

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**BIOSENZORI DE AFINITATE PENTRU
APLICAȚII ÎN CONTROLUL DOPING**

Doctorand:

George - Mădălin DĂNILĂ

Conducător de doctorat:

Prof. Dr. Camelia BALA

Comisia de doctorat:

Președinte: Prof. dr. Andrei-Valentin Medvedovici

Conducător de doctorat: Prof. dr. Camelia BALA

Referenți oficiali:

1. Prof. dr. Ion Ion, Universitatea *POLITEHNICA* București
2. CS I habil. dr. Gheorghiu Eugen, Centrul Internațional de Biodinamică, București
3. Conf. habil. dr. Gligor Delia Maria, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

2022

Cuprins

1	STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	12
1.1	Principalele clase de substanțe utilizate pentru creșterea performanței sportive	12
1.2	Grelina – hormonul “foamei”. Interacția cu receptorul secretagog al hormonului de creștere	13
1.2.1	Compuși mimetici ai grelinei	17
1.2.2	Agoniști, antagoniști și invers agoniști. Mecanisme de acțiune.....	18
1.3	Canabinoizii	22
1.3.1	Căi de metabolizare	23
1.3.2	Interacția cu receptori specifici. Modularea alosterică	25
1.4	Metode de detecție pentru liganzi extracelulari ai receptorului secretagog al hormonului de creștere	27
1.4.1	Agoniști	27
1.4.2	Antagoniști și invers agoniști	28
1.4.3	Modulatori alosterici – Canabinoizi	29
 CONTRIBUȚII ORIGINALE		
2	DETECȚIA ANTAGONIȘTILOR RECEPTORULUI SECRETAGOG AL HORMONULUI DE CREȘTERE PE BAZA PROFILELOR DE AFINITATE	32
2.1	Reactivi și aparatură	34
2.2	Optimizarea parametrilor etapelor de lucru	35
2.3	Rezultate și discuții	40
2.3.1	Curba de calibrare a receptorului pentru grelină.....	40
2.3.2	Curba de legare a grelinei la receptor.....	41
2.3.3	Profile de afinitate ale antagoniștilor	43
2.3.4	Analiza de afinitate și modelarea legării la receptor	44
2.4	Concluzii	50
3	DETECȚIA AGONIȘTILOR ȘI INVERS AGONIȘTILOR RECEPTORULUI SECRETAGOG AL HORMONULUI DE CREȘTERE PE BAZA PROFILELOR DE AFINITATE	51
3.1	Reactivi și aparatură	52
3.2	Imobilizarea receptorului și detecția analiților	54
3.3	Rezultate și discuții	55
3.3.1	Profilele de afinitate ale agoniștilor grelinei	56
3.3.2	Profilele de afinitate ale invers agoniștilor grelinei	59
3.4	Concluzii	62
4	DETECȚIA MODULATORILOR ALOSTERICI DE TIPUL CANABINOIZILOR NATURALI PE BAZA PROFILELOR DE AFINITATE	63

4.1	Reactivi și aparatură	64
4.2	Detecția analiților pe baza protocolului de afinitate.....	66
4.3	Rezultate și discuții	67
4.3.1	Efectul modulator al canabinoizilor	67
4.3.2	Profile de afinitate ale modulatorilor alosterici.....	68
4.3.3	Validarea metodei bazate pe profilele de afinitate prin comparare cu metoda gaz cromatografică cuplată cu spectrometria de masă în tandem.....	74
4.4	Concluzii	80
5	IMPLEMENTAREA PERECHII DE AFINITATE RECEPTOR / AGONIST PE SUPORT PEPTIDIC DE TIP “ FIR MOLECULAR” PENTRU DETECȚIA ELECTROCHIMICĂ A COMPUȘILOR CU IMPORTANȚĂ ÎN CONTROLUL DOPING	82
5.1	Reactivi și aparatură	83
5.2	Principiul de realizare a senzorului	84
5.3	Studiile de dicroism circular și microscopie de forță atomică	88
5.4	Experimente de afinitate.....	89
5.5	Rezultate și discuții	89
5.5.1	Designul peptidei suport.....	89
5.5.2	Optimizarea procedurilor de pre-tratare electrochimică	91
5.5.3	Caracterizarea electrochimică a stratului peptidic	92
5.5.4	Estimarea parametrilor cinetici ai transferului de electroni	94
5.5.5	Stabilitatea stratului peptidic marcat redox	102
5.5.6	Caracterizarea suprafeței biosenzorului	103
5.5.7	Detecția receptorului secretatog al hormonului de creștere	106
5.5.8	Studii de reproductibilitate, specificitate și selectivitate	108
5.6	Concluzii	111
6	CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE.....	112
7	LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ÎN DOMENIUL TEZEI DE DOCTORAT	115
8	BIBLIOGRAFIE	117

Numerotarea figurilor, tabelor și a trimiterilor bibliografice este cea din teza de doctorat

INTRODUCERE

Scopul principal al tezei de doctorat l-a reprezentat dezvoltarea unor metode imunoanalitice și electrochimice pentru detecția mimeticilor grelinei. În acest context, studiile de cercetare realizate pe întreaga durată a stagiului doctoral s-au concentrat pe dezvoltarea unor formate de analiză care să permită detecția rapidă acestor analiți (metode de tip "screening", cu răspuns rapid care să indice prezența/absența compusului dopant, similar aplicațiilor din sistemele de testare lângă pacient (point-of-care test/POCT). De asemenea, s-a urmărit studierea interacției dintre mimeticii grelinei și receptorul secretagog, acesta acționând ca biomoleculă de recunoaștere, deoarece până în prezent nu s-au raportat anticorpi specifici pentru mimeticii studiați, ci doar pentru receptorul secretagog și grelină.

Teza de doctorat cuprinde 5 capitole organizate în două părți: o parte teoretică (capitolul 1) și partea care conține contribuțiile originale (capitole numerotate de la 2 la 5).

Partea teoretică, distribuită de-a lungul a 4 sub-capitole, prezintă stadiul actual al cunoașterii în domeniul principalelor clase de substanțe interzise de către Agenția Mondială Anti-Doping în sport, cu accent asupra clasei de compuși și factori de creștere din care fac parte grelina, ligandul endogen al receptorului secretagog al hormonului de creștere, alături de mimeticii acesteia.

Contribuțiile originale, prezentate de-a lungul a 4 capitole, cuprind rezultatele experimentale și interpretarea acestora, fiind structurate în funcție de clasa de compuși studiați. Astfel, în capitolul 2 este abordată detecția antagoniștilor receptorului secretagog (denumiri generice D-Lys³-GHRP-6, YIL-781 și L-692,585) pe baza profilelor de afinitate în urma experimentelor competitive efectuate în prezența receptorului GHSR-1a.

În capitolul 3, sunt tratați agoniștii (CJC-1295-DAC) și invers agoniștii (D-Arg¹, D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹]-Substanța P) receptorului GHSR-1a pe baza modelului de legare la receptor, în experimentele competitive cu grelina marcată cu peroxidază.

În capitolul 4, pornind de la formatul de detecție al mimeticilor grelinei (prezentat pe parcursul capitolelor 2 și 3), dar și cu ajutorul unui model cinetic al interacției mimetic /receptor s-au studiat și raportat, pentru prima dată în literatură, efectele de modulare alosterică, exercitate de canabinoizii naturali de tipul canabidiolului și al metabolitului principal al tetrahidrocanabinolului, carboxi-THC, prin interacția cu receptorul GHSR-1a.

Ultimul capitol, capitolul 5, prezintă etapele de realizare și caracterizare a unui biosenzor modular peptidic pentru detecția receptorului GHSR-1a luând în considerare legarea specifică la agonistul peptidic CJC-1295-DAC. Biosenzorul a fost caracterizat prin tehnici voltametrice (voltametrie ciclică, cu undă pătrată, în curent alternativ și spectroscopie de impedanță

electrochimică), prin tehnici de investigare a suprafeței (microscopia de forță atomică), precum și prin analiza de dicroism circular a secvențelor peptidice depuse pe suprafață, și prezintă un caracter de noutate în domeniul biosenzorilor, atât prin construcția modulară a senzorului peptidic, cât și prin utilizarea perechii analit – receptor transmembranar cuplat cu proteina G, primul sistem de acest tip studiat, prin metode electrochimice.

CONTRIBUȚII ORIGINALE

Capitolul 2 - Detecția antagoniștilor receptorului GHSR-1a

În acest capitol sunt descrise modul de realizare al formatului de analiză competitiv și analiza profilelor de afinitate obținute în experimente competitive între antagoniști și grelina marcată cu peroxidază pentru situsurile de legare ale receptorului GHSR-1a. Pentru studierea profilelor de afinitate ale antagoniștilor în urma interacției cu receptorul secretagog al hormonului de creștere s-au ales 3 antagoniști: 1 antagonist peptidic reprezentat de [D-Lys³]-GHRP-6 și 2 cu structură non-peptidică: YIL-781 și L-692,585 (Figura 2-1).

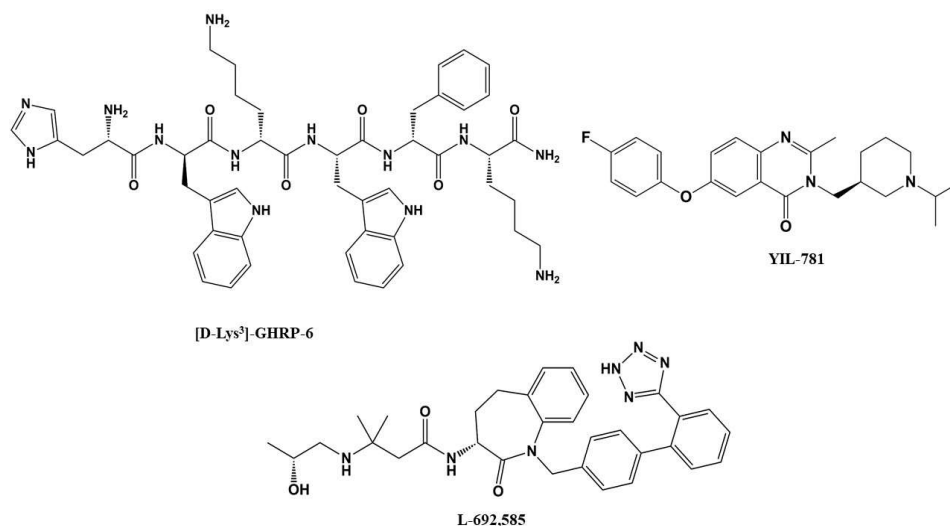


Figura 2-1 Structurile chimice ale celor 3 antagoniști ai grelinei selectați pentru formatul de analiză dezvoltat

Optimizarea etapelor de lucru

Optimizarea etapei de legare a streptavidinei de suprafață

Legarea streptavidinei este favorizată de un pH slab acid al soluției tampon, astfel că pentru experimentele de competiție s-a utilizat streptavidină de concentrație 2,5 μg/mL preparată în soluție tampon acid citric / acetat de sodiu 0,05 M, pH 5,0.

Optimizarea etapelor de blocare

Blocarea s-a realizat în 3 etape succesive, fiecare de câte 10 minute, cu biotină și streptavidină de concentrație 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Rezultatele sunt prezentate în Figura 2-3.

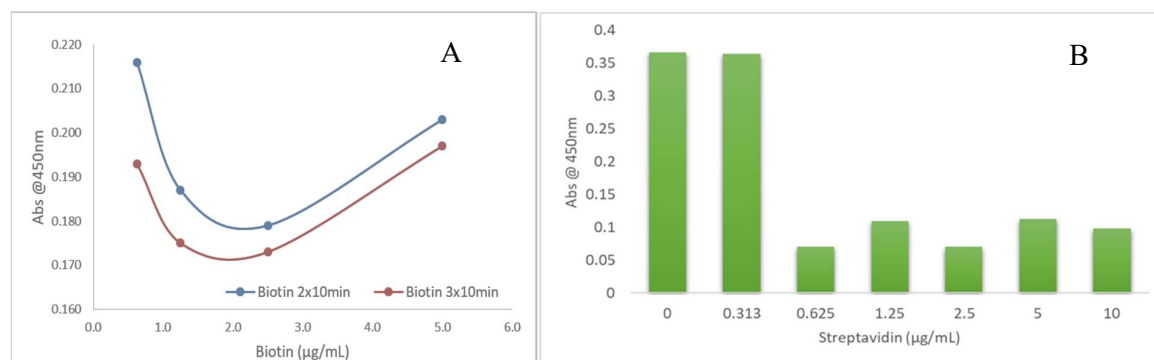


Figura 2-3 (A) Blocarea situsurilor libere ale streptavidinei de suprafață cu biotină liberă. S-au testat două moduri de blocare: 2 etape de câte 10 minute și 3 etape de câte 10 minute la temperatura camerei; **(B)** Blocarea anticorpului biotinilat cu concentrații diferite de streptavidină liberă. Blocarea s-a realizat în două etape de câte 10 minute la temperatura camerei.

Curba de calibrare a receptorului pentru grelină

Curba de calibrare a receptorului GHSR-1a s-a trasat pentru domeniul cuprins între 0,3 – 20 ng/mL . S-a observat că pentru o probă de concentrație 10 ng/mL de receptor recombinant s-a obținut o absorbantă corespunzătoare unei concentrații de doar 0,1 ng/mL de receptor în formă activă (doar 1%).

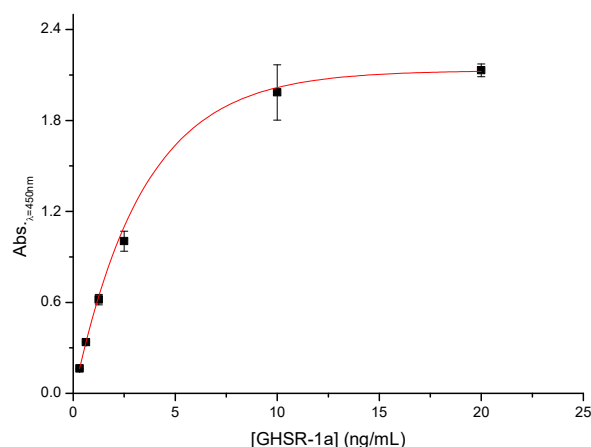


Figura 2-5 Curba de calibrare a receptorului GHSR-1a. Experimentele au fost efectuate în soluție tampon 10 mM PBS, pH 7,4 și la temperatura constantă de 37°C

Curba de legare a grelinei la receptor

Curbele de legare ale grelinei biotinilate la receptorul recombinant s-au realizat pe domeniul de 50-1000 nM, variindu-se concentrația de receptor între 100-1000 ng/mL . Experimentele de

legare directă a grelinei la receptor au condus la curbe de tip hiperbolic, cu platou de saturație, caracteristice modelului cu un singur situs de legare pentru grelina biotinilată (bio-GHR) (Figura 2-6).

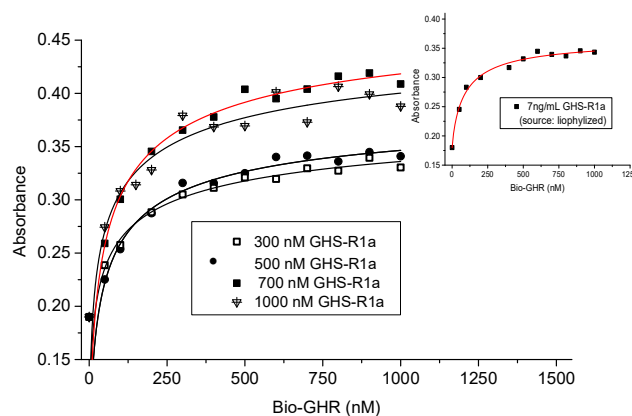


Figura 2-6 Curbe de legare ale grelinei biotinilate la GHS-R1a imobilizat obținute pentru diferite concentrații de receptor; cea mai mare absorbantă a fost obținută pentru 700 și 1000 nM receptor GHSR-1a. Toate experimentele s-au realizat în soluție tampon 10 mM PBS, pH 7,4 și la temperatura constantă de 37°C.

Curbele experimentale au fost procesate pe baza analizei de regresie neliniară, utilizând modelul Hill (Conn et al., 2009) și modelul bi-fazic (Puiu et al., 2018). Doar modelul Hill (ecuația 2.2) a corespuns comportării observate a sistemului studiat.

$$Y = a + \frac{b}{1 + \left(\frac{c}{X}\right)^d} \quad (2.2)$$

unde: **Y** este absorbanta măsurată la 450 nm (rezultată din legarea bio-GHR la receptor), **X** este concentrația molară de grelină biotinilată, **a** este absorbanta minimă a sistemului, **b** este absorbanta maximă, **d** este coeficientul Hill (reprezintă numărul de molecule de grelină biotinilată legate la receptor), **c** este concentrația molară care determină 50% din răspunsul maxim (EC_{50} , iar în acest caz reprezintă și constanta de disociere a complexului grelină biotinilată / GHSR-1a la 37°C).

Valorile obținute pentru EC_{50} au fost cuprinse în intervalul 138–143 nM. Coeficienții Hill au fost cuprinși între 0,9 și 1,3, ceea ce confirmă faptul că pentru legarea grelinei există un singur situs activ de legare, cel ortosteric.

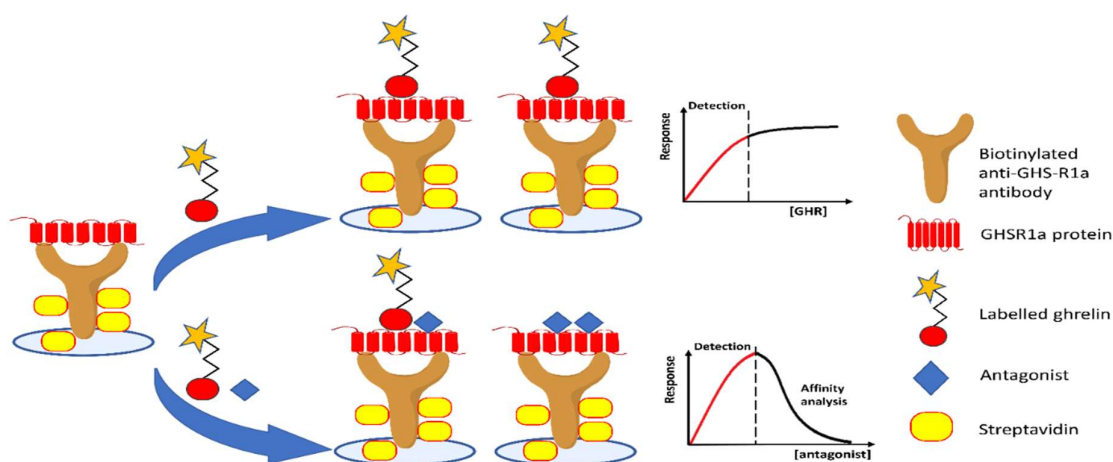


Figura 2-7 Reprezentarea schematică a formatului de detecție bazat pe analiza profilelor de afinitate.

Cu ajutorul ecuației Hill s-au estimat parametrii care satisfac cel mai bine modelul cu un singur situs de legare pentru grelină și s-au obținut următoarele date: coeficientul Hill = $0,87 \pm 0,16$ nM, $EC_{50} = 89,0 \pm 6,8$ nM, coeficientul de determinare (pentru domeniul liniar al curbei de calibrare a grelinei biotinate) = 0,9882;

Profilele de afinitate ale antagoniștilor

Experimentele realizate au pus în evidență existența unui al doilea situs de legare în structura receptorului GHSR-1a, care nu este accesibil grelinei, dar accesibil antagoniștilor (Figura 2-8).

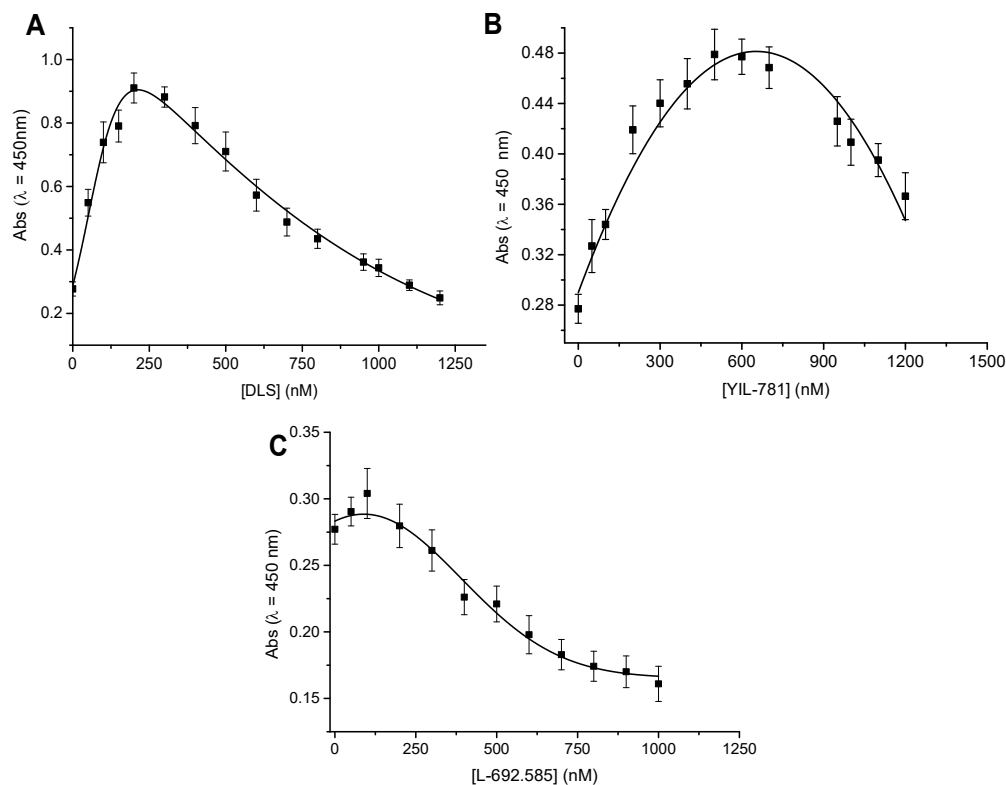


Figura 2-8 Curbele de legare competitivă dintre grelina biotinilată (223 nM) cu antagoniștii (A) DLS, (B) YIL-781, (C) L-692,585. Curbele de legare prezintă o formă de tip “clapot” caracteristică pentru modularea alosterică. Toate experimentele au fost realizate în soluție tampon PBS 0,01M și pH 7,4 la 37°C.

Analiza de afinitate și modelarea legării la receptor

Legarea antagoniștilor la situsul alosteric la concentrații mici favorizează legarea ulterioară a grelinei, comportament similar modulatorilor alosterici pozitivi. Pe baza secvenței de reacții de echilibru (2.3) - (2.8) s-au estimat constantele de disociere:



unde: **R** este receptorul GHSR-1a, **G** este grelina, **A** reprezintă antagonistul studiat, **K₁ – K₆** reprezintă constantele de afinitate (asociere), **RA** este complexul receptor / antagonist, în care **A** este legat la situsul ortosteric, **RA*** reprezintă complexul format între receptor și antagonistul legat la situsul alosteric.

Pentru determinarea constantelor de afinitate **K₁ – K₆**, s-a aplicat analiza regresiei neliniare.

$$Y = \frac{a+bX}{c+dX+e^{-2}} \quad (2.12)$$

$$a = 3K_5(K_1 + K_2K_5)[G] \quad (2.13)$$

$$b = 2K_3K_4K_5[G] \quad (2.14)$$

$$c = 6K_5 + 3K_5(K_1 + K_2K_5)[G] \quad (2.15)$$

$$d = 3(K_2K_5 - K_1)K_5 + 2K_5K_3 + 2K_3K_4K_5[G] \quad (2.16)$$

$$e = 2K_3K_5K_6 \quad (2.17)$$

unde: **Y** reprezintă absorbanta normalizată, **X** concentrația de antagonist, **G** este concentrația de grelină biotinilată (223 nM).

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 2-2.

Tabel 2-2 Constantele de disociere estimate cu ajutorul analizei de regresie non-liniară, pe baza modelului cu două situsuri de legare ale receptorului GHSR-1a, pentru experimentele competitive cu grelină biotinilată și antagoniști, în soluție tampon 10mM PBS pH 7,4 la temperatură constantă de 37°C.

Antagonist	Constanta de disociere (nM)						r ²
	K ₁ ⁻¹	K ₂ ⁻¹	K ₃ ⁻¹	K ₄ ⁻¹	K ₅ ⁻¹	K ₆ ⁻¹	
DLS	89,0±6,8	1509±103	171,4±1,6	82,9±7,2	1,05±0,13	99,40±8,04	0,9851
YIL-781	89,0±6,8	2164±112	189,0±16,0	72,6±6,7	1,16±0,18	302,0±16,0	0,9872
L-692,585	89,0±6,8	0,630±0,059	31,70±1,40	1,15±0,11	1,22±0,13	99,50±8,70	0,9847

Se disting două situsuri de legare la receptor cu constante de afinitate diferite (K_2^{-1} pentru situsul ortosteric și K_3^{-1} pentru situsul alosteric). Afinitatea antagoniștilor DLS și YIL-781 pentru situsul alosteric al receptorului este cu un ordin de mărime mai mare decât cea pentru situsul ortosteric. Limitele de detecție calculate pentru cei doi antagoniști sunt 29,0 ng/mL și, respectiv 27,0 ng/mL.

În cazul L-692,585, domeniul liniar cu pantă pozitivă este aproape inexistent, ceea ce conduce la concluzia că L-692,585 preferă o legare puternică la situsul ortosteric ($K_2^{-1} = 0,63$ nM).

Pe baza curbei de calibrare a DLS în amestecul 1:4 urină sintetică – PBS, s-a calculat limita de detecție pentru DLS de 74,0 ng/mL (pe domeniul liniar cu pantă pozitivă 50-110 ng/mL) (Figura 2-9).

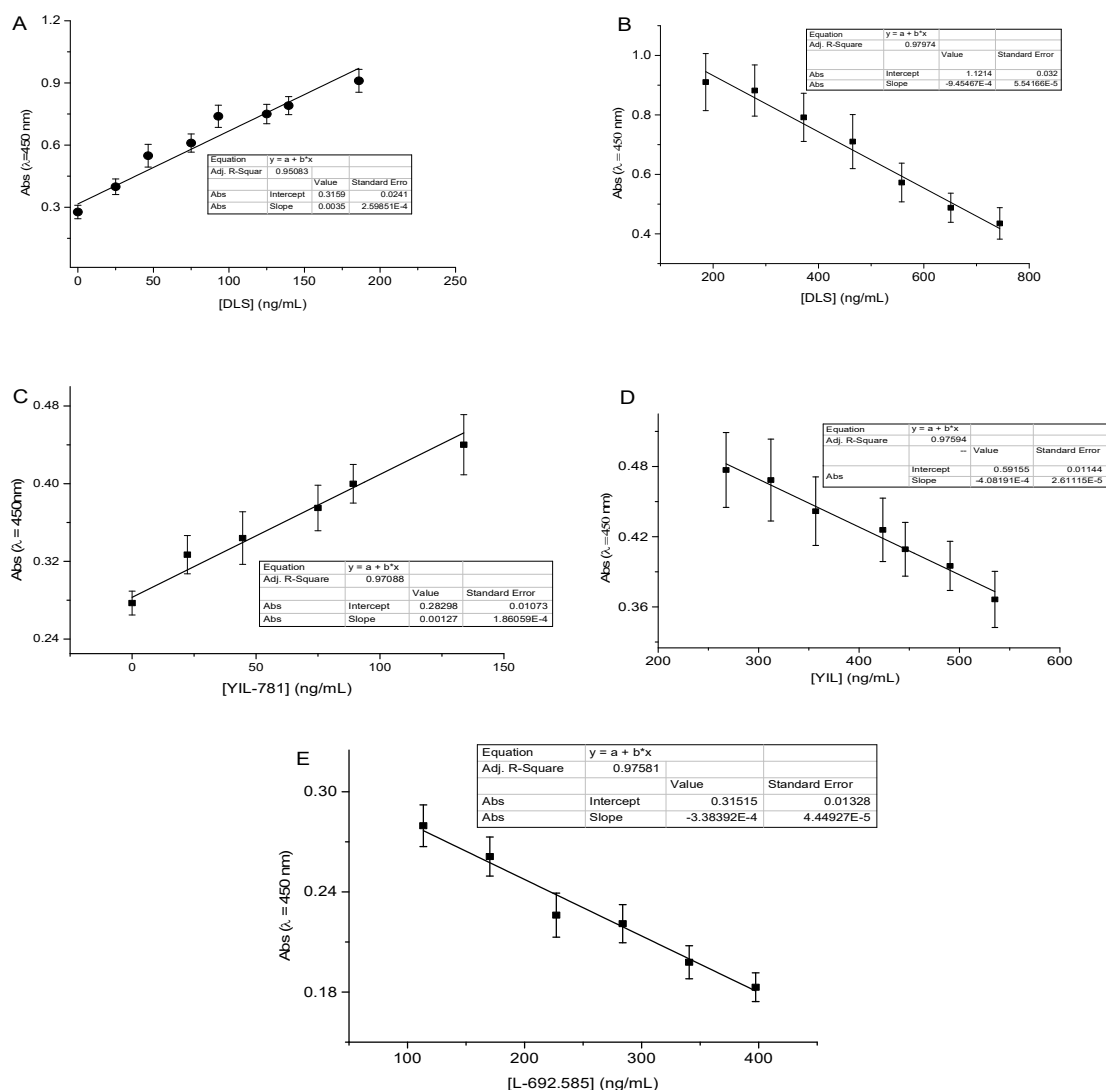
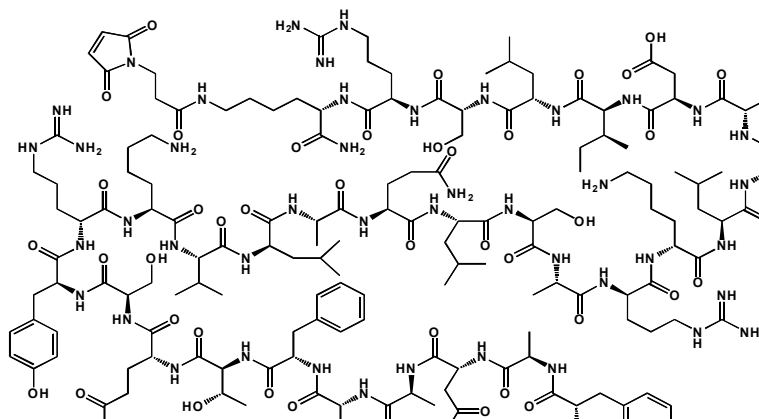


Figura 2-9 Drepte de calibrare obținute în experimentele competitive, cu cele două domenii liniare. DLS prezintă un domeniu liniar cu pantă pozitivă cuprins între 10-200 ng/mL (**A**) și un domeniul liniar cu pantă negativă cuprins între 200-750 ng/mL (**B**). Un comportament similar se poate observa și în cazul antagonistului YIL-781 – 25-150 ng/mL domeniul liniar cu pantă pozitivă (**C**) și 250-550 domeniul liniar cu pantă negativă (**D**). L-692,585 poate fi detectat doar pe baza domeniului liniar de pantă negativă 100-400 ng/mL (**E**). Toate experimentele au fost realizate în soluție tampon 10mM PBS pH 7,4 și temperatură constantă 37°C.

Capitolul 3 - Detecția agoniștilor și invers agoniștilor receptorului GHSR-1a

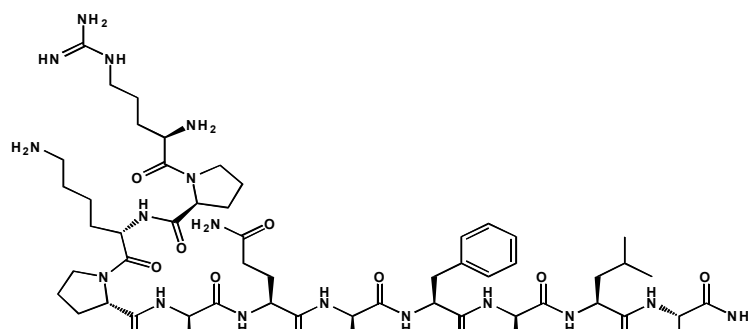
Formatul de analiză descris în capitolul 2, a fost aplicat în cazul agoniștilor receptorului GHSR-1a. Pentru studierea profilelor de afinitate s-au ales: un agonist peptidic CJC-1295 modificat cu complexul de afinitate DAC și invers agonistul peptidic, [D-Arg¹,D-Phe⁵,D-Trp^{7,9}, Leu¹¹]-Substanța P (Figura 3-1).

(A)



H-Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Gln-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Ser-Arg-Lys (Maleimidopropionyl)-NH₂
CJC-1295 cu DAC

(B)



H-D-Arg-Pro-Lys-Pro-D-Phe-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂
[D-Arg¹,D-Phe⁵,D-Trp^{7,9}, Leu¹¹]-Substanța P

Figura 3-1 Structurile chimice ale agonistului CJC-1295-DAC (A) și a invers agonistului peptidic Substanța P (B)

Efectul modulator al agoniștilor și invers agoniștilor grelinei

Efectul modulator al mimeticilor sintetici ai grelinei, CJC-1295-DAC și Substanța P, a fost studiat pe baza profilelor de afinitate. CJC-1295-DAC promovează activarea GHSR-1a și ulterior eliberarea de hormon de creștere din glanda pituitară. Invers agonistul inhibă sau reduce activitatea

constitutivă a receptorului secretagog, cea manifestată chiar și în lipsa vreunui ligand la situsul de activare ortosteric (Holst et al., 2003).

Principiul detecției pe baza formatului direct competitiv este prezentat în Figura 3-2.

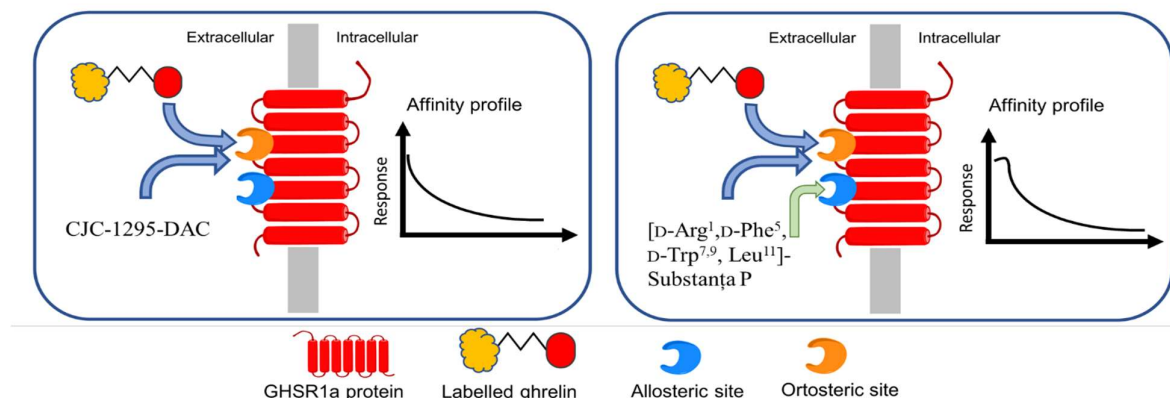


Figura 3-2 Reprezentarea formatului de analiză direct competitiv pentru CJC-1295-DAC și Substanța P. Deși curbele de răspuns ale sistemului sunt aparent similare, analiza detaliată de regresie neliniară poate face discriminarea între modele rivale.

Profilele de afinitate ale agoniștilor grelinei

Curbele de legare ale agoniștilor au fost analizate cu ajutorul regresiei neliniare, ecuația Hill (Sartore et al., 2020) (Figura 3-3). Se poate observa din profilul de afinitate al agonistului peptidic că acesta interacționează cu situsul de legare ortosteric al receptorului, fiind astfel în competiție cu grelina marcată.

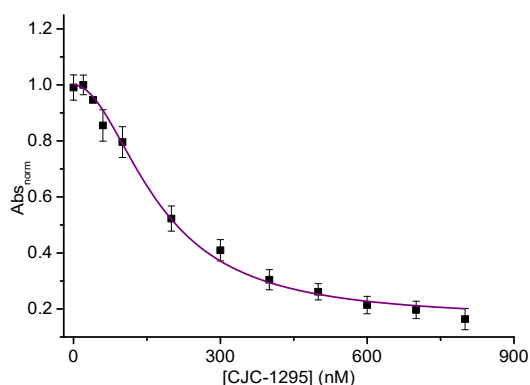


Figura 3-3 Profilele de afinitate în experimentele cu bio-GHR 223 nM și concentrații diferite de CJC-1295. Toate experimentele au fost realizate în triplicat în soluție tampon PBS 10 mM, pH 7,4, la 37°C

Rezultatele obținute pentru estimarea constantelor de disociere sunt prezentate în Tabelul 3-

1.

Tabel 3-1 Constantele de disociere obținute pentru CJC-1295-DAC în sistemele de ecuații liniare corespunzătoare

Constanta de disociere (nM)	CJC-1295-DAC
K_1^{-1} (determinată în legarea directă a grelinei la receptor)	$88,90 \pm 0,63$
K_2^{-1} (determinată în experimentele competitive cu CJC-1295-DAC)	$65,80 \pm 4,30$

CJC-1295-DAC are o constantă de disociere K_2^{-1} mai mică decât constanta de disociere K_1^{-1} a grelinei, ceea ce se traduce printr-o afinitate mai mare decât a grelinei, pentru situsul ortosteric al receptorului secretagog. S-a obținut o limită de detecție de 56,0 ng/mL pentru agonistul peptidic CJC-1295-DAC, în amestecul de urină sintetică: soluție tampon PBS 1:4.

Profilele de afinitate ale invers agoniștilor grelinei

Substanța P interacționează atât cu situsul ortosteric, cât și cu cel alosteric al receptorului (Figura 3-2). Substanța P prezintă o afinitate scăzută pentru situsul ortosteric (K_2^{-1} mult mai mică decât K_1^{-1} pentru grelină), dar și pentru situsul de legare alosteric. În cazul formării complexului ternar RA*G, K_4^{-1} are o valoare de 0,21 nM, ceea ce confirmă faptul că afinitatea bio-GHR pentru complexul receptor – Substanța P este mult mai mare decât afinitatea pentru complexul bio-GHR/receptor.

Tabel 3-2 Constantele de disociere obținute pentru Substanța P în sistemele de ecuații liniare corespunzătoare

Constanta de disociere (nM)	Substanța P
K_1^{-1} (determinată în legarea directă a grelinei la receptor)	$88,90 \pm 0,63$
K_2^{-1} (determinată în experimentele competitive cu mimetici)	$(1,23 \pm 0,11) \times 10^5$
K_3^{-1} (determinată în experimentele competitive cu mimetici)	$(6,05 \pm 0,59) \times 10^4$
K_4^{-1} (determinată în experimentele competitive cu mimetici)	$0,210 \pm 0,011$
K_5^{-1} (determinată în experimentele competitive cu mimetici)	$0,538 \pm 0,047$
K_6^{-1} (determinată în experimentele competitive cu mimetici)	$1,230 \pm 0,012$

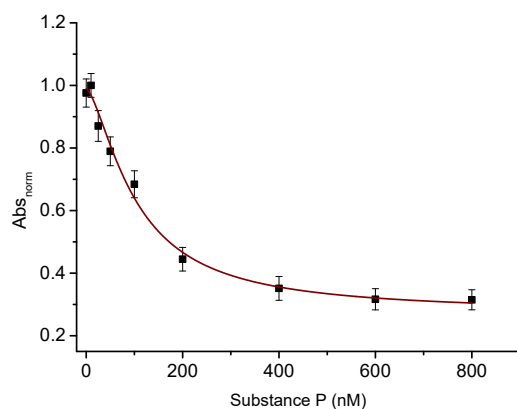


Figura 3-4 Profilele de afinitate în experimentele cu bio-GHR (223 nM) și concentrații diferite de Substanța P. Toate experimentele au fost realizate în triplicat în soluție tampon PBS 10 mM, pH 7,4, la 37°C

S-a determinat limita de detecție pentru Substanța P pentru care s-a obținut o valoare de 23,0 ng/mL.

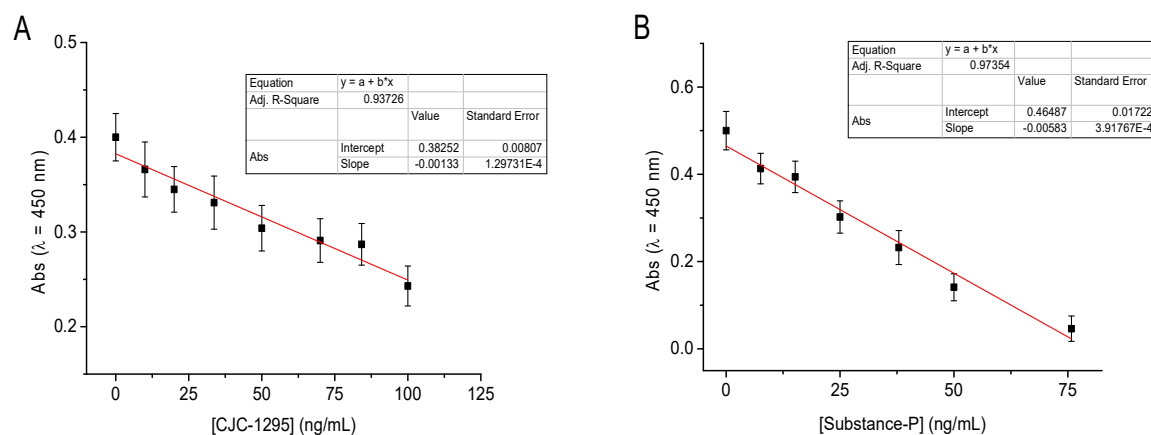


Figura 3-5 Dreptele de calibrare obținute în soluție tampon PBS 10 mM, pH 7,4, la 37°C pentru **(A)** agonistul peptidic CJC-1295-DAC și **(B)** invers agonistul Substanța P. Coeficienții de corelație obținuți au fost **(A)** $R^2 = 0,93726$ și **(B)** $R^2 = 0,97354$.

Capitolul 4 - Detecția modulatorilor alosterici de tipul canabinoizilor naturali

Canabinoizii sunt compuși organici cu structuri de 21 de atomi de carbon și schelet terpenofenolic (Abd-Elsalam et al., 2019, Klimuntowski et al., 2020). Dintre aceștia, Δ^9 -tetrahydrocannabinolul (THC) și canabidiolul (CBD) sunt cei mai răspândiți și cunoscuți canabinoizi (Alves et al., 2020).

Până în prezent, nu s-au raportat în literatură sisteme de afinitate între receptorul GHSR-1a și canabinoizi, ce joacă rolul unor modulatori alosterici.

Efectul modulator al canabinoizilor

Posibilitatea exercitării unui efect modulator al carboxi-THC și CBD asupra GHS-R1a a fost investigat prin analizarea profilelor de afinitate. Canabinozii pot interacționa cu situsurile alosterice ale GHSR-1a, fie promovând legarea grelinei biotinite la situsul ortosteric, fie blocând legarea acesteia.

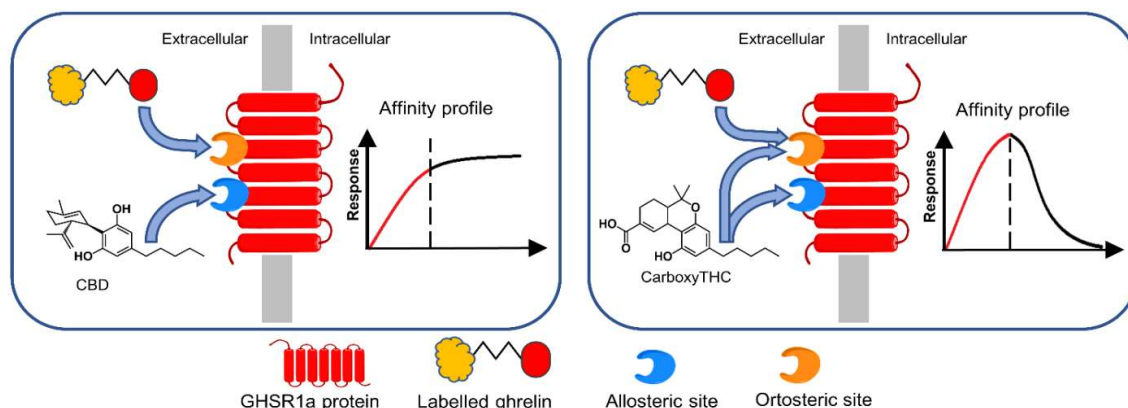


Figura 4-1 Reprezentarea schematică a formatului de detecție bazat pe efectul modulator al canabinoizilor studiați asupra GHS-R1a, în prezența grelinei marcate.

Profile de afinitate ale modulatorilor alosterici

Curbele de legare ale analiților în experimentele de afinitate cu receptorul imobilizat și grelina marcată au fost procesate prin analiza regresiei neliniare, ecuația Hill (Sebaugh, 2011) (Figura 4-2).

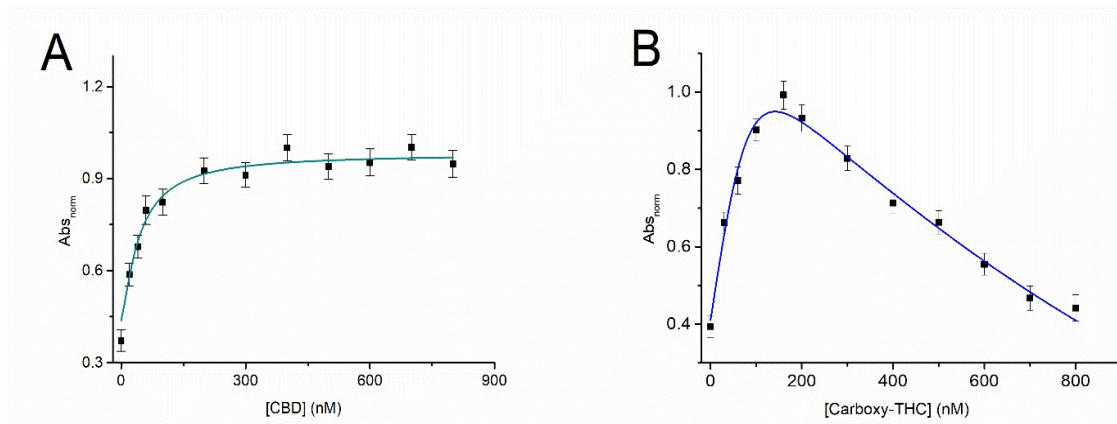


Figura 4-2 Profilele de afinitate în experimentele cu bio-GHR 223 nM și concentrații diferite de (A) CBD și (B) Carboxy-THC. Toate experimentele au fost realizate în triplicat în soluție tampon PBS 10 mM, pH 7,4 la 37°C.

Profilele de afinitate pentru cei doi canabinoizi sunt diferite: CBD prezintă o curbă de legare de tip hiperbolic, în timp ce curba de legare a carboxi-THC la receptor are un aspect de tip „clopot”. Până în prezent, nu s-au raportat studii referitoare la interacția dintre canabinoizi (ca liganzi extracelulari) și receptorul GHSR-1a, deși un astfel de comportament s-a evidențiat în cazul altor receptori transmembranari (Conn et al., 2009).

Valorile constantelor de disociere pentru cei doi modulatori alosterici sunt prezentate în Tabelul 4-1.

Tabel 4-1 Constantele de disociere obținute pentru CBD și carboxi-THC în sistemele de ecuații liniare corespunzătoare

Constanta de disociere (nM)	CBD	Carboxy-THC
K_1^{-1} (determinată în legarea directă a grelinei la receptor)	$88,90 \pm 0,63$	$88,90 \pm 0,63$
K_2^{-1} (determinată în experimentele competitive cu modulatori)	-	$(3,94 \pm 0,35) \times 10^8$
K_3^{-1} (determinată în experimentele competitive cu modulatori)	3082 ± 76	234 ± 13
K_4^{-1} (determinată în experimentele competitive cu modulatori)	$1,150 \pm 0,009$	135 ± 9
K_5^{-1} (determinată în experimentele competitive cu modulatori)	-	$0,705 \pm 0,071$
K_6^{-1} (determinată în experimentele competitive cu modulatori)	-	$60,1 \pm 3,2$

CBD și caboxi-THC au afinitate scăzută și pentru situsul alosteric (K_3^{-1}), formarea complexului activat **RM*** fiind favorizată în cazul metabolitului carboxi-THC. Valorile estimate pentru K_4^{-1} , de formare a complexului **RM*G**, 135 nM pentru carboxi-THC și 1,15 nM pentru CBD, confirmă faptul că legarea grelinei la complexul CBD - receptor și este superior favorizată comparativ cu cazul carboxi-THC.

S-au trasat curbe de calibrare pe domeniul 5 – 30 ng/mL, domeniu unde interferențele datorate mimeticilor grelinei sunt neglijabile (Figura 4-4).

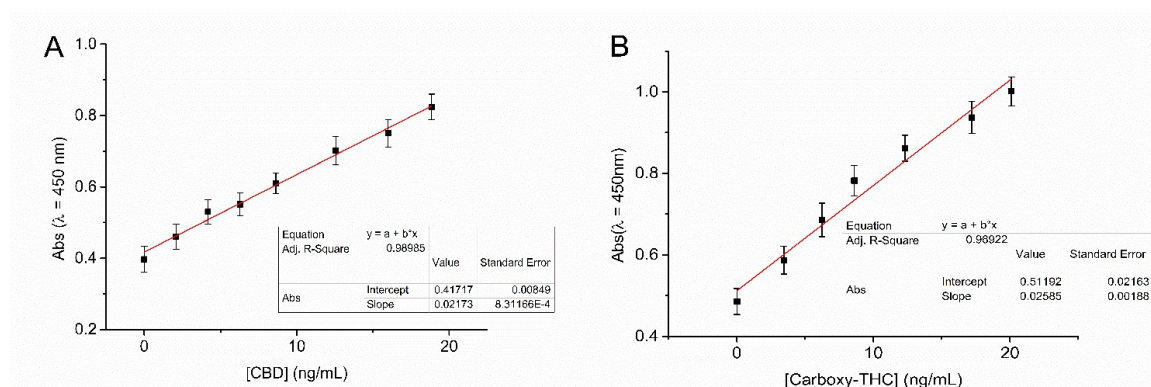


Figura 4-4 Curbele de calibrare pentru (A) CBD și (B) carboxi-THC PBS 10 mM, pH 7,4 și 37°C

Din curbele de calibrare s-a obținut un LOD pentru CBD de 5,1 ng/mL și 3,7 ng/mL pentru carboxi-THC. S-au analizat probe îmbogățite cu cei doi canabinoizi în amestec 1:4 (v/v) urină sintetică: soluție tampon PBS 10 mM (Figura 4-5).

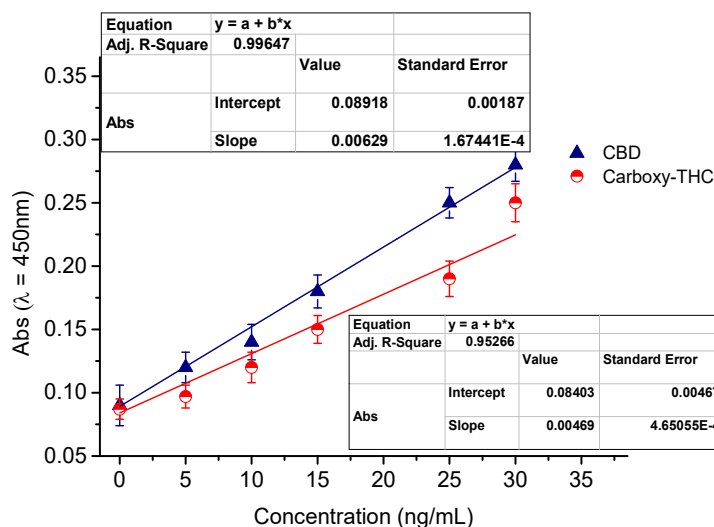


Figura 4-5 Drepte de calibrare pentru CBD și carboxi-THC în amestec 1:4 (v/v) urină sintetică / soluție tampon PBS 10 mM, pH 7,4 și 37°C. Experimentele au fost realizate în triplicat

În amestecul urină sintetică : soluție tampon PBS s-au obținut valori similare pentru limitele de detecție: 7,63 ng/mL pentru CBD și 5,12 ng/mL pentru carboxi-THC.

Validarea metodei bazate pe profilele de afinitate prin comparare cu metoda gaz-cromatografică cuplată cu spectrometria de masă în tandem

Validarea rezultatelor obținute prin metoda competitivă directă, bazată pe profilele de afinitate s-a realizat prin tehnica gaz-cromatografică cuplată cu spectrometria de masă în tandem (GC-MS/MS) pe baza proprietăților fizice și chimice ale analiților (Tabelul 4-2).

Tabel 4-2 Proprietățile fizice și chimice ale CBD și carboxi-THC importante pentru analiza cromatografică

Analit	Formula chimică	Masă moleculară (Da)	Grupări disponibile pentru sililare	Masă moleculară + 2-TMS
CBD	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314	2-OH	458
Carboxi-THC	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	344	2-OH	488

În Figura 4-6 este reprezentată o cromatogramă totală de ioni în care sunt marcați analiții de interes și cei doi compuși utilizați în controlul hidrolizei enzimatic.

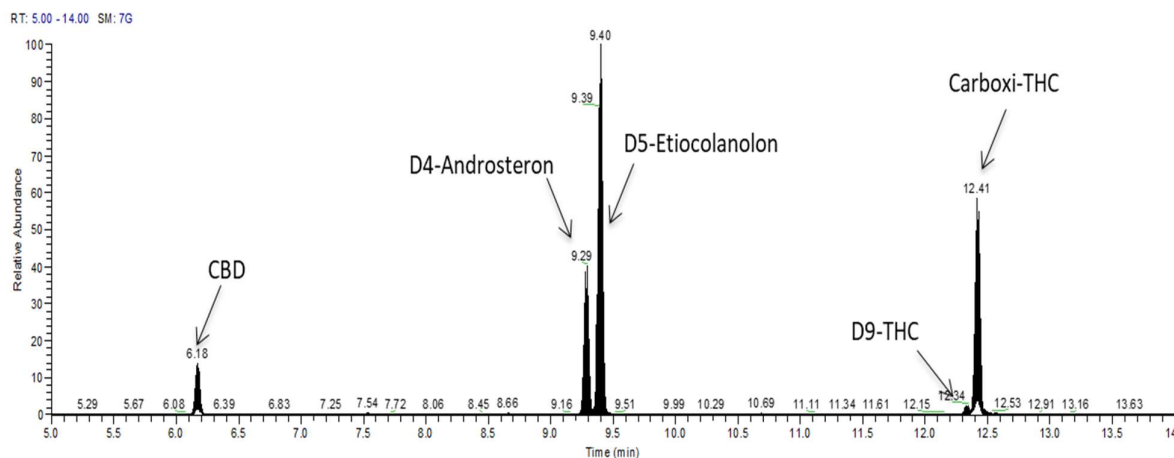


Figura 4-6 Cromatograma totală de ioni obținută pentru detecția simultană a CBD (timp de retenție 6,18 minute) și carboxi-THC (12,14 minute).

Rezultatele etapelor de optimizare sunt prezentate în Tabelul 4-4.

Tabel 4-4 Parametri cromatografici optimizați pentru detecția CBD, carboxi-THC și D₉-THC (standard intern)

Canabinoid	Timp de retenție relativ	Tranziția de masă	Energia de coliziune (eV)
Carboxy-THC	1,01	473,3 - 355,2	19
CBD	0,50	390,3 – 319,2	12
D ₉ -THC (standard intern)	1,00	380,2 – 292,1	17

Cuantificarea celor doi canabinoizi naturali s-a realizat prin trasarea curbelor de calibrare cu 8 puncte pentru CBD și carboxi-THC pe domeniul de concentrații cuprins între 0 și 100 ng/mL, atât în soluție tampon PBS 10 mM, pH 7,4, cât și în amestecul de urină sintetică / PBS în raport 1:4 (Figura 4-9). Acestea au fost utilizate pentru compara rezultatele obținute cu metoda cromatografică și cu metoda bazată pe profilele de afinitate ale canabinoizilor.

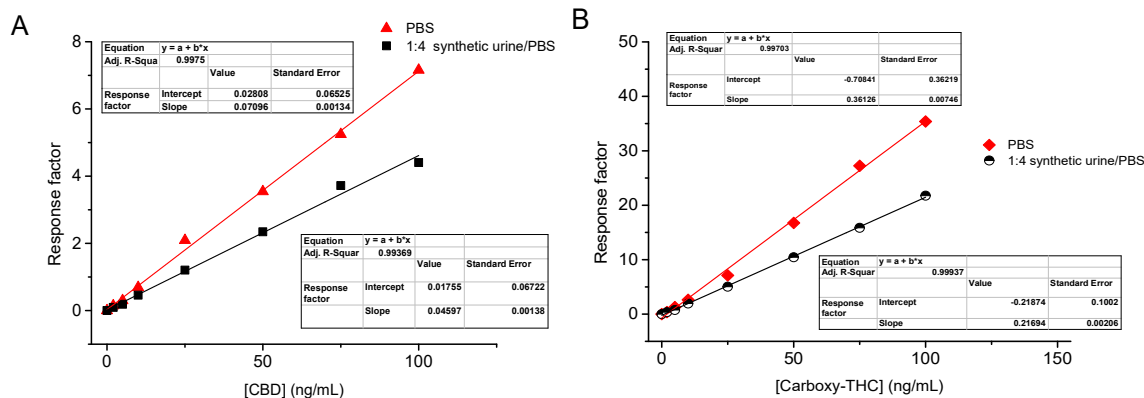


Figura 4-9 Efectele de matrice asupra sensibilității metodei GC-MS/MS pentru detecția (A) CBD și (B) carboxi-THC în soluție tampon PBS și amestec 1:4 urină sintetică / PBS. Factorul de răspuns reprezintă raportul dintre aria picului corespunzător lui D₉-THC și aria picului corespunzător analitului de interes.

Prin ambele metode analitice s-au obținut rezultate similare (Tabelul 4-6), ceea ce confirmă astfel că formatul de detecție bazat pe afinitate oferă rezultate cu un grad ridicat de încredere.

Tabel 4-6 Rezultatele comparative privind detecția CBD și carboxi-THC prin metoda spectrofotometrică și GC-MS/MS în probe preparate în soluție tampon PBS și în amestec 1:4 urină sintetică / soluție tampon PBS

Analit	Format de afinitate competitiv		GC-MS/MS	
	proba în PBS $\pm$ SD (ng/mL)	proba în amestec 1:4 urină sintetică / PBS $\pm$ SD (ng/mL)	proba în PBS $\pm$ SD (ng/mL)	proba în amestec 1:4 urină sintetică / PBS $\pm$ SD (ng/mL)
CBD	14,89 $\pm$ 0,11	15,22 $\pm$ 0,13	15,060 $\pm$ 0,054	14,980 $\pm$ 0,047
Carboxi-THC	15,13 $\pm$ 0,14	15,18 $\pm$ 0,14	15,050 $\pm$ 0,061	15,020 $\pm$ 0,031

Capitolul 5 - Implementarea perechii de afinitate receptor / agonist pe suport peptidic de tip “fir molecular” pentru detecția electrochimică a compușilor cu importanță în controlul doping

Acest capitol prezintă realizarea unui senzor peptidic modular având ca suport electrodul de aur la suprafața căruia s-a implementat un sistem stabil, conductiv, caracterizat printr-un transfer eficient și rapid de electroni și organizat sub forma unui monostrat la suprafața electrodului. Suportul peptidic este alcătuit dintr-o secvență peptidică cu 9 resturi de aminoacizi, ce conține, în mod alternativ, grupări ionizabile și polare, aflate într-o configurație de tip α -helix.

Principiul de realizare a senzorului

Formatul modular al biosenzorului (Figura 5-1) a necesitat realizarea succesivă a unor etape electrochimice, chimice și etape de afinitate.

Activarea suprafeței

Cei 3 electrozi de aur utilizați în experimentele electrochimice au fost supuși etapelor de curățare electrochimică prin etape succesive de voltametrie ciclică și cronoamperometrie.

Determinarea ariei suprafeței active electrochimic a electrodului de Au (ESA)

Monitorizarea adsorbției oxigenului la suprafața electrodului a fost metoda aleasă ca fiind o metodă reproductibilă pentru a obține informații despre suprafața electrodului. Suprafața electrodului a fost calculată ca raport între sarcina reducerii oxidului de aur prezent pe suprafața electrozilor studiați ($Q_{\text{Au}/\alpha \text{ oxid}}$) și Q_{std} .

Monitorizarea formării filmului mixt SP/MHC și adsorbția chimică a markerului redox MB

Formarea filmului SP/MCH a fost monitorizată prin CV în soluție de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mM în soluție de KCl 1 M pe domeniul de potențial 0 $\div$ 0,06 V, cu o viteză de scanare de 0,1 V/s.

Chemosorbția esterului MB-NHS la filmul MB/NHS a fost evidențiată prin voltametrie cu undă pătrată (SWV).

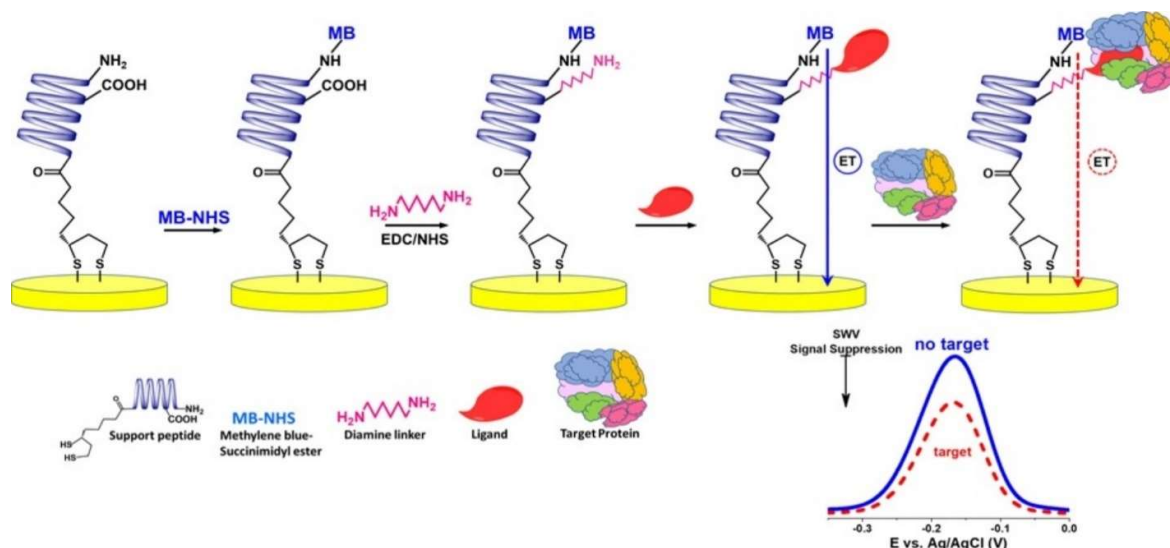


Figura 5-1 Reprezentarea schematică a construcției biosenzorului, precum și a principiului de detecție: formarea filmului peptidic pe suprafața electrodului de aur, blocarea defectelor structurale cu MCH, marcarea cu MB, atașarea covalentă a linker-ului de tip diamino- la resturile de glutamat și imobilizarea ligandului (CJC-1295); interacția specifică dintre ligand și analitul cu masă moleculară mare conduce la scăderea vitezei de transfer de electroni de la markerul redox la suprafața electrodului de Au.

Estimarea densității superficiale de MB chemosorbit

Pentru estimarea suprafeței ocupate de MB s-au realizat măsurători de:

- CV pe domeniul de potențial $-0,55 \div 0$ V vs. Ag/AgCl în soluție PBS 0,1 M;
- ACV pe domeniul de potențial $0V \div -0,55$ V vs. Ag/AgCl în soluție PBS 0,1 M;

Caracterizarea modificărilor de tip modular aduse suprafeței electrodului de aur a fost determinată utilizând atât voltametria ciclică, cât și spectroscopia de impedanță electrochimică.

Marcarea SP cu MB

Electrodul modificat cu filmul de SP/MCH a fost incubat în 100 μ L de soluție MB-NHS 200 μ M preparată în soluție tampon carbonat/bicarbonat 10 mM (cu adaos de DMF 22 % v/v) și pH 8,5, timp de 30 de minute.

Imobilizarea agonistului pe filmul mixt MB-SP/MCH

Imobilizarea CJC-1295 a fost realizată utilizând grupările carboxil ale suportului peptidic activate în prealabil prin reacția esterilor EDC/NHS, la pH 9, pentru a favoriza legarea grupărilor neprotonate ale EDA sau HMDA. Apoi, grupările amino libere ale linker-ului au fost funcționalizate prin reacția spontană cu gruparea maleimidă din complexului DAC al CJC-1295, la pH 8,5.

Păstrarea pe termen lung a senzorilor și regenerarea suprafeței senzorului

Atunci când nu au fost folosiți, senzorii au fost păstrați în soluție PBS 0,1 M ce conține glicerol 2,5%, la 4°C.

Soluția optimă de regenerare a suprafeței a fost soluția de NaCl 0,1 M cu adaos de Tween 20 0,1%, timp de 15 minute. Gradul de recuperare al semnalului după regenerare s-a situat între 96-98%, comparativ cu semnalul de dinaintea etapei de legare a receptorului pentru grelină.

Designul peptidei suport

S-a optimizat și sintetizat o structură peptidică bogată în resturi de alanină, având secvența X-YAAAHAEAK-NH₂, unde X este un rest de acid lipoic, cu structură secundară de tip α -helix și cu un moment de dipol total (DM) orientat din capătul N-terminal spre C-terminal.

Astfel, din studiul de dicroism circular, pentru rezultatele obținute folosind algoritmul de analiză CONTIN în Dichroweb (Whitmore and Wallace, 2008, Sreerama and Woody, 2000), s-a evidențiat faptul că un procent de 98,8 % din peptida suport este sub formă de α -helix.

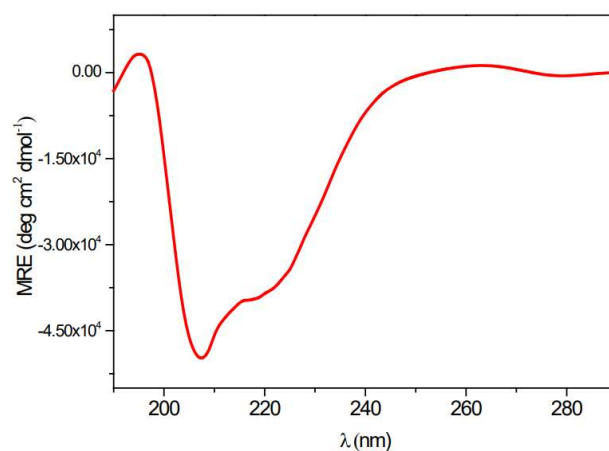


Figura 5-2 Spectrul de dicroism circular al peptidei suport la o concentrație de 100 μ M în acetonitril. Picurile negative prezente la 208 și 222 nm susțin ipoteza unei configurații de tip α -helix

Optimizarea procedurilor de pre-tratare electrochimică

Succesiunea etapelor electrochimice a fost optimizată pentru a obține o suprafață electrochimic activă reproductibilă și pentru a asigura ulterior depunerea unui strat peptidic stabil. S-a obținut o valoare reproductibilă pentru factorul de rugozitate (R_f , definit ca raport între suprafața electrochimic activă și suprafața geometrică a electrodului de aur) de $1,6 \pm 0,11$ (experimente efectuate pe 4 electrozi de aur). Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 5-3.

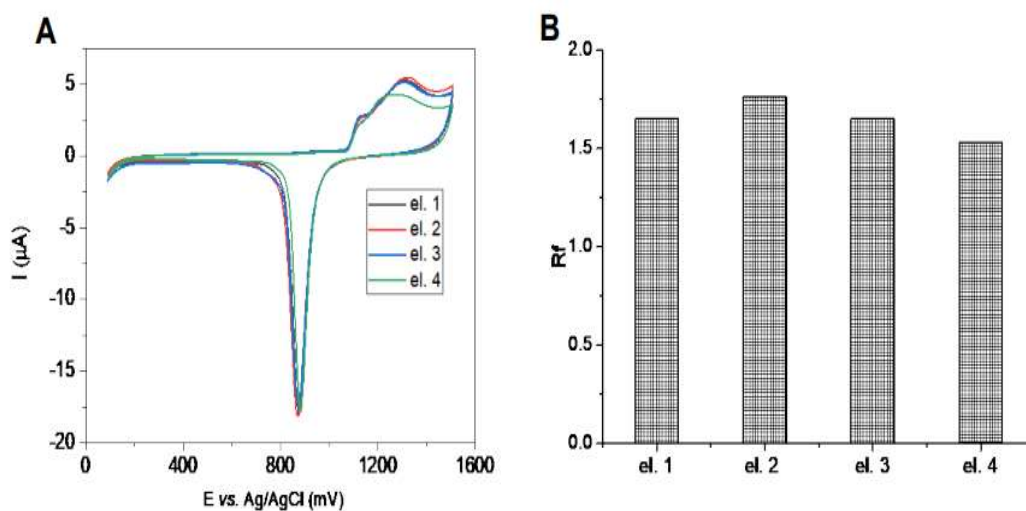


Figura 5-3 (A) Determinarea ESA pentru 4 electrozi de aur prin măsurători de voltametrie ciclică în H_2SO_4 0,05 M ($v = 0.1$ V/s); **(B)** Valorile factorul de rugozitate obținute după activarea suprafeței prin procedurile combinate: scanări în voltametrie ciclică, întâi în mediu bazic și apoi în mediu acid, urmate de aplicarea a trei pulsuri de potențial succesive de 30 ms la +1,6, 0,0 și -0,8 vs. Ag/AgCl, în soluție PBS 0,1 M și pH 7,4.

Caracterizarea electrochimică a stratului peptidic

Formarea stratului peptidic de la suprafața electrodului, înainte de marcarea cu MB, a fost monitorizată prin măsurători de CV în soluție de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. S-a urmărit formarea unui strat cât mai izolator, iar acest lucru s-a realizat la densități de SP de 50 – 100 μM SP și MCH 1 mM (Figura 5-4).

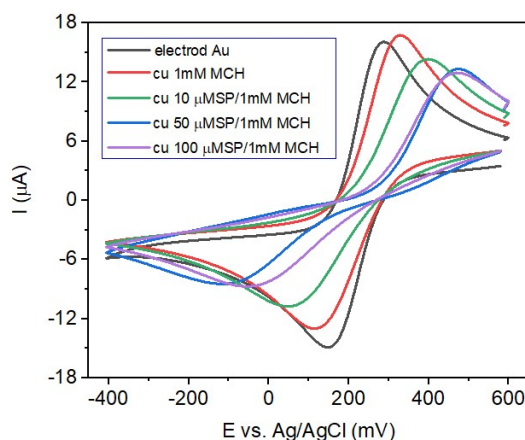


Figura 5-4 Măsurători de CV efectuate cu electrodul de Au modificat cu SP/MCH în soluție $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mM, după 18 ore de la incubarea electrodului cu SP/MCH. Viteza de scanare a fost 100 mV/s.

Numărul de moli de MB de pe suprafața electrodului (N) a fost determinat din măsurători de CV și ACV, rezultatele obținute prin ambele tehnici voltametrice sunt similare, așa cum se poate observa din Tabelul 5-1.

Tabel 5-1 Suprafața ocupată de filmul mixt SP/MCH funcționalizat cu MB, determinat prin tehnicile voltametrice de CV și ACV. Experimentele s-au realizat în triplicat

Suprafața ocupată de stratul peptidic funcționalizat cu MB $\Gamma \times 10^{11}$ (moli/cm ²)		
SP (μ M)	CV	ACV
100	$2,52 \pm 0,11$	$3,78 \pm 0,16$
50	$3,61 \pm 0,31$	$4,91 \pm 0,22$
10	$0,911 \pm 0,047$	$1,060 \pm 0,034$
0	$0,488 \pm 0,035$	$0,504 \pm 0,035$

Estimarea parametrilor cinetici ai transferului de electroni

În Figura 5-6 sunt reprezentate voltamogramele caracteristice ale sistemului MB/SP/MCH, cu picuri voltametrice bine definite pentru curentul anodic (I_f), pentru cel catodic (I_b) și pentru curentul diferențial net (I_{net}). Din forma voltamogramelor se poate observa un comportament tipic unei reacții la electrod cvasi-reversibilă pentru o specie redox imobilizată.

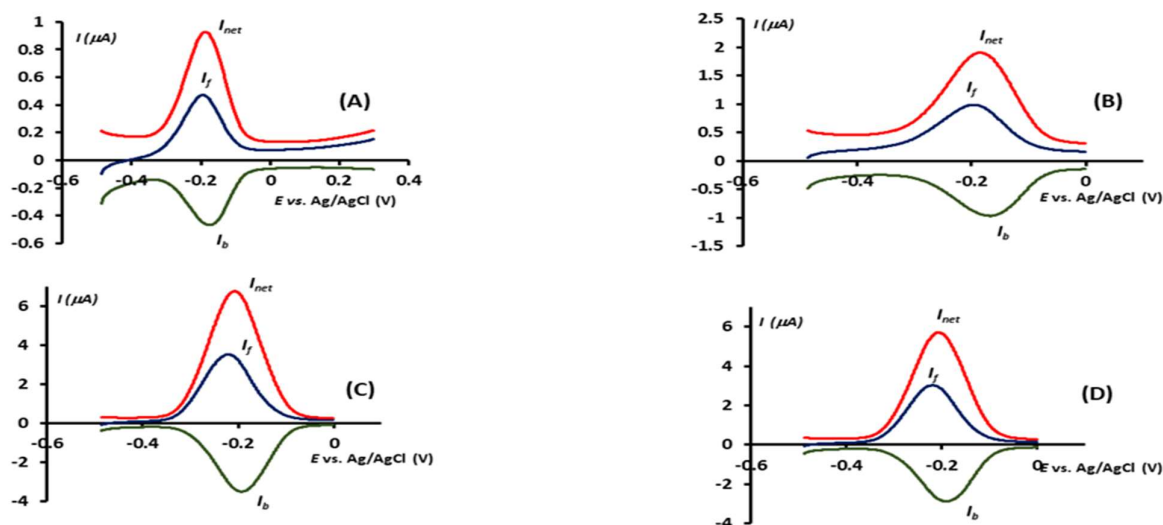


Figura 5-6 Voltamograme SWV tipice pentru răspunsul MB imobilizat pe suprafața electrodului în absența (A), în prezența peptidei support la concentrația 10 μ M (B), 50 μ M (C) și 100 μ M (D). Parametrii experimentali sunt frecvența – 25 Hz, amplitudinea E_{sw} – 50 mV și pasul de potențial ΔE_{step} – 1,5 mV. Voltamogramele au fost înregistrate în sensul anodic, începând de la -0,500 V.

Cei mai importanți parametri ai voltamogramelor prezentate în Figura 5-6 sunt prezentați în Tabelul 5-2:

Tabel 5-2 Parametrii caracteristici voltamogramelor SWV prezentate în figura 5-6

Sistemul studiat	$I_{net,p}$ (μ A)	E_p (V)	ΔE_p (mV)	$I_{p,b}/I_{p,f}$	α_1
MB/MCH	0,789	-0,190	18	0,836	0,630
MB/10 μ M SP/MCH	1,51	-0,180	26	0,956	0,540
MB/50 μ M SP/MCH	6,56	-0,204	29	0,978	0,520
MB/100 μ M SP/MCH	5,39	-0,205	29	0,935	0,550

Poziția maximului în prezența SP se găsește la frecvențe mai înalte, demonstrând faptul că viteza reacției la electrod crește, comparativ cu cazul sistemului în absența SP (Figura 5-8).

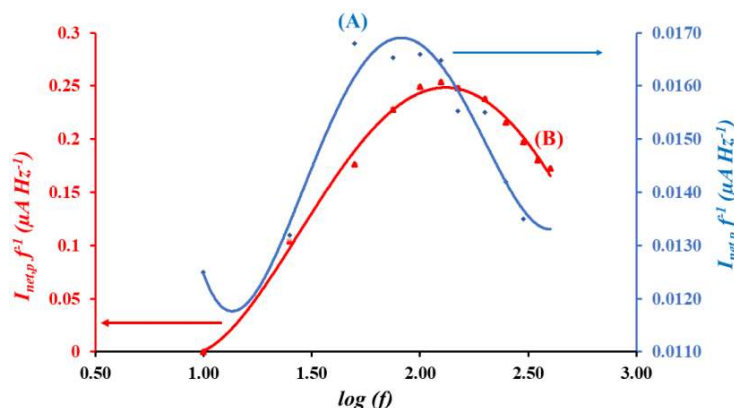


Figura 5-8 Maximul cvasi-reversibil al MB obținut în absența SP (curba (A) și axa de coordonate din dreapta) și în prezența a 50 μM SP (curba (B) și axa de coordonate din stânga. Amplitudinea SW – 25 Hz, iar treapta de potențial – 1,5 mV.

Stabilitatea stratului peptidic marcat redox

Monitorizarea stabilității stratului peptidic s-a realizat pe o perioadă de timp de 25 de zile de la funcționalizarea cu markerul redox MB. S-a constatat o scădere de aproximativ 22 % a semnalului după prima zi și o scădere mai lentă până la 73 % (comparativ cu valoarea inițială a semnalului).

Detecția receptorului secretatgog al hormonului de creștere

Ligandul peptidic CJC-1295-DAC a fost imobilizat la sistemul creat prin grupările carboxil libere de la restul de glutamat al peptidei suport, prin intermediul unui linker cu două grupări amină primare. Prin utilizarea HMDA în locul EDA, s-a obținut o scădere de 33,5 %, pentru aceeași concentrație de receptor (50 ng/mL, Figura 5-15).

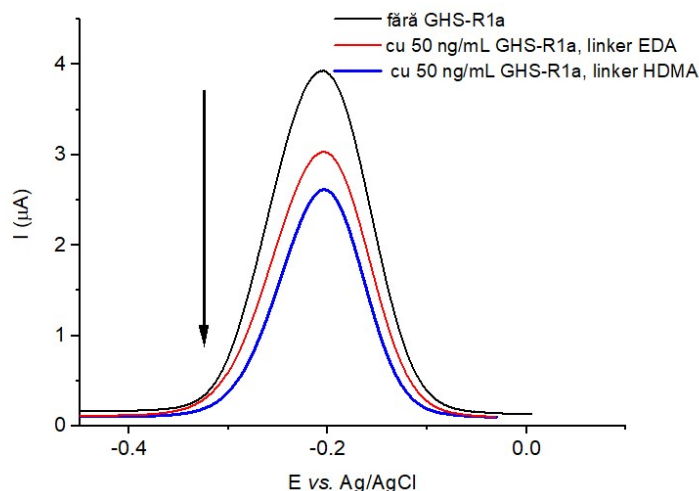


Figura 5-15 Scăderea de semnal în SWV datorat legării specifice a GHSR-1a la agonistul CJC-1295, imobilizat pe electrodul funcționalizat, utilizând doi linkeri diferiți: etilendiamina (EDA) și hexametilendiamina (HDMA). Experimentele au fost realizate în PBS 100 mM, pH = 7,4, T = 298 K.

Legarea receptorului pentru grelină la ligandul imobilizat conduce la o scădere de semnal dependentă de concentrația acestuia, efect ilustrat prin experimente cu concentrații crescătoare de receptor pe domeniul de concentrații 5 – 50 ng/mL (Figura 5-16).

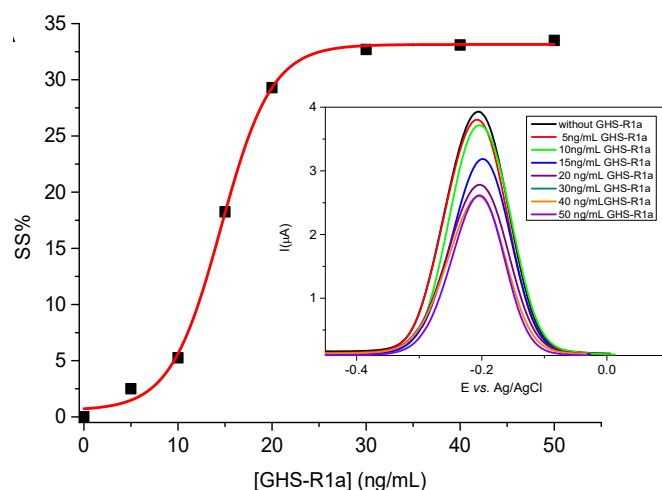


Figura 5-16 Reprezentarea grafică a scăderii de semnal după legarea receptorului la CJC-1295, în funcție de concentrația receptorului. În insert se poate observa scăderea semnalului odată cu creșterea concentrației de receptor. Experimentele au fost realizate în PBS, pH = 7,4, T = 298 K.

Cei mai buni parametri care satisfac ecuația Hill au fost:

$b = 249 \pm 23 \text{ pM}$ (ceea ce înseamnă $14,4 \pm 1,3 \text{ ng/mL}$);

$c = 2,5 \pm 0,3$ (cu $R^2 = 0,978$)

Studii de reproductibilitate și selectivitate

Studiile de reproductibilitate au fost realizate pe senzorul funcționalizat, în prezența receptorului GHSR-1a la o concentrație de 15 ng/mL, în tehnica SWV și utilizând 3 electrozi de Au. S-a obținut o reproductibilitate bună, caracterizată printr-o deviație standard relativă (RSD) egală cu 2,5 %.

Pentru verificarea specificității senzorului pentru receptorul studiat, s-au efectuat experimente adiționale cu doi anticorpi nespecfici pentru ligandul imobilizat: anticorpul anti-Ochratoxin A și anticorpul anti-Cloramfenicol. S-a observat o scădere de semnal semnificativă a curentului de pic în cazul receptorului GHSR-1a (de 33 %), și doar 3 % pentru anti-Ochratoxin A și 9 % pentru anti-cloramfenicol.

S-au efectuat teste de selectivitate cu amestecuri formate din analitul de interes și anticorpul menționat anterior. Rezultatele obținute pentru amestec au fost similare cu cel înregistrat într-o soluție care conține doar analitul de interes, confirmând astfel selectivitatea senzorului pentru GHSR-1a (Figura 5-18).

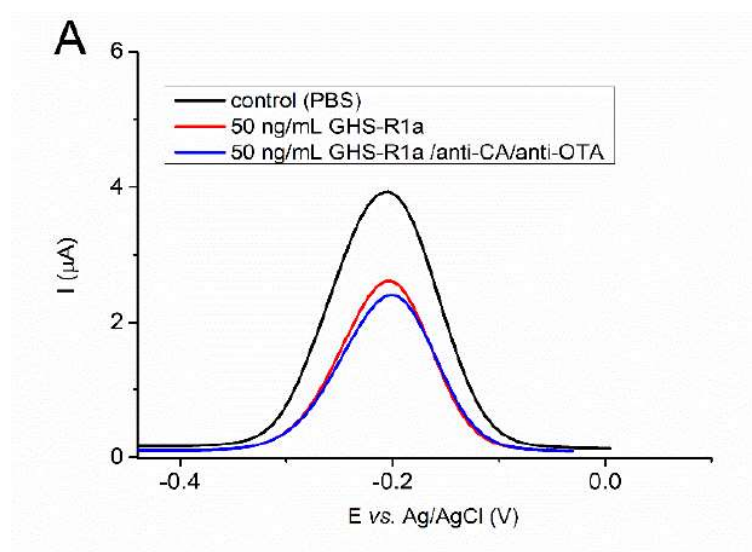


Figura 5-18 Teste de selectivitate pentru receptorul GHSR-1a în prezența anticorpilor nespecifici, anti-Ochratoxin A și anti-Cloramfenicol.

CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE

Teza de doctorat a avut drept obiectiv dezvoltarea unor formate de afinitate pentru detecția rapidă, de tip *screening* a unor compuși peptidici și non-peptidici a căror administrare conduce la îmbunătățirea performanțelor sportive. În acest scop, s-au dezvoltat formate de detecție pentru compuși mimetici ai grelinei cum ar fi agonistul peptidic CJC-1295-DAC, invers agonistului [D-Arg¹,D-Phe⁵,D-Trp^{7,9},Leu¹¹]-Substanța P, antagonistul peptidic reprezentat de [D-Lys³]-GHRP-6 și cei doi antagoniști cu structură non-peptidică: YIL-781 și L-692,585, exploatând interacția specifică cu receptorul secretagog al hormonului de creștere, GHS-R1a. Protocolul de analiză a permis o mai bună înțelegere a mecanismului de interacțiune a receptorului secretagog cu liganzii extracelulari.

S-au estimat constantele de afinitate ligand/receptor și s-a putut efectua detecția în probe diluate de urină, care nu necesită o prelucrare prealabilă. Limitele de detecție obținute au fost: pentru [D-Lys³]-GHRP-6 – 29,0 ng/mL, iar pentru YIL-781 – 27,0 ng/mL.

Antagoniștii GHSR-1a, în concentrații mici, activează receptorul și nu îi blochează activitatea. Efectul de potențare a activității receptorului are un impact major în metabolismul uman și poate fi aplicat în controlul greutateii și a reducerii masei adipoză, dar și în tratarea tulburărilor de alimentație.

S-au studiat profilele de afinitate ale agonistului peptidic CJC-1295-DAC și al invers agonistului [D-Arg¹,D-Phe⁵,D-Trp^{7,9},Leu¹¹]-Substanța P. S-au estimat constantele de afinitate folosind analiza de regresie neliniară. Limitele de detecție au fost: pentru [D-Arg¹,D-Phe⁵,D-Trp^{7,9},Leu¹¹]-Substanța P – 23,0 ng/mL, pentru CJC-1295-DAC - 56,0 ng/mL.

Formatul de analiză bazat pe analiza profilelor de afinitate a dat rezultate și în cazul a doi canabinoizi testați, CBD și carboxi-THC. Aceștia funcționează ca modulatori alosterici ai receptorului GHSR-1a, ceea ce reprezintă o noutate în domeniu. Prin această metodă se pot detecta CBD și metabolitul principal al THC în probe diluate de urină. Limitele de detecție au fost: pentru CBD – 5,1 ng/mL și 3,7 ng/mL pentru carboxi-THC, iar rezultatele experimentale au fost validate cu ajutorul tehnicii GC-MS/MS (tehnica cromatografică impusă ca standard laboratoarelor de control doping pentru detecția metaboliților de THC).

În ultimul capitol s-au studiat proprietățile conductoare ale unei secvențe peptidice formată din 9 aminoacizi în vederea dezvoltării unui biosenzor electrochimic de afinitate pentru detecția agoniștilor grelinei. Peptida a fost depusă pe un electrod de aur, formând un film subțire la suprafață. Imobilizarea controlată a markerului redox, *Methylene Blue*, pe suportul peptidic a fost

monitorizată prin tehnici voltametrice (CV, ACV și SWV) care au confirmat ulterior existența și stabilitatea stratului pepidic la suprafața electrodului de aur.

Agonistul peptidic, CJC-1295-DAC și receptorul GHSR-1a, au fost utilizați cu succes pentru a ilustra posibilitatea de detecție electrochimică a interacției specifice dintre cei doi analiți. Senzorul nu necesită marcarea liganzilor sau a moleculelor țintă, iar detecția se bazează pe scăderea de semnal înregistrată pentru markerului redox, MB. Limita de detecție determinată a fost de 14,4 ng/mL.

Rezultatele prezentate în teză au fost publicate astfel:

Articole în reviste cotate ISI

1. Early detection of growth hormone secretagogue receptor antagonists exploiting their atypical behavior in competitive assays, **George Mădălin Dănilă**, Mihaela Puiu, Lucian-Gabriel Zamfir, Camelia Bala, *Analytical Chemistry*, **2019**, 91(23), 14812-14817 (Factor de impact: **6,785**)
2. Early detection of cannabinoids in biological samples based on their affinity interaction with the growth hormone secretagogue receptor, **George Mădălin Dănilă**, Mihaela Puiu, Lucian-Gabriel Zamfir, Camelia Bala, *Talanta*, **2021**, 237:122905 (Factor de impact: **6,057**)
3. Label-free detection of target proteins using peptide molecular wires as conductive supports, Mihaela Puiu, Lucian-Gabriel Zamfir, **George Mădălin Dănilă**, Francesco Papi, Cristina Nativi, Valentin Mirceski, Camelia Bala, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2021**, 345, 130416 (Factor de impact: **7,460**)

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- ABD-ELSALAM, W. H., ALSHERBINY, M. A., KUNG, J. Y., PATE, D. W. & LÖBENBERG, R. 2019. LC-MS/MS quantitation of phytocannabinoids and their metabolites in biological matrices. *Talanta*, 204, 846-867.
- ALVES, P., AMARAL, C., TEIXEIRA, N. & CORREIA-DA-SILVA, G. 2020. Cannabis sativa: Much more beyond $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. *Pharmacological Research*, 157, 104822.
- CONN, P. J., CHRISTOPOULOS, A. & LINDSLEY, C. W. 2009. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 41-54.
- HOLST, B., CYGANKIEWICZ, A., JENSEN, T. H., ANKERSEN, M. & SCHWARTZ, T. W. 2003. High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Molecular Endocrinology*, 17, 2201-10.
- KLIMUNTOWSKI, M., ALAM, M. M., SINGH, G. & HOWLADER, M. M. R. 2020. Electrochemical sensing of cannabinoids in biofluids: A noninvasive tool for drug detection. *ACS Sensors*, 5, 620-636.
- PUIU, M., ZAMFIR, L.-G., BUICULESCU, V., BARACU, A., MITREA, C. & BALA, C. 2018. Significance testing and multivariate analysis of datasets from surface plasmon resonance and surface acoustic wave biosensors: prediction and assay validation for surface binding of large analytes. *Sensors*, 18.
- SARTORE, D. M., VARGAS MEDINA, D. A., COSTA, J. L., LANÇAS, F. M. & SANTOS-NETO, Á. J. 2020. Automated microextraction by packed sorbent of cannabinoids from human urine using a lab-made device packed with molecularly imprinted polymer. *Talanta*, 219, 121185.

- SEBAUGH, J. L. 2011. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10, 128-134.
- SREERAMA, N. & WOODY, R. W. 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference Set. *Analytical Biochemistry*, 287, 252-260.
- WHITMORE, L. & WALLACE, B. A. 2008. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*, 89, 392-400.