

Universitatea "Babeș Bolyai" Cluj-Napoca

Facultatea de Fizică

Specializarea Biofizică și Fizică Medicală

Lucrare de disertație

Coordonatori științifici

CSI dr. Monica Potara

Prof. dr. Simion Aștilean

Absolvent

Moldovan Vlad Andrei

Cluj-Napoca

2024

Universitatea "Babeș Bolyai" Cluj-Napoca

Facultatea de Fizică

Specializarea Fizică Medicală

Detectția proteinei C-reactive prin metode de colorimetrie și termoplasmonică

Coordonatori științifici

CSI dr. Monica Potara

Prof. dr. Simion Aștilean

Absolvent

Moldovan Vlad Andrei

Cluj-Napoca

2024

CUPRINS

ABSTRACT

INTRODUCERE 5

I. PREZENTARE GENERALĂ 7

I.1. Rezonanța plasmonică localizată de suprafață (LSPR). Caracterizarea nanoparticulelor.

I.2. Proteina C-reactivă (CRP). Metode actuale de detecție a proteinei C-reactive (CRP).

I.3 Metode de detecție bazate pe nanoparticulele metalice. Detecția colorimetrică. Detecția termoplasmonică.

I.4 Biosenzori. Aptasenzori.

II. MATERIALE ȘI METODE 18

II.1. Substanțe chimice utilizate pentru realizarea lucrării.

II.2. Sinteza nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat (AuNPs).

II.3. Funcționalizarea AuNPs cu un aptamer cu afinitate ridicată față de CRP.

II.4. Detecția CRP utilizând metoda colorimetrică.

II.5. Detecția CRP utilizând metoda termoplasmonică.

II.6. Investigarea specificității AuNPs funcționalizate cu aptamer față de CRP.

II.7. Instrumentație.

III. REZULTATE ȘI DISCUȚII 21

III.1. Caracterizarea nanoparticulelor de aur înainte și după funcționalizarea cu aptamer.

III.2. Studiul stabilității nanoparticulelor în prezența soluției saline înainte și după funcționalizarea cu aptamer.

III.3. Testarea sensibilității nanoparticulelor de aur funcționalizate cu aptamer pentru detecția colorimetrică a CRP.

III.4. Testarea sensibilității nanoparticulelor de aur funcționalizate cu aptamer pentru detecția termoplasmonică a CRP.

III.5. Testarea selectivității nanoparticulelor de aur funcționalizate cu aptamer pentru detecția CRP.

CONCLUZII 29

BIBLIOGRAFIE 31

ABSTRACT

Human C-reactive protein (CRP) is a sensitive biomarker of inflammation and tissue damage which is associated with various diseases and pathological conditions, such as cardiovascular diseases, sepsis, viral infections, and recently was identified as an early clinical indicator of the development of coronavirus disease (COVID-19). Normal CRP levels for humans are between 8.0-10.0 mg/L, but chronic low levels of CRP ($<5\text{mg/l}$) increase the risk of development of cardiovascular diseases. Moreover, COVID-19 patients with CRP levels higher than 26.9 mg/l had elevated risks of developing into more severe cases compared with patients with lower levels of CRP. [1] Therefore rapid, reliable, high-sensitivity CRP assays are necessary to detect small variations in CRP levels in order to predict such diseases timely. Thus, a dual CRP colorimetric / thermoplasmonic assay is demonstrated using colloidal citrate-capped gold nanospheres (AuNPs) as the sensing unit and a CRP-specific aptamer as the biorecognition element. The spherical structure of the nanoparticle is revealed by the presence of one localized surface plasmon resonance (LSPR) mode in UV-Vis extinction spectrum. In the interaction of gold nanoparticles with CRP, aggregate and non-aggregate modes of nanoparticles changes, thus changing the color of the solution, making the detection of the CRP visible with the naked eye. UV-Vis spectroscopy is used to evaluate the performance of the sensing method, as the aggregation of apt-AuNPs emerge a new plasmonic band supported by aggregated NPs. The concentration of CRP is determined by monitoring the ratio between the LSPR absorption maximum of aggregated and individual NPs. Another method addressed in this study is the detection using the thermoplasmonic properties of the metallic nanoparticles. By directing a laser radiation of a wavelength close to the LSPR wavelength of the aggregated nanoparticles, the heat exchange resulted from this interaction is proportional to the aggregation rate, thus resulting an alternative method of detection based on the temperature increase of the apt-AuNPs in the presence of CRP.

This new apt-AuNPs based sensing platform brings new horizons in rapid, selective and highly sensitive detection of CRP.

INTRODUCERE

Metodele de detecție utilizate în domeniul analizelor medicale au avansat în ultimii ani, iar pandemia de COVID-19 a demonstrat nevoia urgentă de metode rapide de detecție a patogenilor sau a biomarkerilor unor boli. Detecția cât mai devreme a biomarkerilor care preced starea patologică a unor afecțiuni este un subiect de interes pentru comunitatea științifică actuală. Principalele cauze ale decesului la nivel global reprezintă bolile cardiovasculare [2], patologii care se dezvoltă în timp, și a căror efecte pot fi prevenite, oprite sau întârziate în cazul diagnosticului timpuriu. Proteina C-reactivă reprezintă un marker incipient al infecției în corp fiind asociat cu afecțiuni precum infecțiile virale, septicemie sau boli cardiovasculare. Dacă detecția acestuia se poate face prin teste rapide, la fața locului în point-of-care (POC), cuantificarea acestuia reprezintă o provocare.

Studiul de față se concentrează pe o metodă duală de detecție rapidă, eficientă, de sensibilitate mare (high sensitivity - hs) a proteinei C-reactive (CRP), prin intermediul unui biosenzor bazat pe nanoparticule de aur (AuNPs), funcționalizate cu un aptamer cu specificitate ridicată față de CRP. Metoda de detecție este duală deoarece pe de o parte se bazează pe înregistrarea “culorii” sau mai precis a spectrului UV-Vis de rezonanță plasmonică în funcție de gradul de agregare a nanoparticulelor de aur (detecția colorimetrică) și respectiv pe înregistrarea creșterii temperaturii nanoparticulelor iradiate laser odată cu agregarea acestora (termoplasmonică). Lucrarea este structurată în 3 capitole principale, și începe prin prezentarea generală a proprietăților nanoparticulelor metalice, aplicabilitatea acestora, motivând astfel alegerea de a le folosi la baza biosenzorului nostru. De asemenea, în acest capitol sunt prezentate pe larg metodele de detecție utilizate în studiu, dar și metodele actuale de detecție a CRP utilizate la scară largă. În capitolul următor sunt descrise materialele și metodele utilizate în cadrul detecției CRP. Aici sunt descrise pe larg procesul de sinteză, funcționalizare cu aptamer și detecție. Ultimul capitol se concentrează pe rezultatele obținute, demonstrând astfel acuratețea și selectivitatea biosenzorului creat. Lucrarea se încheie cu secțiunea de concluzii, unde este sumarizat întreg procesul de detecție a proteinei C-reactive.

Contribuțiile personale aduse în cadrul lucrării de față, sub îndrumarea coordonatorilor constau în sinteza nanoparticulelor, funcționalizarea acestora cu aptamer, detecția CRP, efectuarea testelor de selectivitate a biosenzorului în prezența altor elemente prezente în sângele uman și interpretarea rezultatelor.

De asemenea, studiul de față a fost validat în cadrul comunității științifice prin prezentarea acestuia în cadrul a 3 conferințe internaționale sub forma de prezentări-poster:

1. *Aptamer-modified citrate-capped gold nanoparticles for sensitive visual detection of C-reactive protein*, Vlad-Andrei Moldovan, Alexandru-Milentie Hada, Sorina Suărășan, Timea Nagy-Simon, Adriana Vulpoi, Simion Aștilean, Monica Potara, The 6th edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (**IC-ANMBES 2022**) 8–10 iunie, 2022, Brasov, Romania
2. *Colorimetric and thermoplasmonic dual-mode detection of C-reactive protein based on aptamer conjugated gold nanoparticles*, Sorina Suărășan, Alexandru-Milentie Hada, Vlad-Andrei Moldovan, Simion Aștilean, Monica Potara, The 4th International Conference on Materials: Advanced and Emerging Materials (**ICM-2022**), 19–21 Oct 2022, Barcelona, Spania
3. *Aptamer-functionalized gold nanoparticles for the highly-sensitive dual-detection of C-reactive protein*, Alexandru-Milentie Hada, Sorina Suărășan, Vlad-Andrei Moldovan, Simion Aștilean, Monica Potara, **Molecular Plasmonics 2023**, 11-13 Mai 2023, Jena, Germania

I. PREZENTARE GENERALĂ

Cupa Lycurgus reprezintă una dintre cele mai fascinante realizări artistice a vremurilor sale [3]. Notorietatea acesteia este dată de efectul de dicroism care se manifestă prin faptul că se prezintă în două culori care diferă atunci când lumina este proiectată dinspre interiorul sau exteriorul cupei (Figura I.1.) Această caracteristică este dată de proprietatea nanoparticulelor de aur și argint din pereții de sticlă a cupei de a prezenta rezonanțe plasmonice localizate. Exploatarea acestor proprietăți plasmonice în aplicații de biodetecție formează subiectul principal al studiului de față. Cu toate că sticlarii din acele timpuri nu erau conștienți de caracteristicile materialelor și proceselor prin care au creat cupa Lycurgus și alte opere asemănătoare, astăzi cunoaștem aproape în totalitate *proprietățile și caracteristicile* nanoparticulelor metalice, iar *aplicațiile* acestora sunt un subiect actual și de interes pentru comunitatea științifică.

Atunci când mărimea unei particule este redusă la câțiva nanometri, proprietățile fizico-chimice ale materialului se modifică semnificativ. Acest lucru se datorează faptului că proprietățile suprafeței devin dominante față de proprietățile intrinseci ale materialului la scară microscopică (Ex.: punctul de topire al nanoparticulelor de Au de 2.5 nm e de 300 °C, dar la scară macroscopică e 1064 °C). În cazul nanoparticulelor metalice, una din cele mai remarcabile proprietăți este apariția *plasmonilor de suprafață*. Datorită interacțiunii acestor nanoparticule cu lumina incidentă, un set de electroni liberi oscilanți, numiți plasmoni, devin dominanți și generează rezonanța plasmonică de suprafață. Această rezonanță este un fenomen și o caracteristică intrinsecă a materialelor plasmonice. În acest caz, o imagine clasică este mai folositoare pentru a descrie plasmonii de suprafață.



Figura I.1. Cupa Lycurgus iluminată din exterior (A), și din interior (B). Diferența de culoare se datorează prezenței nanoparticulelor de aur (dimensiune aprox. 70 nm). [1]

O nanoparticulă metalică poate fi descrisă ca o structură de nuclee ionice cu electroni de conducție care se mișcă aproape liber în nanoparticulă, precum putem vedea în Figura I.2. Atunci când particula este iluminată, câmpul electromagnetic al luminii induce o deplasare coerentă a electronilor de conducție localizați la suprafața nanoparticulei, motiv pentru care acești electroni au o mișcare colectivă sincronă cu unda electromagnetică și poartă denumirea plasmoni de suprafață (SP - surface plasmons).[4][5] Datorită faptului că acești electroni sunt intrinseci nanoparticulei, va apărea o sarcină negativă pe o parte a NP, și o sarcină pozitivă pe partea opusă, creând un dipol electric. Acest dipol generează un câmp electric în interiorul nanoparticulei opus cu cel al luminii, forțând astfel electronii să ajungă la poziția de echilibru. Dacă electronii sunt scoși din poziția de echilibru și câmpul este retras ulterior, electronii vor oscila cu o frecvență specifică numită frecvență de rezonanță, în cazul plasmonilor aceasta numindu-se **rezonanța plasmonică localizată de suprafață** (LSPR – Localized Surface Plasmon Resonance).

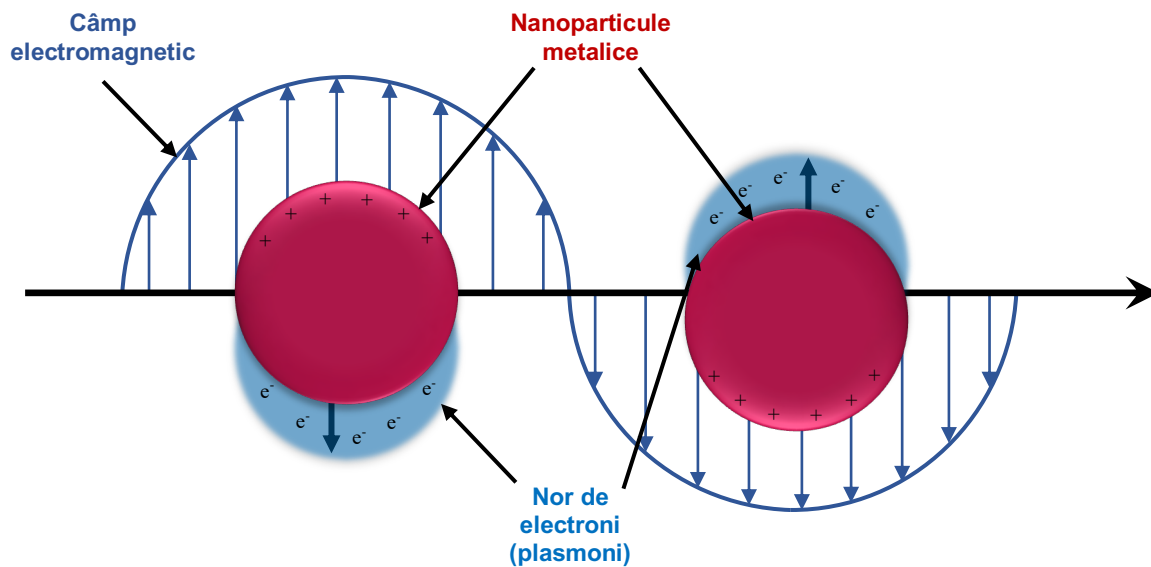


Figura I.2. Reprezentare schematică a plasmonilor de suprafață localizați, unde electronii oscilează în jurul nanoparticulei sub câmp electric.

I.1. Rezonanța plasmonică localizată de suprafață (LSPR). Caracterizarea nanoparticulelor.

Rezonanța plasmonică localizată de suprafață (LSPR) este bine cunoscută datorită frecvențelor rezonante vizibile în infra-roșu sau vizibil, studiate pentru a dezvolta tehnologii biomedicale sau

energetice noi (bioimagistică, biosenzoristică, nanochirurgie, fotocataliză și stocare de date). Pentru a obține benzi LSPR adaptabile și orientate spre aplicații, caracteristicile fizice precum *compoziția, mărimea, geometria, mediul dielectric și distanța de separare dintre nanoparticulele metalice* trebuie determinate precis, luând în considerare permitivitatea mediului înconjurător. În ciuda faptului că argintul oferă cele mai intense benzi rezonante dintre toate metalele, totuși aurul este preferat pentru aplicații biomedicale datorită naturii sale inerte și a biocompatibilității. Astfel, proprietățile nanoparticulelor sunt influențate de următoarele caracteristici:

- 1. Compoziția.** Chiar dacă nanoparticulele au aceeași dimensiune și formă, datorită compoziției diferite au rezonanță plasmonică la lungimi de undă diferite, deci și caracteristicile spectrale ale acestora sunt diferite (Figura I.2.1).
- 2. Dimensiunea.** O soluție de nanoparticule din același metal, dar de dimensiuni diferite oferă o emisie și o absorbție spectrală la lungimi de undă diferite. De aici denotă faptul că dimensiunea nanoparticulelor modifică culoarea acestora în soluție coloidală (Figura I.2.1).

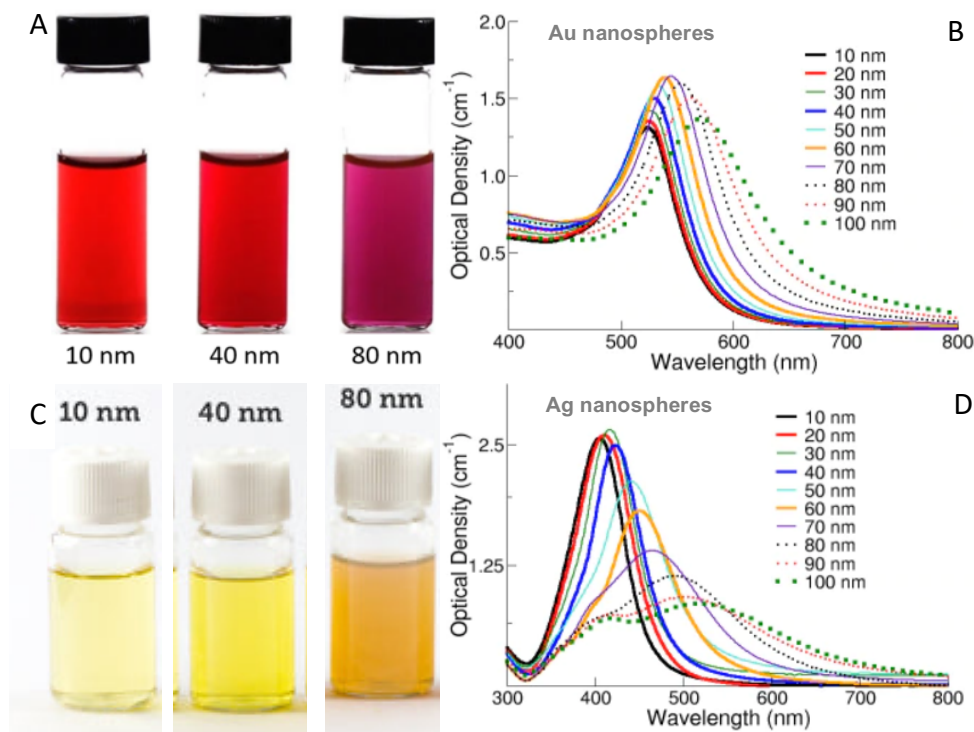


Fig. I.1.1. A) Soluții de nanosfere de Au de diferite dimensiuni [6], B) Spectrul de extincție al acestora; [7]
C) Soluții de nanosfere de Ag de diferite dimensiuni [8], D) Spectrul de extincție al acestora. [9]

În funcție de dimensiunea nanoparticulelor, interacțiunea radiației electromagnetice poate conduce la mai multă sau mai puțină radiație împrăștiată. Absorbția și împrăștierea se petrec simultan și fenomenul se numește extincție. Relevantă pentru caracterizarea nanoparticulelor metalice este capacitatea de extincție a radiației electromagnetice, aceasta reprezentând suma secțiunilor transversale de absorbție și împrăștiere. Literatura de specialitate ne spune faptul că extincția secțiunii transversale a unei nanoparticule metalice poate ajunge până la de 10 ori secțiunea ei geometrică, astfel nanoparticulele metalice putând să absoarbă și să împrăștie fotoni departe de poziția ei fizică.[5]

3. Geometria. Modul în care fenomenul LSPR apare diferă în funcție de geometria nanoparticulelor. Astfel apar 2 categorii de nanoparticule: izotrope (cu aceleași proprietăți pe toate direcțiile) și anizotrope (cu proprietăți diferite în funcție de direcție). Astfel, nanoparticulele izotrope sunt nanoparticulele sferice, iar cele anizotrope sunt cele cu forme asferice. Un exemplu este prezentat în Figura I.2.2.

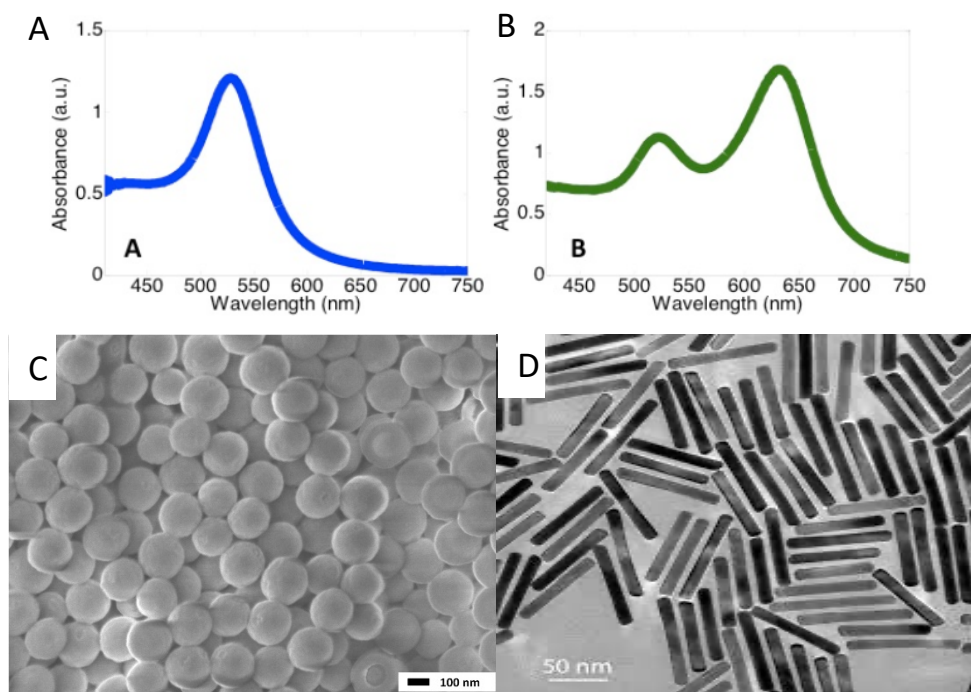


Figura. I.1.2. A) Spectrul de absorbție al unor nanosfere de Au de 50 nm, C) Imagine SEM al acestor nanosfere; B) Spectrul de absorbție al unor nanoroduri de Au de 60 nm. În cazul nanorodurilor apar 2 benzi de rezonanță corespunzând oscilațiilor longitudinale și transverse. Rezonanța derivată din banda transversală este slabă și e localizată în zona vizibilă, iar rezonanța longitudinală este puternică și este localizată în regiunea roșie-NIR fiind benefică pentru aplicații biomedicale datorită faptului că fereastra de transparență biologică e localizată în zona NIR. D) Imagine TEM al acestor nanoroduri.

- 4. Mediul dielectric.** Mediul înconjurător nanoparticulei influențează puternic rezonanța plasmonică a acestora. Rezonanța plasmonică a nanoparticulelor creează o secțiune transversală mai mare ca dimensiunea reală a nanoparticulelor, dimensiune rezultată din amplificarea câmpului electromagnetic din jurul nanoparticulei. După iradierea cu unde electromagnetice a nanoparticulei, oscilațiile electronilor liberi generează un câmp electric aproape de suprafața nanoparticulei și amplifică câmpul inițial dacă diferența de fază e relativ mică. (Figura I.2.3).
- 5. Distanța dintre nanoparticule, agregarea.** Proprietățile optice ale NP se modifică atunci când acestea agregă, iar rezonanța plasmonilor de suprafață devine delocalizată, fiind extinsă și la particule vecine. Astfel, rezonanța plasmonilor de suprafață pentru particulele izolate scade, spectrul de extincție deplasându-se spre roșu (Figura I.2.4). Astfel, proces de agregare, care poate fi indus nanoparticulelor în prezența diferitelor săruri, este o caracteristică relevantă în procesele de detecție a diversilor compuși din medii saline.

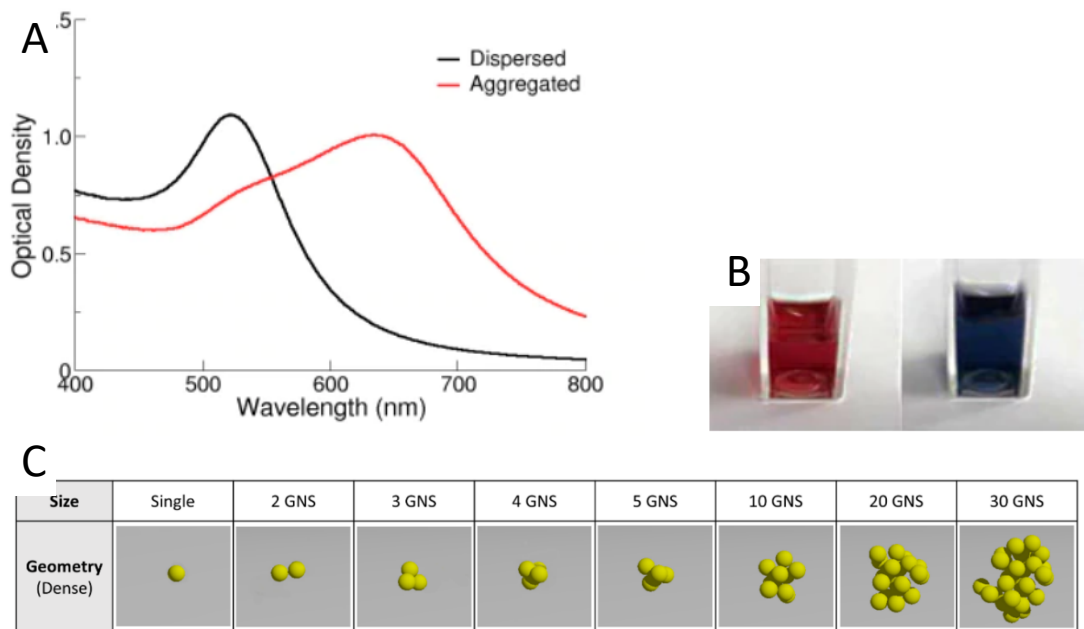


Figura I.1.3. A) Spectrul comparativ de extincție al unor NS de Au de 12 nm în stare dispersată respectiv agregată [7] B) Particulele disperse de Au au o culoare roșiatică, iar dacă acestea agregă, culoarea devine albastră și poate progresa spre transparență cu precipitate negre [7] C) Geometria unor nanosfere de Au (AuNSs) în funcție de numărul de nanoparticule agregate [10].

Proprietățile fizico-chimice și biologice a nanoparticulelor oferă posibilitatea ca acestea să fie exploatate în diverse domenii: industria alimentară, agricultură, medicină/biologie, automotive, electronică, etc.[10] De o importanță majoră este aplicabilitatea nanoparticulelor în medicină sau biologie. Câteva subdomenii unde relevanța nanoparticulelor este majoră sunt:

1. **Diagnostic** - nanoparticulele pot fi utilizate pentru a vizualiza zone specifice din organism. de exemplu, nanoparticule de oxid de fier (Fe_3O_4 NPs) au fost utilizate ca agenți de contrast în imagistica prin rezonanță magnetică nucleară pentru a observa țesuturi și organe.[11]
2. **Inginerie tisulară** (tissue engeneering) - nanoparticulele au capacitatea de a stimula reparația și creșterea țesuturilor și organelor. Un exemplu relevant sunt nanoparticulele de dioxid de titan (TiO_2 NPs) au fost exploatate datorită capacității lor de a stimula creșterea de țesut osos.[12]
3. **Transport de medicamente (drug delivery)** - datorită proprietăților optice unice ale nanoparticulelor, simplității sintezei și a stabilității chimice, acestea sunt capabile să transporte medicamente specifice în țesuturile de interes fără să fie eliberate sistemic, eificientizând tratamentul și minimizând efectele adverse ale medicamentelor în țesutul sănătos.
4. **Agenți antimicrobieni** - Unele nanoparticule precum cele de cupru sau argint dețin proprietăți antimicrobiene puternice și sunt explorate pentru a fi utilizate sub formă de pansamente sau instrumente medicale.

În particular nanoparticulele metalice oferă aplicabilități suplimentare celor prezentate mai sus, datorită caracteristicilor rezonanțelor plasmonice de suprafață (LSPR) pe care acestea le dețin.

1. **Biosenzoristică LSPR** - Nanoparticulele metalice funcționalizate cu molecule biologice specifice (anticorpi, proteine, ADN) pot detecta alte biomolecule numite analiți sau molecule ținte. Modificările LSPR cauzate de legarea biomoleculelor determină o schimbare în spectrul de absorbție, permițând detectarea foarte sensibilă a analiților.
2. **Terapie fototermală** (hipertermie) - Nanoparticulele de aur sunt utilizate în terapia fototermală, unde absorb lumina și generează căldură localizată pentru a distruge celulele tumorale. Aceasta este o aplicație bazată pe proprietățile LSPR ale nanoparticulelor metalice.

3. **Detectarea poluanților** - Nanoparticulele metalice bazate pe LSPR sunt utilizate pentru a detecta poluanți chimici în apă, aer și sol. Acești senzori pot detecta metale grele, pesticide și alte substanțe toxice la concentrații foarte mici.
4. **Detectarea markerilor de boală** - Senzorii bazați pe nanoparticule metalice pot fi utilizați pentru a detecta markeri de cancer, proteine asociate bolilor neurodegenerative și alte biomarkeri specifici bolilor. Aceasta permite diagnosticarea precoce și monitorizarea progresiei bolii.
5. **Colorimetrie** - Detecția colorimetrică cu nanoparticule metalice este o tehnică sensibilă și specifică bazată pe schimbările de culoare produse de nanoparticulele metalice atunci când interacționează cu anumiți analiți. Această metodă are aplicații extinse în biomedicină, monitorizarea mediului și chimia analitică.

În cadrul studiului de față nanoparticulele de aur (AuNPs) au fost utilizate pentru detecția și cuantificarea sensibilă a proteinei de interes , proteina C-reactivă.

I.2. Proteina C-reactivă (CRP). Metode actuale de detecție a proteinei C-reactive (CRP).

Proteina C-reactivă reprezintă un indicator clinic al inflamațiilor sau infecțiilor în țesutul uman și joacă un rol extrem de important în răspunsul inflamator al țesutului uman. [13] Cuantificarea CRP facilitează diagnosticul, prognoza și tratamentul inflamației. Valori ale CRP sub 10 $\mu\text{g/ml}$ sunt considerate normale. Valori între 10 - 40 $\mu\text{g/ml}$ apar în cadrul infecțiilor virale, 40 - 200 $\mu\text{g/ml}$ în cazul infecțiilor bacteriale, și peste 200 $\mu\text{g/ml}$ în cazul septicemiei. [14] În cazul pacienților infectați cu virusul SARS-CoV-2, valori ale CRP de peste 26,9 $\mu\text{g/ml}$ prezic cu o acuratețe mare predispoziția spre agravare a bolii virale rezultate infecției față de pacienții cu valori mai mici ale concentrației CRP [15]. Pe de altă parte, valori pe termen lung de sub 5 $\mu\text{g/ml}$ indică un risc ridicat de a dezvolta patologii cardiace, precum infarct miocardic acut, accident vascular cerebral acut sau boli coronariene [16].

La momentul actual există 2 modalități de detecție a CRP:

1. Analiza CRP standard, prin imunoturbidimetrie și nefelometrie sau prin teste rapide care utilizează principii de imunocromatografie, unde CRP interacționează cu anticorpi marcați cu fluorofori sau particule colorate, oferind un rezultat rapid. Acestea sunt limitate datorită

sensibilității scăzute, având o limită de detecție mai mare 5 $\mu\text{g/ml}$, fiind astfel incapabile să cuantizeze valori ale CRP periculoase pentru sănătatea cardiacă și a sistemului circulator.

2. Analiza ultrasenzitivă a CRP (high sensitivity CRP analysis) pentru concentrații mici, folosind metode precum testul imunosorbant legat de enzimă (ELISA), teste de chemoluminescență. Astfel de teste pot atinge limite de detecție joase, de ordinul ng / ml , dar sunt extrem de complexe, lente și necesită echipament scump, neputând fi folosite în diagnosticul point-of-care (POC).

Astfel, există nevoia unei tehnici de detecție rapidă, sensibilă și accesibilă pentru populație de a detecta valorile CRP în organism. Mai mult, dat fiind faptul că această proteină este prezentă natural în corpul uman, relevantă nu este detecția, ci cuantificarea acesteia

I.3 Metode de detecție bazate pe nanoparticulele metalice. Detecția colorimetrică. Detecția termoplasmonică.

După cum s-a putut observa în descrierea de mai sus, nanoparticulele, în special cele metalice dețin proprietăți extraordinare, motiv pentru care sunt capabile de a detecta analiți prin mai multe moduri. Aceste tehnici de detecție au aplicabilitate în special în medicină datorită biocompatibilității nanoparticulelor metalice, în special cele de aur și argint. Metodele utilizate la scară largă în detecția analiților sunt: detecția SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering), colorimetrică, bazată pe fluorescență, detecția electrochimică, termoplasmonică, etc. În cadrul acestui studiu, metodele de detecție alese au fost detecția colorimetrică și detecția termoplasmonică.

Una dintre cele mai rapide modalități de a detecta un analit este observarea cu ochiul liber a unor modificări de culoare asociate cu prezența analitului. Schimbarea culorii unei substanțe în funcție de concentrația analitului reprezintă o metodă simplă, ieftină și ușor de cuantificat și analizat chiar și de persoane nespecializate.

Detecția colorimetrică are la bază 2 metode, în funcție de geometria nanoparticulei.

1. *Agregarea.* Datorită faptului că benzile de rezonanță LSPR a suspensiilor coloidale de nanoparticule sferice de aur (AuNPs) se formează în spectrul vizibil, agregarea acestora cauzează o deplasare spre roșu a spectrului de extincție, respectiv a benzii LSPR. Prezența

analitului poate induce agregarea nanoparticulelor însoțită de modificarea culorii suspensiei coloidale, iar determinarea acestuia poate fi cuantificată prin evaluarea deplasării benzii LSPR. Metoda necesită o prealabilă calibrare a acestei deplasări în funcție de concentrația analitului.

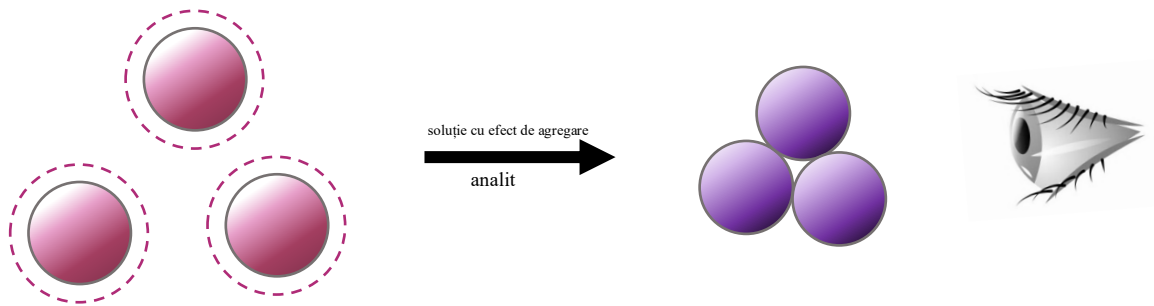


Figura 1.3.1. Reprezentare schematică a fenomenului de agregare în prezența analitului sau a unei soluții cu efect de agregare

2. *Etching*. Fenomenul de etching este prezent și în cazul nanoparticulelor izotrope, dar este observat și utilizat pe larg în cazul nanoparticulelor de formă anizotropă. Prezența analitului sau a unei soluții erozive poate induce fenomenul de etching, modificând astfel forma și dimensiunea nanoparticulelor, implicit benzile LSPR, inducând astfel modificarea culorii soluției.

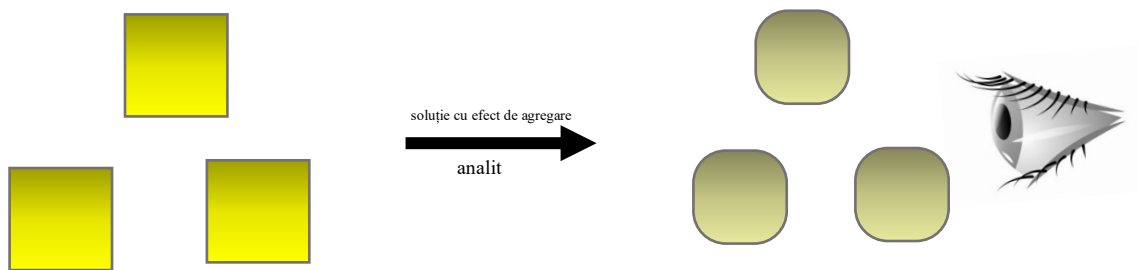


Figura 1.3.2. Reprezentare schematică a fenomenului de etching în prezența analitului sau a unei soluții cu efect de agregare

Detecția termoplasmonică exploatează capacitatea nanoparticulelor metalice de absorbi lumină (radiația laser) și a se încălzi cu atât mai mult cu cât lungimea de undă a radiației coincide cu rezonanța plasmonilor de suprafață (LSPR). Această încălzire este determinată de ciocnirile electronilor cvasiliberei de ionii rețelei cristaline a nanoparticulei și este eficientă la rezonanță. Astfel,

o radiație electromagnetică laser, cu lungimea de undă apropiată lungimii de undă a benzii LSPR, îndreptată înspre probă va încălzi proba proporțional cu concentrația nanoparticulelor agregate și a nivelului de agregare. În cazul agregării datorate prezenței analitului, coeficientul de extincție crește și proporțional va crește și temperatura. Astfel, se poate face un raport între concentrația analitului și temperatura soluției în care acesta este analizat.

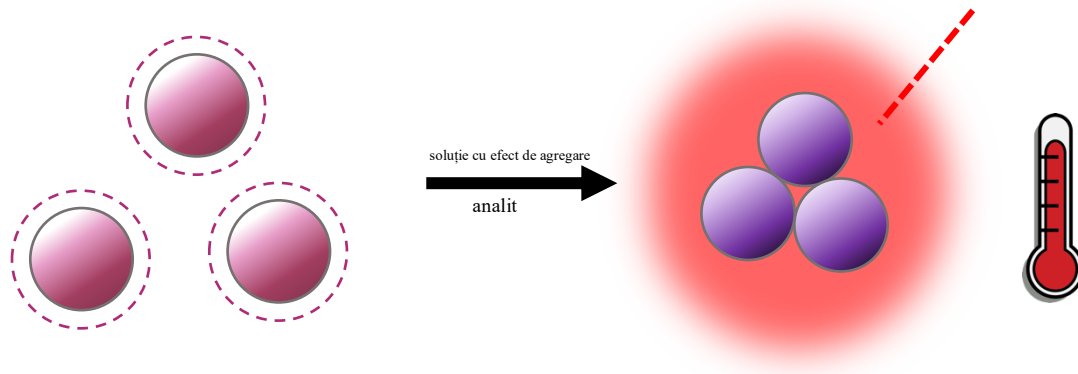


Figura 1.3.3. Reprezentare schematică a detecției termoplasmonice în prezența analitului sau a unei soluții cu efect de agregare. Temperatura soluției după iradierea laser cu lungime de undă apropiată benzii LSPR crește proporțional cu nivelul de agregare a nanoparticulelor.

I.4. Biosenzori. Aptasenzori.

Un biosenzor este un dispozitiv analitic, utilizat pentru detecția substanțelor chimice și este compus dintr-o *componentă biologică* și un *detector fizico-chimic*. Elementul biologic (țesut, microorganisme, receptori celulari, enzime, anticorpi, aptameri, etc.) este un material derivat biologic sau biomimetic care interacționează / se atașează sau recunoaște analitul. Elementul de detecție sau *transducerul*: transformă un semnal într-un alt semnal și funcționează într-un mod fizico-chimic: optic, piezoelectric, electrochimic, putând fi astfel ușor măsurat sau cuantificat. Astfel, în funcție de modul de funcționare și tipul de detecție al biosenzorului, apar mai multe tipuri de biosenzori: magnetici, termali sau calorimetrici, piezoelectrics, optici, etc [17]. Eficiența biosenzorilor este caracterizată de mai mulți factori: sensibilitate, timp de răspuns, selectivitate și liniaritate. Dintre acestea, selectivitatea unui biosenzor reprezintă una dintre cele mai mari provocări în obținerea unui

senzor exact. În cazul detecției proteinei C-reactive s-a folosit un aptamer cu specificitate ridicată pentru această proteină.

Aptamerii sunt molecule sintetice care pot fi create pentru orice fel de analit-țintă, incluzându-i pe cei nonimunogenici sau toxici. Se atașează de analitul-țintă cu o afinitate similară sau mai mare decât afinitatea anticorpilor. Sunt de 10 ori mai mici decât anticorpii și pot fi alterați chimic cu exactitate. Pot fi transportați și păstrați cu ușurință. Modul de producție al aptamerilor garantează o reproductibilitate mare a acestora. [18]

Astfel, aptasenzorii sunt biosenzori creați cu scopul de a detecta molecule specifice, având o afinitate mare pentru analitul-țintă. În cazul studiului de față s-a observat faptul că prezența aptamerilor pe suprafața nanoparticulelor oprește agregarea acestora în mediul salin.

II. MATERIALE ȘI METODE

II.1. Substanțe chimice utilizate pentru realizarea lucrării.

Hydrogen tetrachloroaurat (III) trihidrat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), trisodiu citrat tribazic dehidrat, soluție salină fosfat-buffer, Tris-HCl buffer suplimentat cu EDTA, acid ascorbic (AA), albumina serică bovină (BSA), hemoglobină, proteina C-reactivă (CRP) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich, iar aptamerul, un ADN monocatenar (ssDNA) cu secvența creată pentru CRP, *5'-CGA AGG GGA TTC GAG GGG TGA TTG CGT GCT CCA TTT GGT G-3'* (M_w 12495,2 g/mol) [19] a fost achiziționată de la Eurogenetec.

II.2. Sinteza nanoparticulelor de aur stabilizate cu citrat (AuNPs).

Sinteza nanoparticulelor coloidale de aur (AuNPs) s-a realizat prin metoda Turkevich-Frens bazată pe reducerea acidului clorauric (HAuCl_4) cu citratul de sodiu ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), urmărind o procedură preluată și adaptată din literatura de specialitate [20]. Pentru aceasta, o soluție apoasă de acid clorauric de 1 mM se încălzește până la fierbere, sub agitare. În momentul începerii fierberii se adaugă 10 mL de citrat de sodiu de concentrație 38.8 mM. Sinteza AuNPs se finalizează într-un interval de 10-15 minute de la adăugarea citratului de sodiu. Pentru a modifica dimensiunea nanoparticulelor și, implicit poziția LSPR, s-au realizat mai multe sinteze utilizându-se diferite concentrații de citrat de sodiu, toți ceilalți parametri menținându-se la fel. În urma fiecărei sinteze s-au obținut aproximativ 100 ml de suspensie coloidală care a fost centrifugată ulterior la 10.000 RPM timp de 10 min la temperatura camerei, pentru a fi purificată.

II.3. Funcționalizarea AuNPs cu un aptamer cu afinitate ridicată față de CRP.

Aptamerul *5'-CGA AGG GGA TTC GAG GGG TGA TTG CGT GCT CCA TTT GGT G-3'* cu afinitate ridicată față de CRP a fost dizolvat într-un buffer Tris-HCl cu EDTA la un pH de 7,4. Nanoparticulele de aur au fost funcționalizate cu aptamerul incubând 320 μL de suspensie coloidală

de AuNPs cu 80 μ l de aptamer de concentrație 5 μ M prin agitare cu ajutorul unui vortex orbital cu temperatură controlată, timp de 5 minute la temperatura camerei (25 °C), având astfel un raport volumic de 1:4. Stabilitatea nanoparticulelor funcționalizate cu aptamer (apt-AuNPs) a fost testată în prezența unei soluții saline și comparată cu cea a nanoparticulelelor nefuncționalizate, expuse la aceeași concentrație de sare.

II.4. Detecția CRP utilizând metoda colorimetrică.

Într-o procedură tipică de detecție a CRP, 320 μ l de suspensie coloidală de AuNPs se adaugă într-un tub Eppendorf de 1.5 ml, peste care se adaugă aptamer (80 μ l, 5 μ M) sub agitare ușoară, la temperatura camerei într-un vortex orbital cu temperatură controlată timp de 5 minute pentru a se obține apt-AuNPs. CRP diluat în PBS (1-10 μ g/ml, 50 μ l) se adaugă ulterior și este lăsat timp de 10 minute să reacționeze cu soluția. Pentru a accelera procesul de agregare se adaugă în soluție 60 μ l de NaCl (0.2M) simultan cu CRP. Pentru control s-a utilizat o suspensie coloidală expusă la un volum similar de PBS (fără CRP), toți ceilalți parametri menținându-se la fel. În primul pas, detecția s-a realizat colorimetric (vizual) urmărindu-se modificarea culorii suspensiei coloidale în funcție de concentrația de CRP. În următorul pas, s-au măsurat spectrele de extincție UV-Vis-NIR ale suspensiilor coloidale incubate cu CRP și s-a reprezentat grafic raportul dintre absorbanta nanoparticulelor agregate și cea a nanoparticulelor individuale (A_{685}/A_{523}), în funcție de concentrația de CRP. S-a obținut astfel o curbă de calibrare cu un domeniu de liniaritate care permite determinarea cantitativă a CRP și calcularea limitei de detecție.

II.5. Detecția CRP utilizând metoda termoplasmonică.

Pentru detecția termoplasmonică, suspensiile coloidale AuNPs incubate cu diferite concentrații de CRP au fost transferate în tuburi Eppendorf și iradiate timp de 10 min cu linia laser la 638 nm a unui spectrometru Raman portabil. Temperatura a fost măsurată cu o cameră cu termoviziune (Optris PI450), fiind achiziționate și imaginile termografice ale suspensiilor coloidale la intervale de 1 minut pentru a se compara modificarea temperaturii coloidului în funcție de concentrația CRP.

II.6. Investigarea specificității AuNPs funcționalizate cu aptamer față de CRP.

Pentru a investiga specificitatea aptamerului și selectivitatea acestuia față de CRP am adăugat 3 molecule prezente în sânge, acid ascorbic (AA), albumină bovină serică (BSA) și hemoglobină peste suspensia de Apt-AuNP, la o concentrație de 8 $\mu\text{l/ml}$, 50 μl . Am efectuat măsurătorile de detecție precum în cazul CRP, și raportul de agregare A_{685}/A_{523} a fost măsurat prin colectarea spectrelor de extincție UV-Vis-NIR.

II.7. Instrumentație.

Caracterizarea optică a AuNPs s-a realizat după fiecare pas (sinteză, funcționalizare cu aptamer, incubare cu diferite concentrații de CRP) prin colectarea spectrelor de extincție UV-Vis-NIR utilizând un spectrofotometru Jasco V- 730 UV-Vis (Jasco International Co., Ltd ,Tokyo, Japonia) cu o rezoluție spectrală de 1 nm. Pentru măsurători am utilizat cuve de quartz, cu drumul optic de 2 mm.

Dimensiunea hidrodinamică a nanoparticulelor a fost măsurată prin metoda de împrăștiere dinamică a luminii - dynamic light scattering (DLS), iar sarcina suprafeței nanoparticulelor cu și fără aptamer a fost obținută prin măsurători de potential zeta, ambele analize fiind efectuate utilizând un Zetasizer Nano – ZS90. Ambele măsurători s-au efectuat la o diluție de 1:3 a nanoparticulelor.

Pentru purificarea nanoparticulelor și pentru separarea acestora de supernatant am utilizat 2 centrifugi marca Hettich Mikro 220R și Mikro 22, la 10.000 RPM, folosind tuburi Eppendorf de 1.5 mL.

Pentru omogenizarea soluțiilor s-a utilizat un agitator termic marca BioSan Thermo-Shaker TS-100C.

III. REZULTATE ȘI DISCUȚII

III.1. Caracterizarea nanoparticulelor de aur înainte și după funcționalizarea cu aptamer.

Sinteza nanoparticulelor de aur utilizând metoda Turkevich-Frens a rezultat într-un set de suspensii coloidale de culoare roșu-burgund. Proprietățile optice ale AuNPs au fost investigate prin colectarea spectrelor de extincție UV-Vis-NIR. Remarcăm în Figura IV.1.A că nanoparticulele sintetizate prezintă o singură bandă plasmonică (LSPR) localizată la 517, 521 respectiv 526 nm, în funcție de concentrația de citrat de sodiu utilizată în procesul de sinteză. Cele trei clase de dispersii coloidale au fost utilizate pentru teste preliminare de stabilitate în prezența NaCl, aptamerului și a CRP, dar și pentru optimizări și ulterior pentru detecție. Astfel, s-a constatat că dispersia coloidală cu LSPR la 521 nm prezintă stabilitate optimă pentru detecția ulterioară a CRP. Aptamerul cu afinitate ridicată față de CRP (5'-CGA AGG GGA TTC GAG GGG TGA TTG CGT GCT CCA TTT GGT G-3') s-a adăugat soluției coloidale prin agitare timp de 5 minute la temperatura camerei, în raport volumic de 1:4. Atașarea acestuia de nanoparticule s-a demonstrat prin spectroscopia de absorbție UV-Vis. Remarcăm în Fig. IV.1.B că în urma funcționalizării cu aptamer, spectrul de extincție al AuNPs prezintă două benzi, și anume: (1) banda plasmonică de extincție caracteristică AuNPs și (2) o nouă bandă centrată la 254 nm atribuită absorbției aptamerului. Este important de subliniat faptul că nu apar semne de agregare în urma funcționalizării cu aptamer (răspunsul plasmonic al AuNPs se conservă). Măsurătorile DLS oferă o dovadă în plus privind adsorbția aptamerului pe suprafața AuNPs. În mod concret, în urma funcționalizării cu aptamer remarcăm o creștere a diametrului hidrodinamic de la 28 la 33 nm. De asemenea, funcționalizarea cu aptamer determină o scădere a potențialului zeta de la -60,2 mV la -56,5 mV, oferind astfel o dovadă în plus a prezenței aptamerului pe suprafața AuNPs și demonstrând stabilitatea ridicată a nanoconjugatelor obținute.

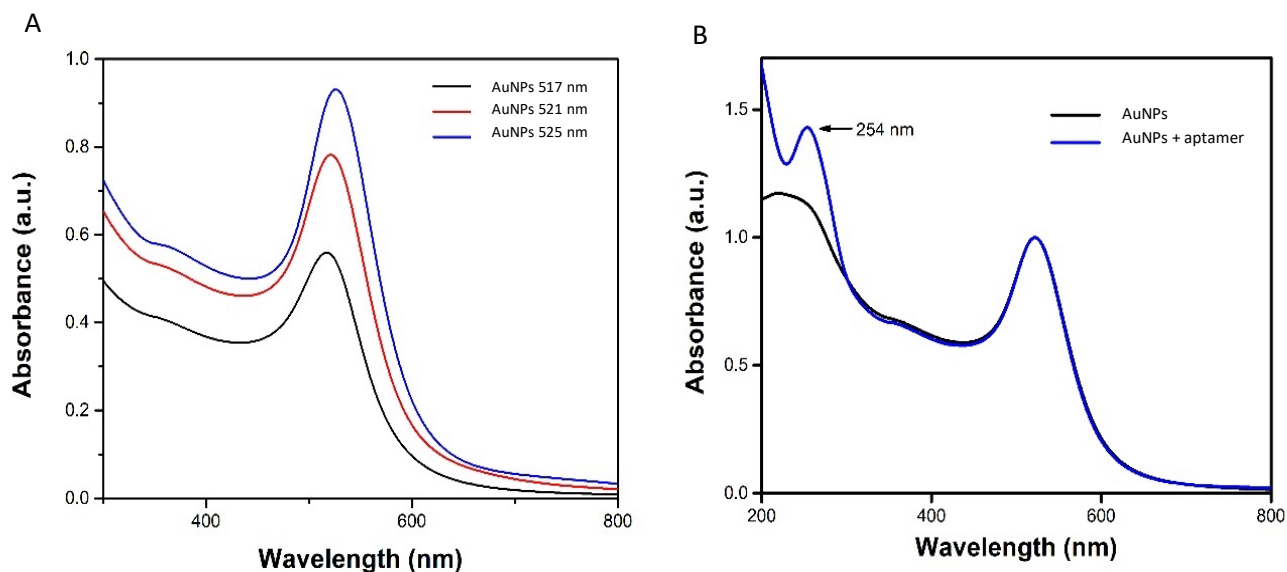


Fig III.1.1 (A) Spectrele de extincție UV-Vis-NIR a 3 sinteze diferite de nanoparticule. (B) Spectrul de extincție UV-Vis-NIR al nanoparticulelor de aur (AuNP) cu (albastru) și fără aptamer (negru).

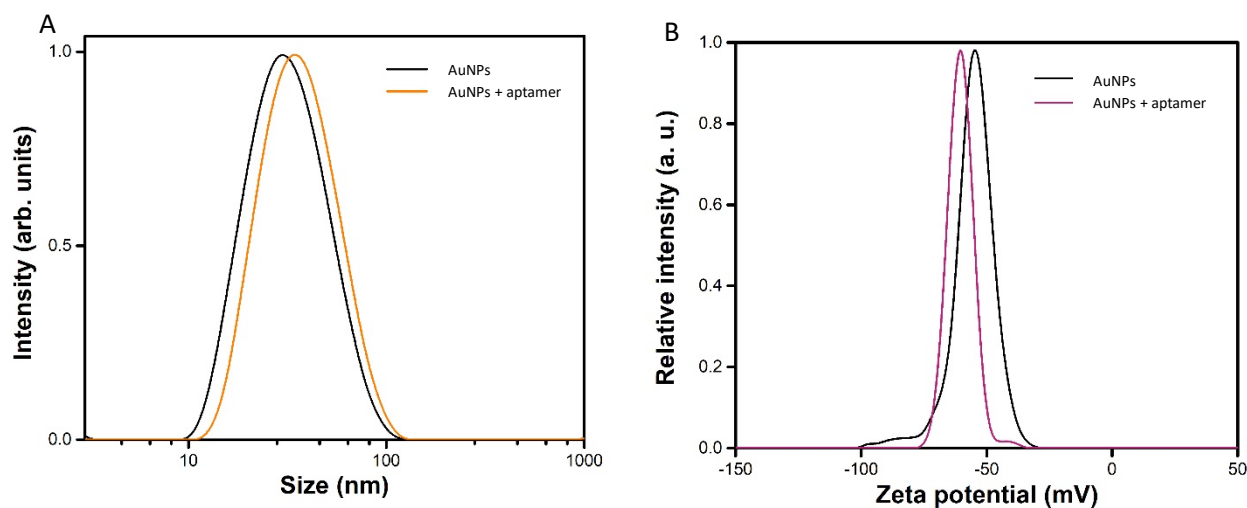


Fig. III.1.2. (A) Diametrul hidrodinamic și (B) potențialul zeta al nanoparticulelor de aur înainte și după funcționalizarea acestora cu aptamer.

III.2. Studiul stabilității nanoparticulelor în prezența soluției saline înainte și după funcționalizarea cu aptamer.

Următorul pas în realizarea lucrării a fost identificarea parametrilor optimi pentru detecția și cuantificarea CRP. Astfel, prin testele preliminare de stabilitate a nanoparticulelor am dorit să observăm rata de agregare a acestora în prezența sării (NaCl) înainte și după funcționalizarea cu

aptamer. Am ales o concentrație de NaCl similară cu cea din sânge (0.2M) și am expus suspensiile coloidale la diferite volume de sare (40-70 μ l). Se poate observa în Fig. IV.3.A agregarea nanoparticulelor fără aptamer odată cu creșterea volumului de NaCl. În urma funcționalizării cu aptamer se observă o îmbunătățire semnificativă a stabilității dispersiilor coloidale în prezența soluțiilor saline (Fig. IV.3.B,D). După stabilirea volumului optim de NaCl s-au identificat concentrația și volumul aptamerului necesare pentru detecția CRP. Acestea au fost preluate inițial din documentație, iar apoi au fost optimizate după ce valorile de NaCl au fost stabilite (Fig.IV.3.C). În urma acestor teste am identificat următorii parametri pentru detecția CRP: (1) concentrația optimă de aptamer de 2 μ M și (2) volumul optim de NaCl pentru a accelera detecția de 50 μ L.

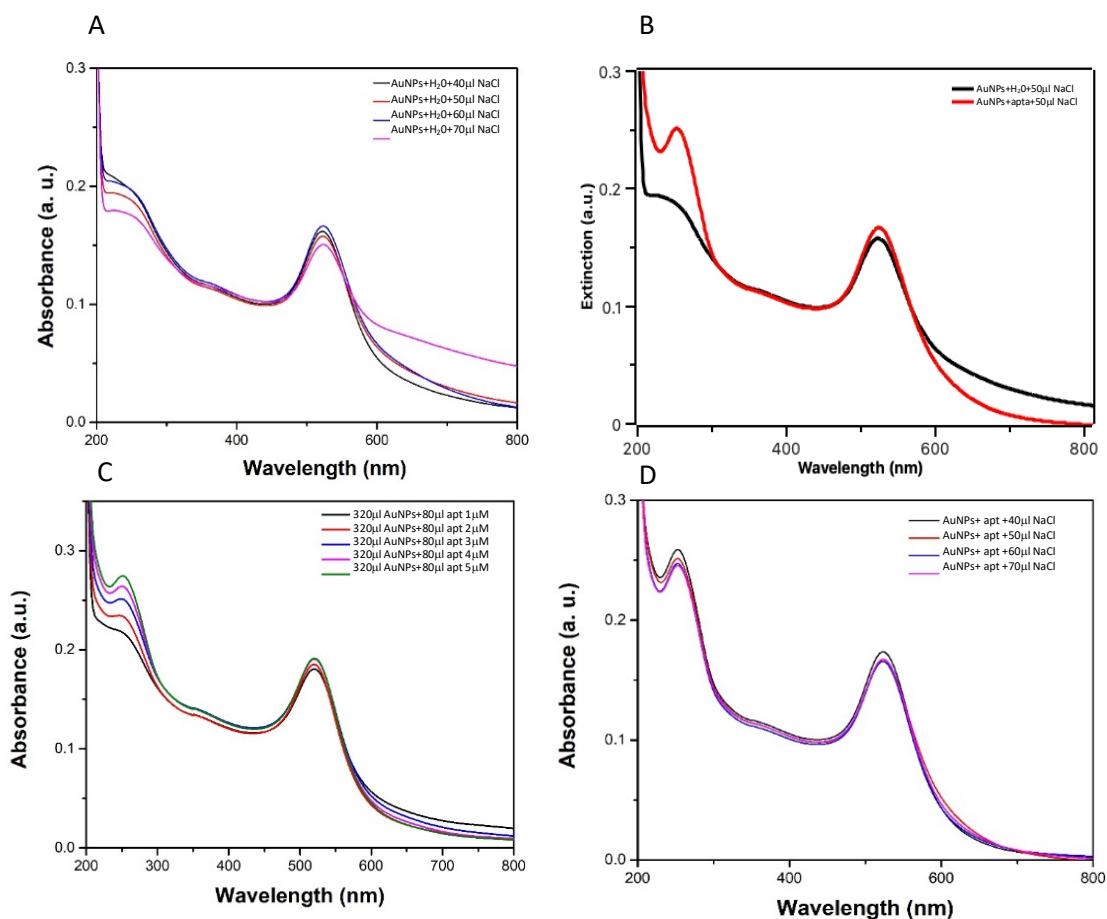


Fig. III.2.1. (A) Spectrele de extincție UV-Vis-NIR ale suspensiei coloidale de AuNPs expuse la diferite volume de NaCl de concentrație 0.2 M. (B) Spectrul de extincție UV-Vis-NIR al suspensiei coloidale de AuNPs funcționalizate cu aptamer expusă la 50 μ l NaCl de concentrație 0.2 M comparativ cu cel al suspensiei coloidale fără aptamer expusă la un volum și concentrație similare de sare. (C) Spectrele de extincție UV-Vis-NIR ale suspensiei coloidale de AuNPs funcționalizate cu diferite concentrații de aptamer și expuse la 50 μ l NaCl de concentrație 0.2 M (D) Spectrele de extincție UV-Vis-NIR ale suspensiei coloidale de AuNPs funcționalizate cu aptamer în urma expunerii la diferite volume de NaCl de concentrație 0.2 M.

III.3. Testarea sensibilității nanoparticulelor de aur funcționalizate cu aptamer pentru detecția colorimetrică a CRP.

Detecția CRP a fost efectuată utilizând AuNPs a căror sinteză a fost prezentată în capitolul anterior. Principiul acestei metode de detecție este ilustrat în Fig. IV.4. În lipsa CRP, aptamerul interacționează cu AuNPs, fiind adsorbit pe suprafața acestora. Modul de adsorbție este încă neclar, de-a lungul timpului propunându-se diverse teorii (forțele Van der Waals fără înlocuirea citratului de pe suprafața nanoparticulelor de către aptamer, efecte hidrofobice, forțele electrostatice cu înlocuirea citratului cu aptamer etc.). Rolul aptamerului atașat pe suprafața nanoparticulelor este de a le oferi stabilitate în soluții saline, împiedicând agregarea acestora în absența CRP. În momentul adăugării CRP, aptamerul se leagă de aceasta, desprinzându-se de AuNPs. Expunerea la sarea prezentă în soluție face ca nanoparticulele de aur să agrege, schimbând culoarea suspensiei coloidale în funcție de concentrația CRP, fiind astfel posibilă detecția CRP cu ochiul liber. Un alt mecanism de detecție exploatează capacitatea nanoparticulelor de aur de a converti lumina absorbită în căldură, această proprietate fiind dependentă de absorbanta soluției coloidale la lungimea de undă excitatoare. Prin măsurarea temperaturii suspensiilor coloidale expuse la diferite concentrații de CRP în urma iradierii cu un laser la 638 nm este posibilă detecția termoplasmonică a CRP.

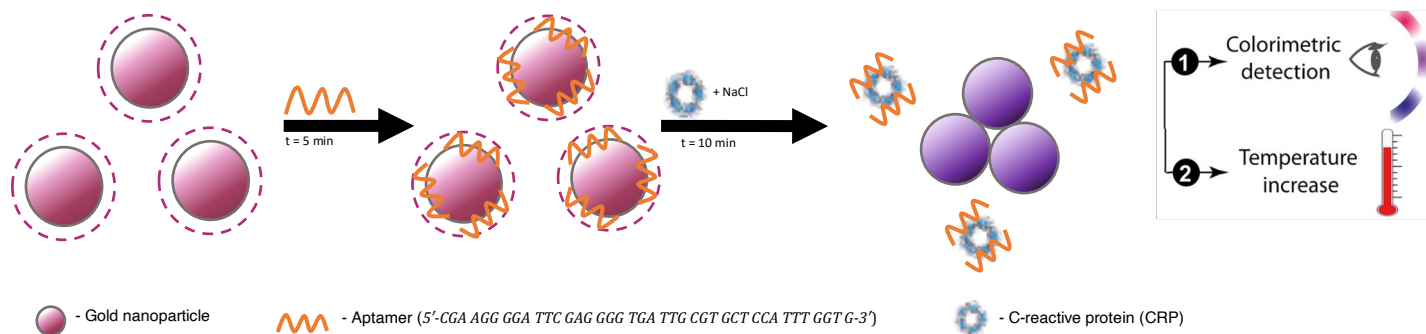


Fig. III.3.1 Reprezentarea schematică a detecției duale colorimetrica/termoplasmonica a CRP.

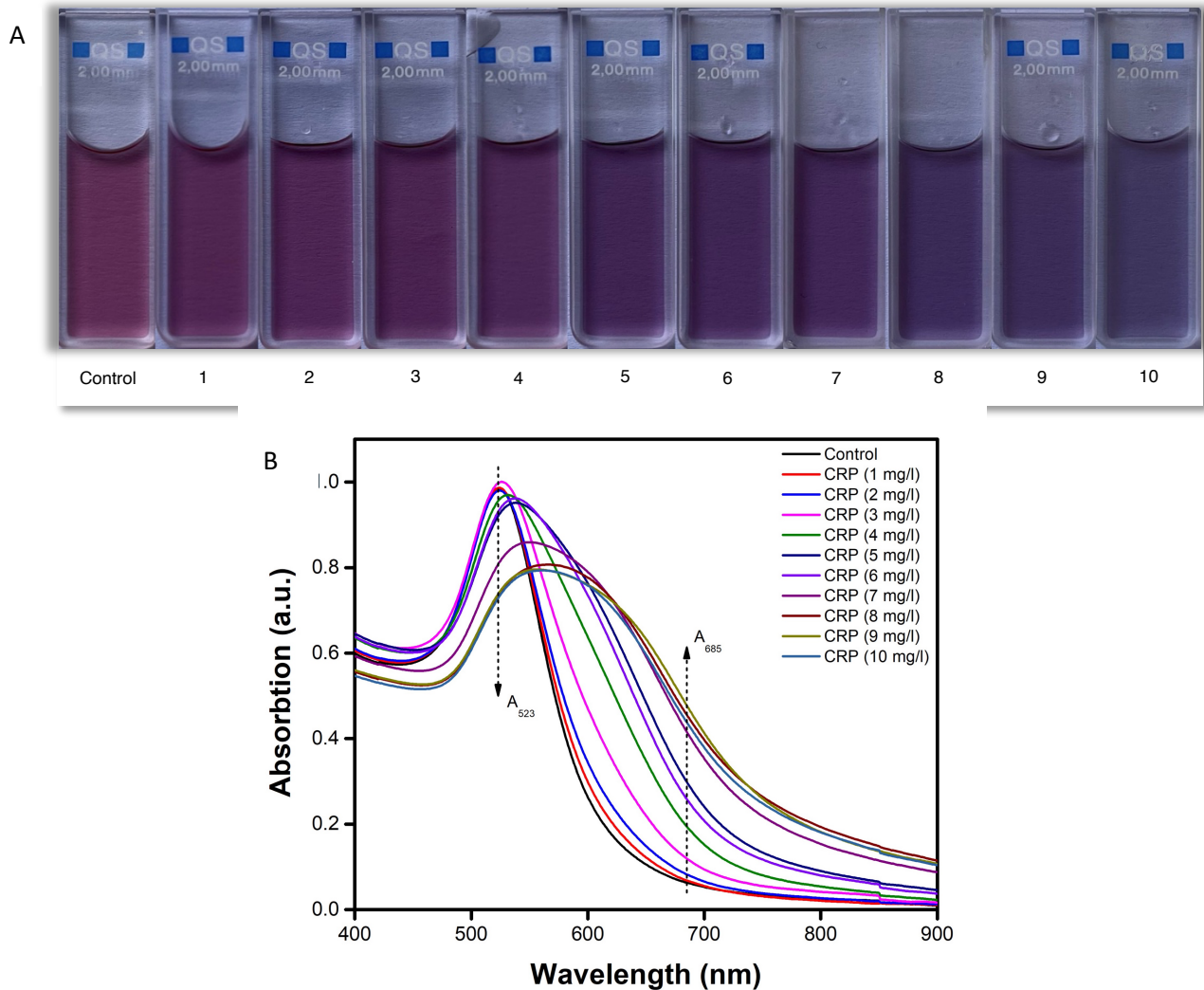


Fig. III.3.2. (A) Imaginea fotografică și (B) spectrele de extincție ale AuNPs funcționalizate cu aptamer în urma incubării cu diferite concentrații de CRP (0-10 $\mu\text{g/mL}$) în prezența unei soluții saline.

Capacitatea suspensiei coloidale de AuNPs funcționalizate cu aptamer de a detecta concentrații mici de CRP a fost investigată prin expunerea dispersiei coloidale la diferite concentrații de CRP (0-10 $\mu\text{g/mL}$) în prezența unei soluții saline. Expunerea AuNPs la diferite concentrații de CRP determină o evoluție a culorii suspensiei coloidale, de la roșu-burgund (proba control, 0 $\mu\text{g/mL}$ CRP) înspre albastru-vișiniu (Fig. IV.5). Adăugarea ulterioară de sare (NaCl), la aceeași concentrație cu cea prezentă în soluție face ca dispersia coloidală să agrege mai tare. Astfel, optimizarea concentrației aptamerului este esențială pentru a obține o rată liniară de agregare, dependentă de concentrația CRP. După optimizări, am ajuns la concentrația de aptamer de 2 μM , concentrație care stabilizează AuNPs în prezența NaCl de 0.2M, concentrație prezentă și în probele reale. Timpul de incubare al AuNPs cu

aptamerul a fost de 5 minute. Modificarea culorii suspensiei coloidale în funcție de concentrația de CRP demonstrează capacitatea AuNPs funcționalizate cu aptamer de a activa ca transductori optici ultrasenzitivi pentru detecția vizuală (colorimetrică) a CRP. Pentru cuantificarea CRP s-au colectat spectrele de extincție UV-Vis-NIR ale suspensiilor coloidale de AuNPs expuse la diferite concentrații de CRP. Remarcăm în Figura IV.5..B o scădere a absorbânței benzii plasmonice caracteristică nanoparticulelor individuale și o creștere a absorbânței în domeniul spectral 600-800 nm asociată cu nanoparticulele interconectate. Proporția dintre densitatea optică la 685 nm atribuită AuNPs agregate și densitatea optică la 523 nm atribuită AuNPs monodisperse a fost reprezentată grafic dependent de concentrația CRP, iar rezultatele sunt prezentate în Fig. IV.5. După operațiile de fitare s-a obținut un domeniu liniar de detecție între 2 și 8 $\mu\text{g/mL}$ cu un coeficient de corelare de 0.977. Limita de detecție a fost calculată cu ajutorul ecuației:

$$LOD = \frac{3.3 S_y}{S}$$

unde S_y este deviația standard a curbei de calibrare și S este panta curbei de calibrare. Astfel limita de detecție a fost calculată ca fiind 0,63 $\mu\text{g/mL}$.

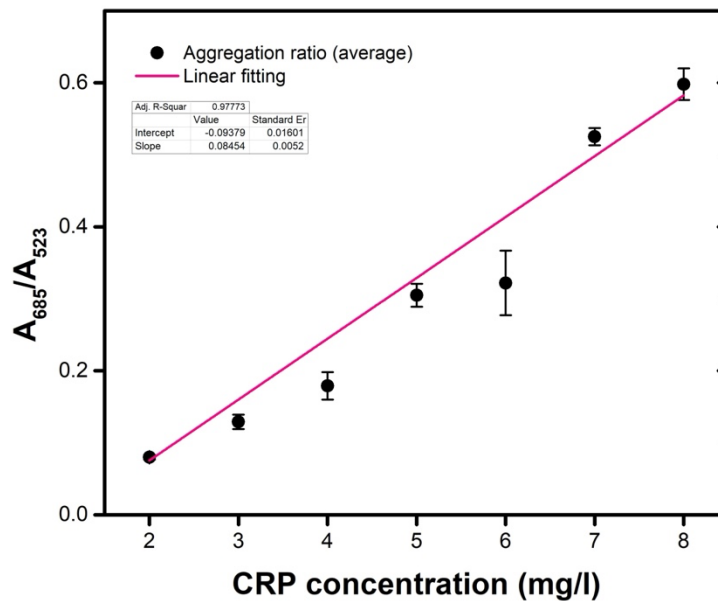


Fig. III.3.3. Reprezentarea grafică a raportului dintre absorbânța nanoparticulelor agregate (685 nm) și cea a nanoparticulelor individuale (523 nm) în funcție de concentrația de CRP.

III.4. Testarea sensibilității nanoparticulelor de aur funcționalizate cu aptamer pentru detecția termoplasmonică a CRP.

Capacitatea apt-AuNPs de a acționa ca transductori termoplasmonici ultrasenzitivi pentru detecția CRP a fost evaluată în urma iradierii timp de 10 min cu linia laser la 638 nm a unui spectrometru Raman portabil. Dinamica de încălzire a soluțiilor coloidale a fost monitorizată cu o cameră IR cu termoviziune. Creșterea absorbției soluției coloidale la 638 nm în urma agregării îmbunătățește capacitatea acestora de a converti lumina absorbită în căldură comparativ cu nanoparticulele individuale (Fig.IV.7). După 10 min de iradiere remarcăm o creștere a temperaturii cu 4.3 °C în cazul nanoparticulelor expuse la o concentrație de CRP de 7 $\mu\text{g/mL}$ și doar cu 1.9 °C în cazul probei control (fără a fi expusă la CRP). Prin reprezentarea grafică a variației temperaturii suspensiei coloidale în funcție de concentrația de CRP (Fig. IV.7) s-a obținut un domeniu liniar de detecție între 1 și 7 $\mu\text{g/mL}$ CRP. Rezultatele obținute demonstrează capacitatea apt-AuNPs de a integra mecanismele colorimetrice și termoplasmonice pentru detecția ultrasenzitivă și cuantificarea CRP. Limita de detecție (LOD) obținută prin metoda termoplasmonică este de 1.66 $\mu\text{g/mL}$.

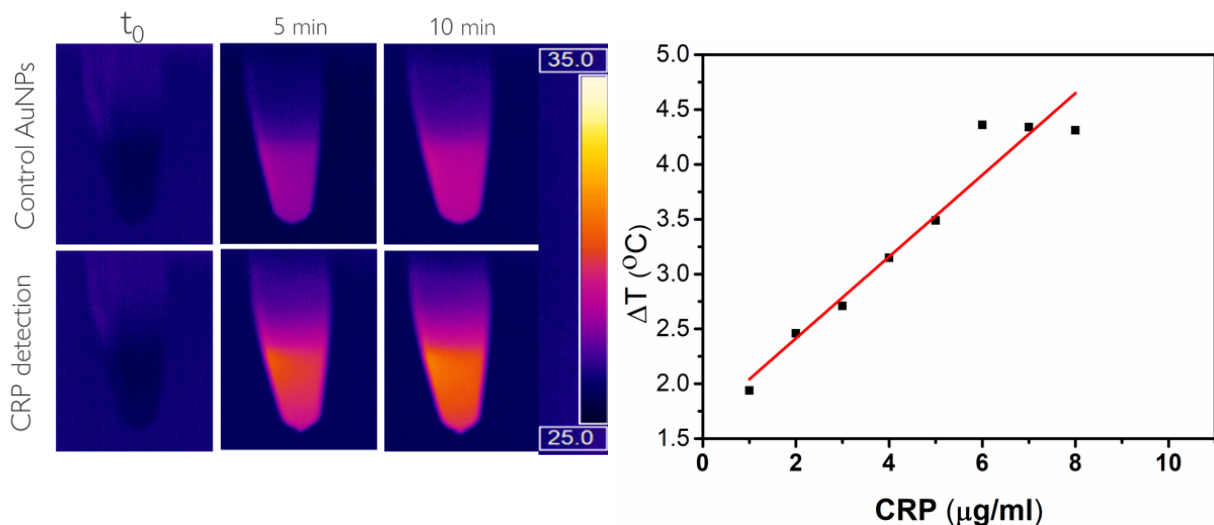


Fig. III.4.1. (A) Imaginile termografice ale AuNPs funcționalizate cu aptamer pentru proba control (0 $\mu\text{g/mL}$ CRP) și proba expusă la cea mai mare concentrație de CRP (8 $\mu\text{g/mL}$) în urma iradierii cu o linie laser la 638 nm pentru 0, 5 și 10 min (B) Reprezentarea grafică a variației temperaturii suspensiei coloidale în funcție de concentrația de CRP.

III.5. Testarea selectivității nanoparticulelor de aur funcționalizate cu aptamer pentru detecția CRP.

Ulterior, pentru a verifica selectivitatea acestui biosenzor, diverși compuși care se află în sânge, precum CRP, Acid ascorbic, bovine-albumine serum, hemoglobină au fost incubati cu suspensia coloidală apt-AuNPs la o concentrație de 8 mg/l în prezența NaCl. Ca și control s-a folosit o probă cu PBS incubată în același mod. Imaginile fotografice din Fig. IV.6.A demonstrează afinitatea puternică a biosenzorului apt-AuNPs față de CRP, comparativ cu ceilalți compuși. Graficul din Fig. IV.6.B demonstrează cu ajutorul spectroscopiei UV-Vis specificitatea apt-AuNPs față de CRP.

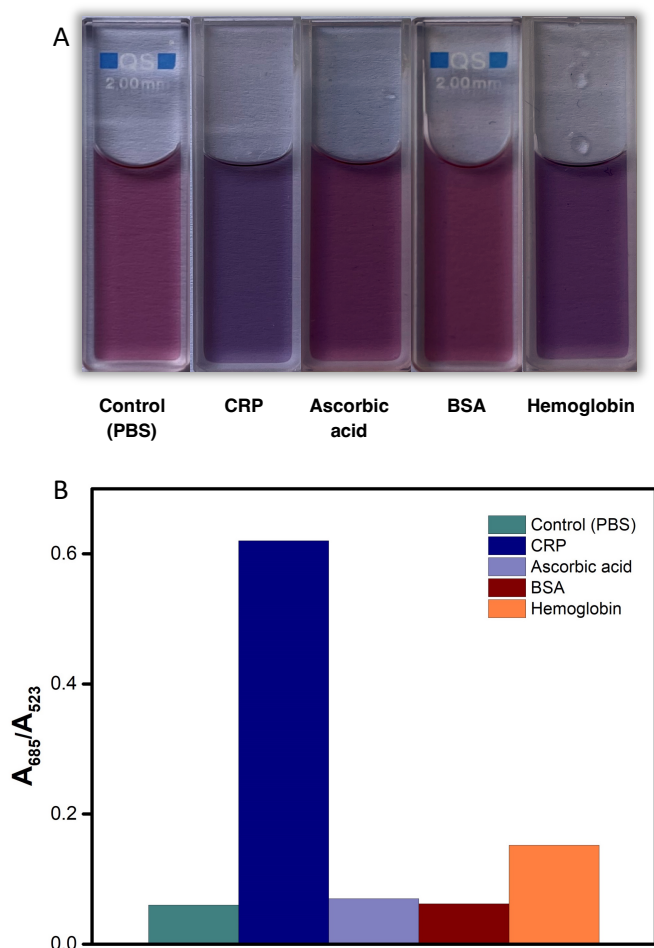


Fig. III.5.1. (A) Imaginea fotografică a apta AuNPs incubate cu CRP, acid ascorbic, albumină bovină serică sau hemoglobină de concentrație 8 mg/l în prezența unei soluții saline comparativ cu proba control (fără CRP). (B) Testul de selectivitate a apta AuNPs în detecția colorimetrică a CRP realizat prin reprezentarea grafică a raportului dintre absorbanta nanoparticulelor agregate (685 nm) și cea a nanoparticulelor individuale (523 nm).

CONCLUZII

În cadrul acestei lucrări de disertație a fost realizat un biosenzor specific pentru detecția cantitativă a proteinei C-reactive (CRP). Biosenzorul, bazat pe nanoparticule sferice de aur (AuNPs) funcționalizate cu aptamer, a fost realizat parcurgând următorii pași: (1) sinteza suspensiilor coloidale de AuNPs urmărind protocolul descris de Turkevich-Frens; (2) funcționalizarea AuNPs cu un aptamer cu afinitate ridicată față de CRP; (3) caracterizarea AuNPs înainte și după funcționalizarea cu aptamer prin spectroscopia de absorbție UV-Vis-NIR, măsurători de împrăștiere dinamică a luminii (DLS) și potențial zeta; (4) testarea stabilității AuNPs înainte și după funcționalizarea cu aptamer prin expunerea acestora la o soluție salină și colectarea spectrelor de extincție UV-Vis-NIR. Am constatat că nanoparticulele astfel funcționalizate (apt-AuNPs) au rezistat agregării în mediu salin, fapt datorat protecției oferite de aptamer. Detecția CRP a fost efectuată folosind 2 metode, și anume: (1) metoda colorimetrică bazată pe proprietatea suspensiilor coloidale de nanoparticule metalice de a agrega în soluții saline, fenomen însoțit de modificarea culorii soluției coloidale, detecția fiind realizată cu ochiul liber. Întrucât agregarea suspensiilor a condus la modificarea proprietăților plasmonice a AuNPs, detecția și cuantificarea CRP s-a realizat și prin colectarea spectrelor de extincție UV-Vis-NIR. (2) metoda termoplasmonică, bazată pe capacitatea nanoparticulelor de a converti lumina absorbită în căldură, această proprietate fiind dependentă de absorbanta soluției coloidale la lungimea de undă excitatoare. În procesul de detecție, aptamerul cu afinitate față de CRP se desprinde de pe nanoparticule, atașându-se de CRP, și lăsând astfel AuNPs să agreghe în prezența sării. Rata de agregare este direct proporțională cu concentrația de CRP prezentă în soluție, astfel prin ambele metode rezultă curbe de calibrare cu domenii de liniaritate asemănătoare. Detecția colorimetrică s-a dovedit a avea o sensibilitate mai mare, ajungând până la o limită de detecție de 0,63 $\mu\text{g/mL}$. Specificitatea biosenzorului față de CRP s-a confirmat prin adăugarea de diverse molecule care se află în sânge, precum CRP, acid ascorbic, albumină bovină serică, hemoglobină, urmând același proces de detecție cu cel al CRP. Acest test a dovedit afinitatea biosenzorului față de CRP, rezultatele obținute pentru celelalte molecule fiind similare cu cele ale probei de control. Astfel, acest biosenzor reprezintă o alternativă ultrasensibilă, rapidă, ieftină și cu posibilitatea de a fi produs la scară largă și comercializat, având un prospect bun în îmbunătățirea detecției proteinei C-reactive, aducând astfel un aport pozitiv în detecția timpurie și prevenirea patologiei cardiovasculare, dar și a infecțiilor cu prognoză proastă la pacienții afectați de patologii care afectează concentrația CRP.

Mulțumiri

În cele din urmă aduc mulțumiri doamnei cercetător Monica Potara pentru ghidajul primit în pregătirea acestei lucrări de disertație, atât în partea experimentală cât și în cea teoretică. De asemenea, mulțumesc domnului profesor coordonator Simion Aștilean pentru oportunitatea de a face cercetare în cadrul grupului coordonat de dânsul. Mulțumesc colegilor Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe, și colegilor centrului de Nanobiofotonică pentru ajutorul în înțelegerea și aplicarea conceptelor complexe ale nanotehnologiei, metodelor de detecție și analiză a elementelor micro și nanoscopice, tehnici de interpretare a datelor și nu în ultimul rând, pentru oportunitatea de a lucra cu cercetători pasionați și talentați.

Această lucrare a fost susținută de un grant al Ministerului Cercetării, Inovării și Digitalizării, CNCS/CCCDI – UEFISCDI, numărul de proiect PN-III-P4-ID-PCE-2020-1592, în cadrul PNCDI III.

BIBLIOGRAFIE

- [1] T. Nagy-Simon, A.-M. Hada, S. Suarasan, and M. Potara, “Recent advances on the development of plasmon-assisted biosensors for detection of C-reactive protein,” *Journal of Molecular Structure*, vol. 1246, p. 131178, Dec. 2021.
- [2] S. Dattani, F. Spooner, H. Ritchie, and M. Roser, “Causes of Death,” *Our World in Data*, Dec. 2023, Accessed: Jun. 15, 2024. [Online]. Available: <https://ourworldindata.org/causes-of-death>
- [3] “Lycurgus Cup - an overview | ScienceDirect Topics.” Accessed: Jun. 15, 2024. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/lycurgus-cup>
- [4] “Surface Plasmon - an overview | ScienceDirect Topics.” Accessed: Jun. 15, 2024. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/materials-science/surface-plasmon>
- [5] M. A. Garcia, “Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications,” *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 44, no. 28, p. 283001, Jun. 2011.
- [6] “Gold Colloid.” Accessed: Jun. 15, 2024. [Online]. Available: <https://www.fortislife.com/products/articles/gold-colloid/gold-colloid>
- [7] “Gold Nanoparticles: Optical Properties,” nanoComposix. Accessed: Jun. 15, 2024. [Online]. Available: <https://nanocomposix.com/pages/gold-nanoparticles-optical-properties>
- [8] “PELCO® NanoXact and BioPure Silver Colloids - Nanoparticles.” Accessed: Jun. 15, 2024. [Online]. Available: https://www.tedpella.com/gold_html/NanoXact-silver.aspx
- [9] “Fig.4 Absorption spectra of different size silver nanoparticles...,” ResearchGate. Accessed: Jun. 15, 2024. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/figure/Absorption-spectra-of-different-size-silver-nanoparticles_fig2_259463874
- [10] K. A. Altammar, “A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges,” *Front. Microbiol.*, vol. 14, Apr. 2023.

- [11] J. U. Menon, P. Jadeja, P. Tambe, K. Vu, B. Yuan, and K. T. Nguyen, “Nanomaterials for Photo-Based Diagnostic and Therapeutic Applications,” *Theranostics*, vol. 3, no. 3, pp. 152–166, Feb. 2013.
- [12] J.-H. Kim *et al.*, “3D silk fibroin scaffold incorporating titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle (NPs) for tissue engineering,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 68, pp. 158–168, Jul. 2014.
- [13] N. R. Sproston and J. J. Ashworth, “Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection,” *Front. Immunol.*, vol. 9, Apr. 2018.
- [14] B. Clyne and J. S. Olshaker, “The C-reactive protein,” *J Emerg Med*, vol. 17, no. 6, pp. 1019–1025, 1999.
- [15] T. Nagy-Simon, A.-M. Hada, S. Suarasan, and M. Potara, “Recent advances on the development of plasmon-assisted biosensors for detection of C-reactive protein,” *J Mol Struct*, vol. 1246, p. 131178, Dec. 2021.
- [16] T. A. Pearson *et al.*, “Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association,” *Circulation*, vol. 107, no. 3, pp. 499–511, Jan. 2003.
- [17] P. Mehrotra, “Biosensors and their applications – A review,” *J Oral Biol Craniofac Res*, vol. 6, no. 2, pp. 153–159, 2016.
- [18] “Aptamers vs antibodies I Key advantages of aptamers | Novaptech.” Accessed: May 24, 2024. [Online]. Available: <https://novaptech.com/aptamers-vs-antibodies-advantages>
- [19] B. Wu *et al.*, “Detection of C-reactive protein using nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance using an aptamer-antibody sandwich assay,” *Chem. Commun.*, vol. 52, no. 17, pp. 3568–3571, Feb. 2016.
- [20] M. António, R. Ferreira, R. Vitorino, and A. L. Daniel-da-Silva, “A simple aptamer-based colorimetric assay for rapid detection of C-reactive protein using gold nanoparticles,” *Talanta*, vol. 214, p. 120868, Jul. 2020.

DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE

Subsemnatul, Moldovan Vlad Andrei, declar că Lucrarea de disertație pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de Fizică, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea 2023-2024 , sub îndrumarea Prof. dr. Simion Aștilean, CS1 dr. Monica Potara, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării.

Prezenta declarație este parte a lucrării și se anexează la aceasta.

Data,

19.06.2024

Nume,

Moldovan Vlad Andrei

Semnătură

