

## BIOSENZOR CU FIBRE OPTICE PENTRU MĂSURAREA CONCENTRAȚIEI ANTIGENULUI SPECIFIC PROSTATIC

Conf. Dr. Ing. M. STANCIU<sup>1</sup>, C.P. III, Dr. Chim. Adina STANCIU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universitatea POLITEHNICA București <sup>2</sup> Institutul Oncologic "Alexandru Trestioreanu" - București

### Rezumat:

Antigenul specific prostatic (PSA) este o glicoproteină cu o greutate moleculară de 33÷34 kDa, sintetizată de către epiteliul prostatic benign și malign. În prezent, măsurarea concentrației de PSA din sânge, mai exact din ser, se realizează în laboratoare specializate, întrebuițând tehnici diverse de tip: RIA, FIA, sau EIA, sisteme manuale sau automate - tehnici care necesită timpuri relativ mari din momentul prelevării sângelui până la obținerea rezultatului (de ordinul orelor). Din aceste motive, au fost demarate importante programe de cercetare în vederea realizării unor senzori pentru măsurarea rapidă a concentrației de PSA (inclusiv de unică folosință). O interesantă variantă a acestor "teste rapide" o constituie senzorii chimici și biochimici cu fibre optice, care combină optica evanescentă cu reacția dintre un antigen și un anticorp marcat fluorescent, imobilizat covalent pe corpul sensorului.

### 1. SENZORI CHIMICI ȘI BIOCHIMICI (BIOSENZORI). GENERALITĂȚI

Tehnicile de realizare a **senzorilor chimici și biochimici**, pe baza dispozitivelor optice și optoelectronice, tind să devină din ce în ce mai utilizate, majoritatea implicând folosirea fibrelor optice. Direcția principală de investigare în acest domeniu o reprezintă dezvoltarea membranelor sensibile din punct de vedere chimic și biochimic, atât pentru mediile lichide, cât și pentru cele gazoase, în ultimul caz lucrându-se, în special, în spectrul de radiație infraroșu (IR). De asemenea, se acordă o mare atenție miniaturizării și creșterii duratei de viață, respectiv a posibilităților de sterilizare pentru senzorii *in vivo*, utilizați în medicină. O clasificare interesantă și sugestivă a senzorilor chimici și biochimici cu fibre optice este prezentată în figura 1.

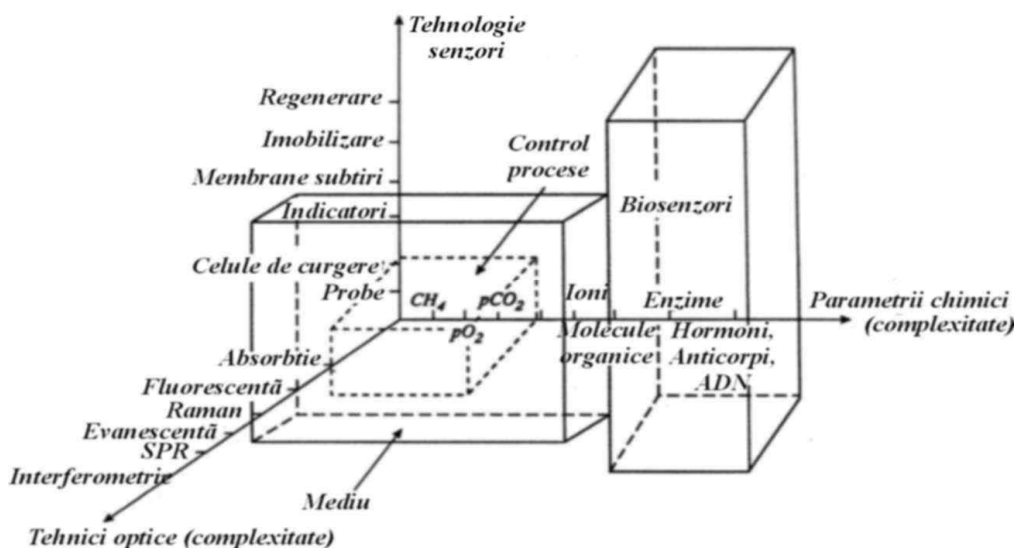


Fig. 1. Sistem tridimensional de clasificare a senzorilor chimici și biochimici cu fibre optice.

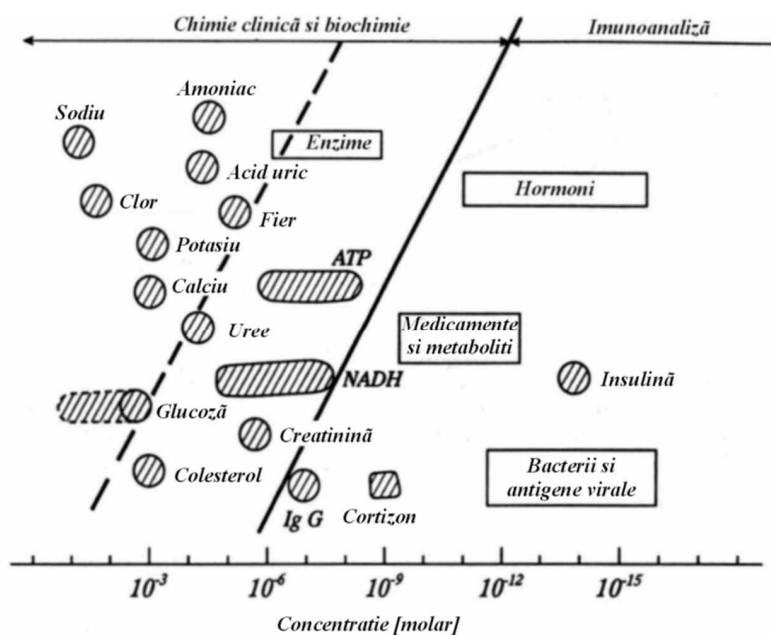
Practic, această clasificare "tridimensională" are trei criterii de bază: parametrii măsurați, tehnologia utilizată și tehnicile optice (fenomenele fizico-optice) folosite.

În majoritatea cazurilor de senzori chimici și biochimici cu fibre optice, principalele etape ale conversiei mărimii de măsurat într-o mărime electrică sunt:

- I. transformarea unui semnal electric într-un semnal luminos de excitație;
- II. prin intermediul unui fenomen fizic (fotochimic), lumina influențează (excită) mediul chimic sau biochimic de analizat (*analit*). În cazul fenomenelor de chemiluminescență și biochemiluminescență, aceste prime două etape lipsesc;
- III. sub influența semnalului luminos de excitație au loc reacții chimice, urmate de procese de recunoaștere moleculară și de conversie a mărimilor chimice și biochimice în semnale optice, prin utilizarea unor indicatori imobilizați pe corpul sensorului. În cazul, în care nu există un indicator direct pentru analitul studiat, se utilizează *analizi intermediari* ( $O_2$ ,  $CO_2$ , straturi bioreactive etc.), cu funcție de *indicatori* sau *substanțe de marcare*;
- IV. semnalul optic modulat este convertit într-un semnal electric, cu ajutorul unor fotodetectori și prelucrat electronic, în funcție de modelul matematic al procesului.

## 2. APLICAȚII ALE BIOSENZORILOR ÎN MEDICINA CLINICĂ

În figura 2 sunt prezentate domeniile uzuale ale concentrațiilor celor mai importante specii chimice și biochimice din sânge, specifice *chimiei și biochimiei clinice* și tehnicilor de *imunoanaliză*.



**Fig. 2. Domeniile uzuale ale concentrațiilor celor mai importante specii (bio)chimice din sânge.**

În prezent, în laboratoarele de biochimie din clinicile moderne, se utilizează, cu rezultate foarte bune, o serie de senzori chimici și biochimici, exemple reprezentative fiind senzorii pentru măsurarea concentrației de glucoză sau de acid lactic. O revoluție în acest domeniu va apărea atunci când vor fi disponibile "sistemele cu citire directă", respectiv atunci când nu vor mai fi necesare operații preliminare de pregătire a analitului (diluții, marcări etc.). În prezent, există o importantă cerere pentru a măsura și monitoriza o mare varietate de mărimi, cum ar fi colesterolul, antigenii, anticorpii, substanțele neurochimice etc. În tabelul 1, sunt prezentate câteva exemple reprezentative.

Tabelul 1. Biosenzori utilizați în medicina clinică.

Nr. crt.	Tip de biosenzor	Analizi	Aplicații
1	Miniatură și unică folosință	Glucoză	Diabet
2		Colesterol	Afecțiuni cardiovasculare
3		Medicamente și droguri	Intoxicații, abuzuri
4	Multi-test	Glucoză + ioni ( $Ca^{2+}$ , $K^+$ etc.)	Controlul sănătății
5		Creatinină + uree	Afecțiuni renale
6		Progesteron + Estradiol	Teste de fertilitate
7	<i>In vivo</i>	Glucoză	Controlul on-line al insulinei
8		Medicamente și droguri	Urmărirea reacției la medicație
9		Glucoză, creatinină, uree, ioni etc.	Reanimare

În cazul biosenzorilor medicali, o poziție interesantă o ocupă "**imunosenzorii optici**". Aceștia utilizează, în general, anticorpi pentru măsurarea concentrației de antigeni. Practic, în funcție de gradul de legare a antigenilor din substratul de analizat și anticorpii imobilizați pe zona activă a senzorilor, se modifică anumiți parametri optici, care pot fi măsurați prin diverse tehnici (interferometrie, reflexie, absorbție etc.). Cele mai utilizate **tehnici de imobilizare**, pentru realizarea senzorilor optici, sunt: tehnicile fizice (captura fizică și microîncapsularea), tehnicile fizico-chimice (adsorbția, metoda soluție-gel, folosirea membranelor lipofilice) și tehnicile chimice (legătura covalentă și ionică).

### 3. BIOSENZOR PENTRU MĂSURAREA CONCENTRAȚIEI DE PSA

#### 3.1 ANTIGENUL SPECIFIC PROSTATIC (PSA). GENERALITĂȚI

Antigenul specific prostatic (PSA) este o glicoproteină cu o greutate moleculară de 33÷34 kDa, sintetizată de către epiteliul prostatic benign și malign. În prezent, măsurarea concentrației de PSA din sânge, mai exact din ser, se realizează în laboratoare specializate, întrebunțând tehnici diverse de tip: RIA, FIA, sau EIA, sisteme manuale sau automate - tehnici care necesită timpi relativ mari din momentul prelevării sângelui până la obținerea rezultatului (de ordinul orelor). Din aceste motive, au fost demarate importante programe de cercetare în vederea realizării unor senzori pentru măsurarea rapidă a concentrației de PSA (inclusiv de unică folosință).

Statisticile arată că pragul dintre valorile normale și patologice (*cut-off*) este de aproximativ 4 ng/ml. Un nivel de PSA la limita de 4 ng/ml presupune un risc al cancerului de prostată de 20%, iar atunci când valoarea crește la 10 ng/ml probabilitatea de a găsi la biopsie un ADK de prostată este mai mare de 50%. În consecință, sistemele de măsurare a concentrației de PSA trebuie să asigure un domeniu de intrare, de circa 0.5÷100 ng/ml.

Această lucrare descrie tehnica de măsurare a concentrației de PSA direct din sânge (un motiv în plus pentru o măsurare rapidă) cu ajutorul unui biosenzor optic cu modificarea fluorescenței. Sensorul are la bază tehnologia FCFD (*fluorescence capillary fill device*), care poate lucra cu probe de sânge prelevate din deget. Incubarea "probei" se face la temperatura camerei, iar rezultatul este disponibil în 10÷20 minute.

#### 3.2. PRINCIPIUL BIOSENZORULUI FCFD

Dispozitivul FCFD este un biosenzor optic plat (plan lamelar), care combină fenomenul de evanescență cu cel de fluorescență, pentru măsurarea concentrației de PSA din sânge (figura 3). Acest biosenzor are la bază reacția imună dintre antigen (PSA) și doi anticorpi monoclonali specifici (anti-PSA<sub>1</sub> și anti-PSA<sub>2</sub>). Dispozitivul capilar (implicit, ghidul de undă al senzorului optic) este format din două lamele de sticlă dispuse la o distanță de 0.1 mm

(interstițiul capilar - ghid de undă). Pe suprafața interioară a plăcuței inferioare se imobilizează covalent anticorpul anti-PSA<sub>1</sub> (anticorp de captură). În ghidul de undă, microeșantionul de sânge este amestecat în proporție de 1:1 cu anticopul anti-PSA<sub>2</sub>, marcat fluorescent cu fluoroforul (conjugatul: APC, FITC sau CY5). Se evită astfel dozarea cu micropipete a probelor utilizate în tehnicile clasice de analiză. Deoarece metoda de determinare a PSA se bazează pe tehnica sandwich, pe suprafața inferioară a dispozitivului se formează complexul: *anticorp de captură (anti-PSA<sub>1</sub>) - antigen (PSA) - anticorp marcat fluorescent (anti-PSA<sub>2</sub>)*. Fluorescența legată și liberă este mai apoi determinată prin utilizarea proprietăților evanescente ale dispozitivului, eliminând în acest fel etapele intermediare.

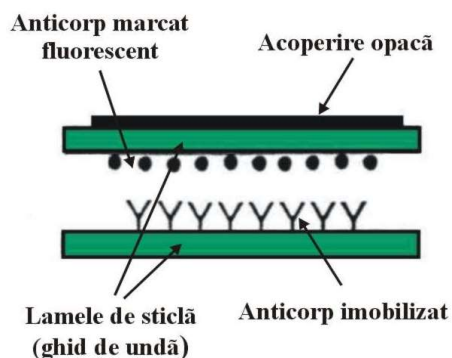


Fig. 3 Senzor optic FCFD pentru măsurarea PSA-lui (structură plan lamelară).

O altă variantă constructivă a acestui biosenzor, prezentată în figura 4, este cea cu capilar cilindric realizat din miezul unei fibre optice, pe care este imobilizat anticorpul de captură anti-PSA<sub>1</sub> și un manșon cilindric, acoperit opac pe suprafața exterioară. Avantajul acestei structuri este dat de faptul că fibra optică permite transmisia informației de măsurare la distanță, iar senzorul este detașabil (se cuplează la sistem cu conectori optici).

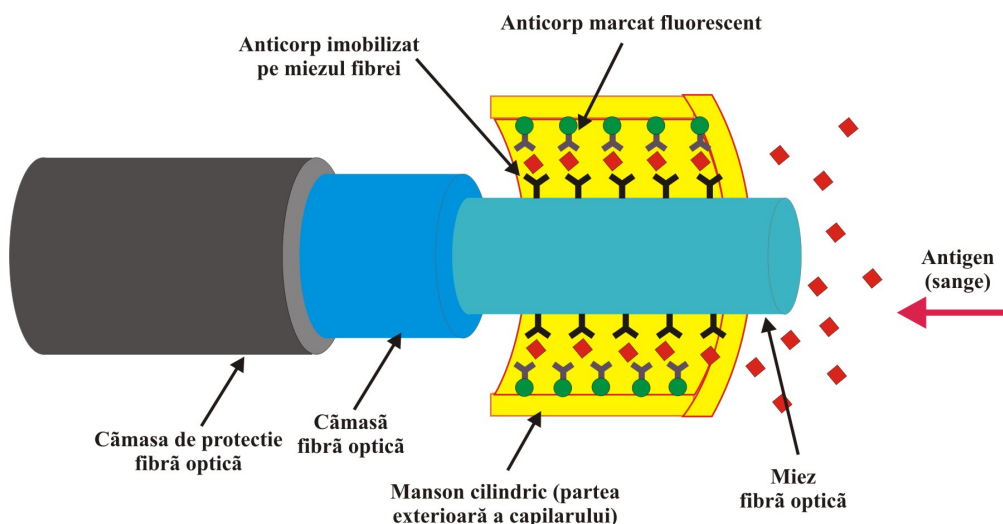


Fig. 4 Senzor cu fibră optică FCFD - structură cilindrică.

Schema bloc a sistemului optoelectronic de măsurare cuprinde senzorul (dispozitivul FCFD), o sursă optică de excitație (o diodă laser care emite în zona spectrală de excitație a fluoroforului), un fotodetector de sensibilitate mare, un filtru optic și dispozitivele de cuplare optică.

### 3.3. ALEGEREA FLUOROFORULUI

Proprietățile fluorescente ale fluoroforului depind de gradul de legare a antigenului de complexul anticorp-fluorofor. Aceste proprietăți sunt analizate, utilizând proprietățile evanescente ale dispozitivului. Prin această tehnică se elimină pașii de spălare sau separare.

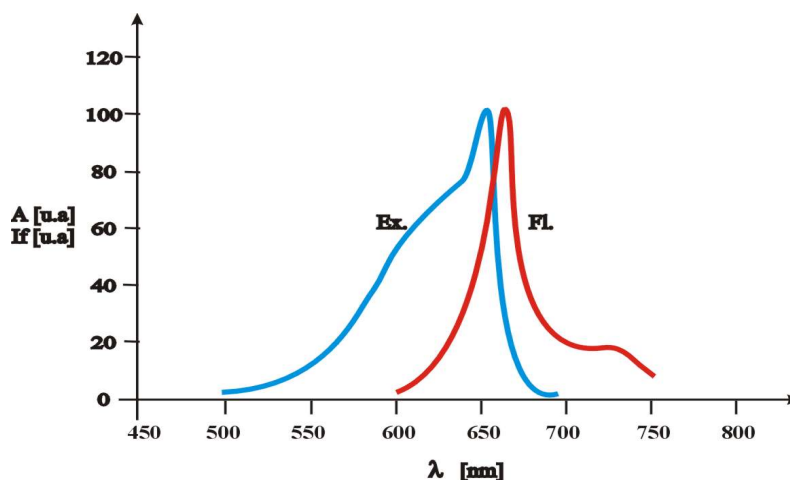
Viabilitatea comercială a senzorului pentru măsurarea concentrației de PSA depinde de alegerea fluoroforului. Această alegere se face pe baza a cinci criterii: sensibilitatea și selectivitatea, fiabilitatea, ușurința conjugării și stabilitatea complexului și prețul.

FITC-ul este un fluorocrom standard, APC-ul o ficobiliproteină extrasă din alge, iar CY5 un colorant sintetic pe bază de cianină cu proprietăți fluorescente asemănătoare APC-lui. Principalele caracteristici ale acestor markeri sunt prezentate în tabelul 2. De asemenea, în figura 5, sunt prezentate caracteristicile spectrale absorbantă - fluorescență ale APC-lui.

**Tabelul 2. Caracteristici ale unor fluorofori utilizați pentru măsurarea PSA-lui**

Nr. crt.	Fluorofor	M [-]	$\lambda(A_{max})$ [nm]	$\lambda(I_{f-max})$ [nm]	$K_e$ [-]	$\eta$ [-]
1	<b>FITC</b>	390	490	525	70 000	0.85
2	<b>APC</b>	104 000	650	660	700 000	0.68
3	<b>CY5</b>	750	650	667	200 000	0.28

unde M este masă moleculară,  $\lambda(A_{max})$  lungimea de undă corespunzătoare absorbantei maxime,  $\lambda(I_{f-max})$  lungimea de undă corespunzătoare intensității fluorescente maxime,  $K_e$  coeficientul de extincție a fluorescenței și  $\eta$  randamentul cuantic al fluorescenței.



**Fig. 5 Caracteristicile de absorbantă și fluorescență ale fluoroforului APC.**

Fluoroforii clasici, cum ar fi FITC-ul, tind să emită lumină la lungimi de undă unde există și o fluorescență intrinsecă (naturală) semnificativă a serului ( $\lambda_f = 525$  nm), în timp ce ceilalți fluorofori au emisia fluorescentă într-o zonă spectrală unde fluorescența serului este neglijabilă ( $\lambda_f > 600$  nm). Utilizarea sângelui este, deci, preferabilă serului deoarece fluorescența intrinsecă (autofluorescența) sângelui integral este mult mai mică decât a serului.

### 3.4. CONCLUZII

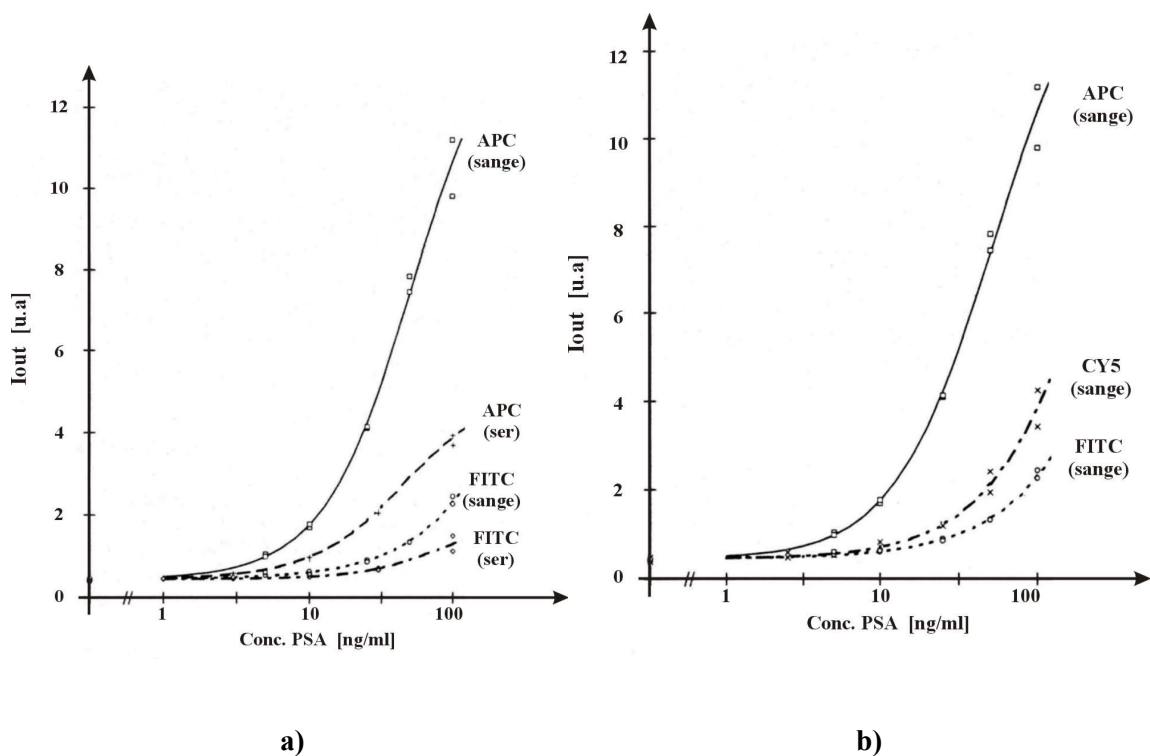
În urma testelor efectuate cu cei trei fluorofori, s-au obținut caracteristicile de transfer (curbele) ale sistemului de măsurare cu senzor FCFD. În figura 6.a este prezentată curba

intensității de ieșire a sistemului (în unități arbitrare) în funcție de concentrația de PSA, pentru FITC și APC - pe sânge și pe ser (se observă că, în ambele cazuri, sensibilitatea este mai bună pe sânge), iar în figura 6.b - curbele pentru cei trei fluorofori (pe sânge). Din cele două grafice, se observă că cea mai bună sensibilitate este obținută pentru APC.

O sinteză a performanțelor (limită de detecție și exactitate) sistemului studiat, în funcție de fluoroforul utilizat, este prezentată în tabelul 3 (rezultatele obținute sunt valabile pentru un timp de incubare / măsurare de 20 minute).

**Tabelul 3. Performanțele sensorului FCFD, în funcție de fluoroforul utilizat.**

Nr. crt.	Fluorofor	Limită inf. de detecție [ng/ml]	Exactitate [%] CV - la 5 ng/ml
1	APC	0.5	9
2	CY5	4.0	24
3	FITC	4.2	33



**Fig. 6 Caracteristica de transfer a sistemului de măsurare a concentrației de PSA cu senzor FCFD pentru diverși fluorofori (pe sânge sau ser) - intensitate,  $I_{out}$ [u.a.] în funcție de concentrația de PSA.**

În concluzie, un biosenzor bazat pe fluorofor APC poate asigura performanțe satisfăcătoare pentru a fi realizat practic (valorile admisibile sunt: **exactitate, 10% CV și limită inferioară de detecție, 1ng/ml**).

## BIBLIOGRAFIE

1. O'Neill, P.M. et al., Use of an optical biosensor to measure prostate-specific antigen in whole blood, *Sensors and Actuators*, B 29, 1995, pg. 79-83.
2. Daniels, P.B. et al., A comparison of three fluorophores for use in an optical biosensor for the measurement of prostate-specific antigen in whole blood, *Sensors and Actuators*, B 26-27 (1995), pg. 447-451.
3. Robinson, G. et al., Rapid one-step assay for prostate specific antigen in whole blood using an optical immunoassay technology, *SPIE Proceedings*, Vol. 2331, 1995.
4. Boisdé, G., Harmer, A., *Chemical and Biochemical Sensing with Optical Fibers and Waveguides*, Artech House, Boston, London, 1996.