



AZIONE BIOTECH 3 TEMA 14

ISIB/CNR



ATI 1 (bioFutura S.r.l. Portogruaro-VE /Tectronik SRL Limena-PD)

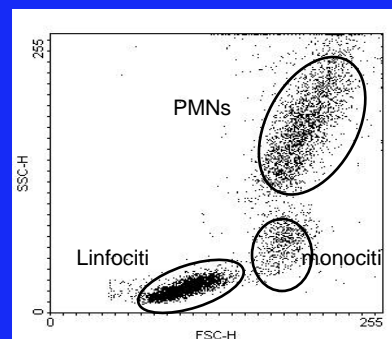
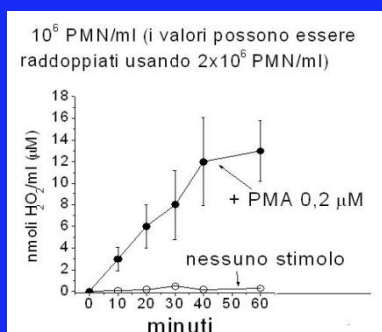
RYR2

KIT DIAGNOSTICO FUNZIONALE PER L'IDENTIFICAZIONE DI PORTATORI DI RYR2 MUTANTI, AFFETTI DA CARDIOPATIA ARITMOGENA, BASATO SU IMMUNO-ADSORBIMENTO SELETTIVO LEUCOCITARIO E BIOSENSORI SPECIFICI

L'obiettivo del progetto è di studiare un sistema di allarme, e verificare le tecniche impiegabili successivamente per la realizzazione di un kit di semplice operatività da utilizzare come screening per individuare i pazienti portatori di mutazioni a carico del gene RyR2. Il Kit probabilmente sarà composto da una serie di supporti, reagenti e contenitori per la fase di preparazione del campione di sangue e da una successiva lettura della nuova matrice, attraverso un sensore amperometrico della quantità di H₂O₂ prodotta dalle cellule.

Il razionale di questo progetto si basa sulla ipotesi che i leucociti polimorfo nucleati neutrofilo (PMN) da pazienti portatori di RyR2 mutato potrebbero essere più sensibili a dosi sub-ottimali di stimoli a causa dei livelli basali citosolici di Ca₂₊ più elevati rispetto ai sani. Questo dovrebbe risolversi in una maggior produzione di H₂O₂ (a dosi basse di agonista) e in una maggiore sensibilità allo stimolo acuto citotossico (a dosi elevate di agonista) con maggiore rilascio di metaboliti misurabili intracellulari (piruvato). H₂O₂ è stato scelto come parametro di elezione dell'attivazione e della tossicità acuta cellulare, data la immediata misurabilità mediante sensori e biosensori elettrochimici con la superficie trattata in modo specifico per rilevamento selettivo di unico analita. Nella prima fase della ricerca presso i laboratori del CRIBI dell'Università di Padova si sono messi a punto i sistemi per l'isolamento da sangue di donatori normali di PMNs, mediante gradiente su Ficoll Hypaque, e lisi dei globuli rossi mediante shock osmotico (0,2% NaCl). Tuttavia si è anche cercato di verificare se sia possibile ottenere una popolazione di leucociti da quantità di sangue comparabili a quelle ottenibili da puntura come prevedibile dal saggio che si intende sviluppare.

Infatti il prodotto che si vuole creare dovrebbe essere prontamente applicabile senza particolari o abbondanti prelievi dagli sportivi.



La messa a punto di un elettrodo modificato composito ha costituito un problema complesso ma necessario al fine di aumentare la sensibilità del sistema sensoristico all' H₂O₂ . Vi sono infatti molte variabili da considerare, quali la scelta del supporto elettrodico, la geometria dell'elettrodo, il tipo di legante polimerico e le proporzioni tra la specie elettroattiva e il legante polimerico. Abbiamo inoltre introdotto l'uso di argille nella preparazione dei sensori; esse possiedono caratteristiche interessanti come matrici per l'immobilizzazione enzimatica, ma anche un ottimo artificio per aumentare l'idrofilità di una superficie e contemporaneamente aumentarne la rugosità. Tra le altre caratteristiche di questi materiali vi sono quelle di avere un alto contenuto d'acqua che crea un ambiente biocompatibile per le molecole incorporate, permettono un'elevata mobilità dell'analita e del prodotto di reazione, non sono tossiche e presentano un'elevata stabilità chimica e idrolitica.

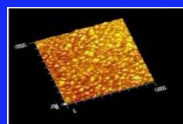
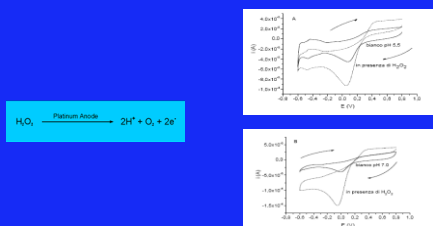
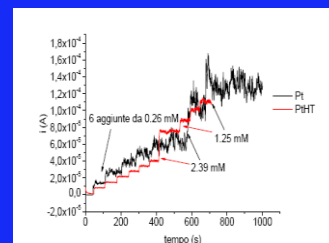


Immagine 3D ottenuta con AFM della topografia di una superficie di HT Ni/Al-NiO₃ su Pt. Dimensioni dell'area scansionata: 10 µm x 10 µm



Con le figure sopra riprodotte intendiamo riassumere velocemente alcuni passaggi del progetto che hanno riguardato lo studio e la preparazione del miglior sensore realizzato: la reazione chimica in gioco, le voltammetrie cicliche degli elettrodi scelti, la cella di lettura utilizzata, un'immagine AFM della superficie elettrodica realizzata e i responsi cronoamperometrici ottenuti per aggiunte successive di H₂O₂ ad un elettrodo di Pt e ad un elettrodo di Pt modificato con elettrodeposizione di HT (Pt-HT).

Si può così chiaramente notare che la presenza dell'HT consente di ottenere un miglior rapporto segnale/rumore per il segnale amperometrico dovuto all'ossidazione di H₂O₂, grazie ad un'evidente riduzione del rumore di fondo.

RISULTATO: L'obiettivo del progetto di verificare e studiare tecniche di manipolazione cellulare e tecniche elettrochimiche di lettura di tracce da affiancare alle prime è stato raggiunto. Abbiamo dimostrato che l'obiettivo tecnologico, cioè lo sviluppo di un kit microbiologico/elettrochimico potrà essere raggiunto.