl:



Astfel, la electrod se generează curenți de oxidare direct proporționali cu cantitatea de superoxid eliberată de celule, și pe baza acestui răspuns se poate construi curba de calibrare arătată în **Figura 2B**, care corelează creșterea curentului anodic ($\sum_{n=1}^5 \Delta j_n$) cu concentrația declanșatorului de stres (ecuația dreptei $y = \text{intercept} + \text{panta} \cdot x$).

Figura 3A arată spectrele Nyquist de impedanță înregistrate la potențialul de circuit deschis, în intervalul de frecvență înaltă spre medie, de la 65 la 1 kHz (10 puncte pe decada de frecvență), cu o amplitudine de 5 mV. Primul spectru a fost înregistrat în absența declanșatorului de stres celular, următoarele 5 fiind înregistrate posterior injecției de declanșator de stres celular, care generează o concentrație proporțională de superoxid eliberată de celule. Prezența de superoxid duce la o creștere continuă și liniară a valorilor de impedanță reală la frecvențe între 25-1kHz. Astfel, este posibilă construirea curbei de calibrare din **Figura 3B**, care corelează în acest caz specific valoarea impedanței reale de la frecvența de 10 kHz cu concentrația declanșatorului de stres celular (ecuația dreptei $y = \text{intercept} + \text{panta} \cdot x$).

REVENDICĂRI

1. Metodă cronoamperometrică la potențial fix pentru cuantificarea in situ a superoxidului generat de celule sub acțiunea unui declanșator de stres celular, caracterizată prin aceea că utilizează un biosenzor electrochimic pe bază de superoxid dismutază (SOD) și celule crescute direct pe suprafața acestuia, în proximitate cu stratul enzimatic.
2. Metoda de spectroscopie de impedanță electrochimică de cuantificare in situ a superoxidului generat de celule sub acțiunea unui declanșator de stres celular, caracterizată prin aceea că utilizează un biosenzor electrochimic pe baza de superoxid dismutază (SOD) și celule crescute direct pe suprafața acestuia, în proximitate cu stratul enzimatic.



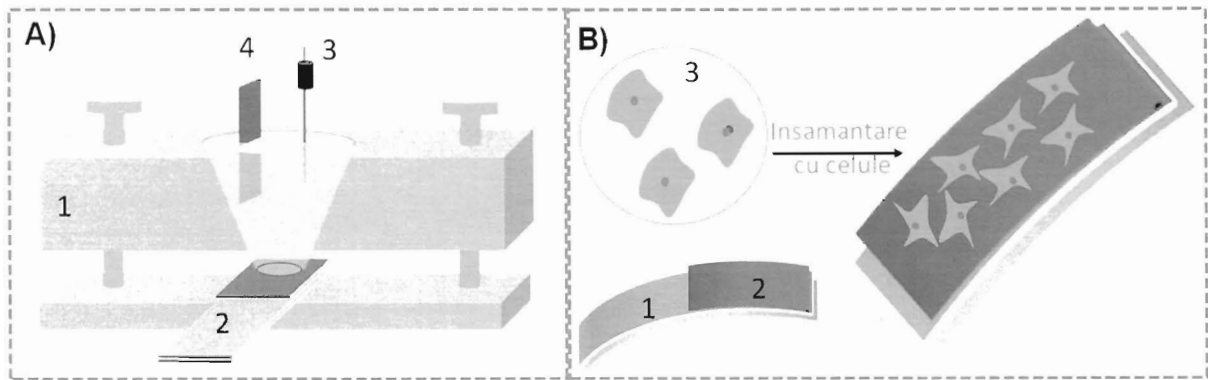


Figura 1- A) Reprezentare schematică generală a celulei electrochimice utilizată pentru efectuarea măsurătorilor electrochimice cu următoarele componente: 1-corpul celulei, 2-electrodul de lucru (biosenzorul Au/SOD/celule), 3-electrodul de referință și 4-electrodul auxiliar; B) componentele biosenzorului Au/SOD/celule cu 1-transductorul electrochimic, 2-strat enzimatic SOD și 3-cultura celulară;

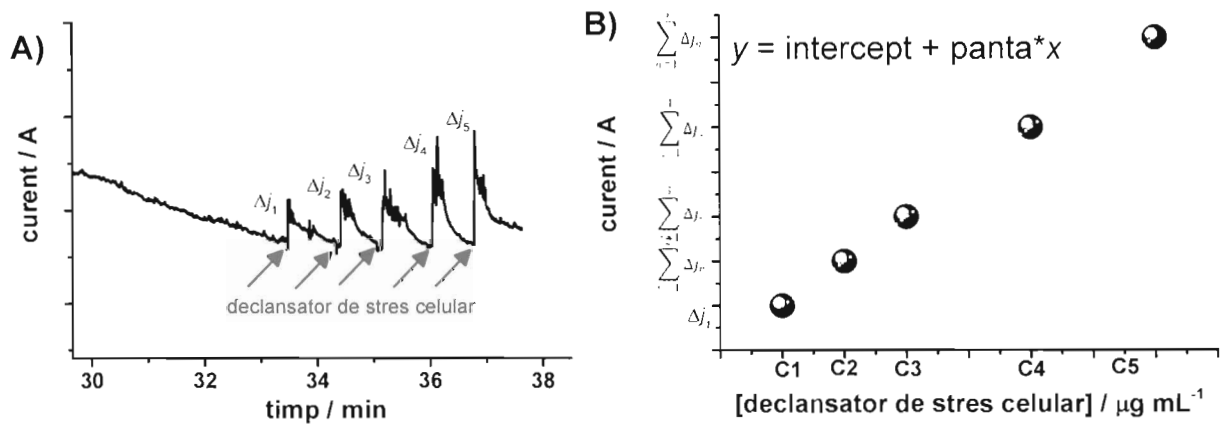


Figura 2- Metoda cronoamperometrică de cuantificare a superoxidului produs de celule
 A) Răspuns cronoamperometric la potențial aplicat de +0.3 V vs. Ag/AgCl înregistrat la biosenzorul Au/SOD/celule înainte și după 5 injecții consecutive ale declanșatorului de stres
 B) Curba de calibrare corespunzătoare construită considerând valoarea variației de curent aferentă fiecărei concentrații de declanșator de stres și concentrația declanșatorului de stres.



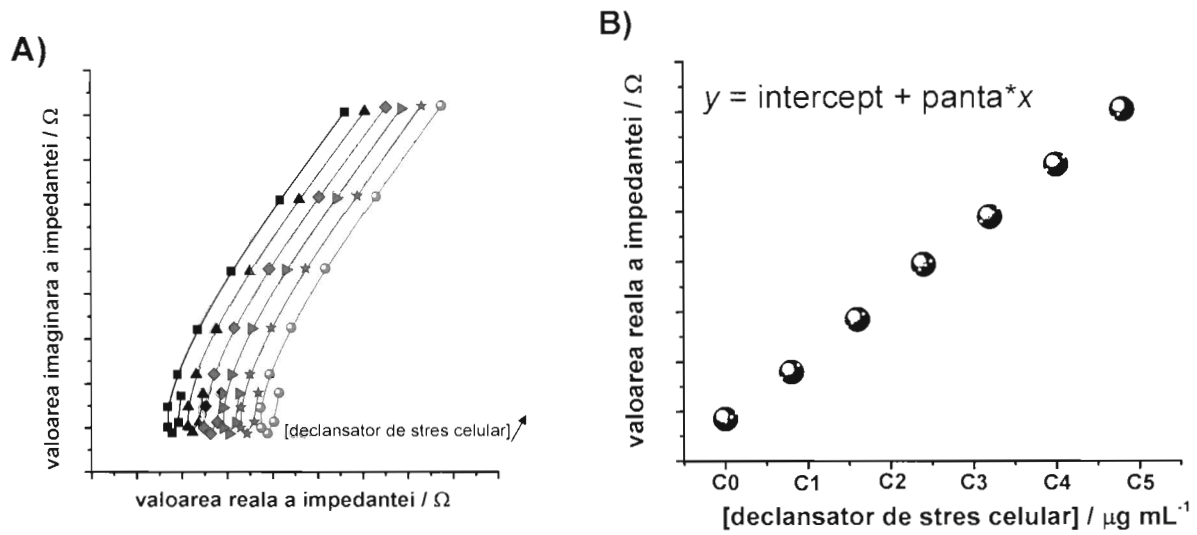


Figura 3- Metoda de spectroscopie de impedanță electrochimică de cuantificare a superoxidului produs de celule:

- A) Spectre de impedanță Nyquist înregistrate la potențialul de circuit deschis la biosenzorul Au/SOD/celule înainte și după 5 injecții consecutive ale declanșatorului de stres
- B) Curba de calibrare construită considerând valoarea impedanței reale la o frecvență de 10 kHz și concentrația de declanșator de stres celular.

