

**42**

**GIUSEPPE PALLESCHI**

# **Biosensori in Medicina**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche  
Università di Roma "Tor Vergata"  
Via Orazio Raimondo  
Roma

Direttore Responsabile  
**Sergio Rassu**

 **MEDICAL  
SYSTEMS S.P.A.**

---

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. (010) 80.80.51

## ISTRUZIONI PER GLI AUTORI



**INFORMAZIONI GENERALI.** *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

**TESTO.** La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi ed allo stesso tempo chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare solo proprie personali opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

**FRONTESPIZIO.** Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono e fax) responsabile della corrispondenza.

**BIBLIOGRAFIA.** Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2) Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

**TABELLE E FIGURE.** Si consiglia una ricca documentazione iconografica esplicativa (in bianco e nero eccetto in casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure devono essere realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, quando pubblicati, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro ed in particolare dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

**UNITÀ DI MISURA.** Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

**ABBREVIAZIONI.** Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

**PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA.** Riporre le fotografie e le diapositive in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh, se MS-DOS il testo dovrà essere in formato RTF ed i grafici in formato PC.TIF o PC.Paintbrush.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con una lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

**Dott. Sergio Rassu**  
**Via Pietro Nenni, 6**  
**07100 Sassari**

## Editoriale

*Affrontiamo in questo volume un argomento che avrà sicuramente degli sviluppi notevolissimi in campo medico e che non mancherà di influenzare comportamenti e metodologie future.*

*I biosensori si pongono infatti per la loro semplicità, economicità e precisione come un punto di riferimento obbligato nel campo diagnostico.*

*Il dottor Palleschi, che abbiamo invitato per chiarire questo affascinante problema ha una enorme esperienza in questo campo. Allievo del Professor Mascini, lavora presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche dell'Università Tor Vergata a Roma. Si occupa di questi problemi da oltre dieci anni ed ha pubblicato tantissimi articoli e revisioni sull'argomento.*

*Il dottor Palleschi ha maturato una notevole esperienza a livello internazionale lavorando per un anno negli Stati Uniti a fianco del Professor Guilbault, quindi "visiting scientist" in Giappone presso il Professor Karube ed a Cranfield in Inghilterra presso il Professor Higgins. Ha tenuto e tiene conferenze in Italia ed all'estero su questo argomento, è stato "invited speaker" in molti congressi internazionali ed invitato a tenere seminari sulle applicazioni dei biosensori in Medicina presso la Pace University di New York, le Università di New Orleans, Oxford, Manchester, Newcastle, Cranfield e presso il Centro di Biotecnologie del Tokyo Institute of Technology. Fa parte ancora del Gruppo Europeo dei Biosensori finanziato dalla CEE per la tematica "Biosensors for in vivo monitoring".*

*La competenza quindi del nostro Autore fa di questo volume un sicuro riferimento per capire questo interessantissimo settore della Medicina.*

Sergio Rassu



## Introduzione

Un biosensore può essere definito come un dispositivo analitico contenente un sistema biologico reattivo in intimo contatto con un trasduttore di segnale. Generalmente il sistema biologico è un enzima, più enzimi, anticorpi, componenti di membrane biologiche naturali o artificiali, batteri, cellule, tessuti viventi animali o vegetali. Questi sistemi interagiscono con il substrato che si vuole misurare e sono i responsabili della specificità del sensore. Il segnale che viene fuori dalla interazione di questi sistemi biologici con l'analita può essere un elemento o composto chimico elettroattivo ed allora il segnale sarà di tipo elettrodico (elettodi, semiconduttori ecc.). Se il segnale è di tipo luminoso si utilizzerà un sensore ottico, se di tipo calorico il sensore potrà essere un termistore, se il segnale genera onde sonore la misura verrà effettuata con un sensore acustico. La nascita dei biosensori risale all'inizio degli anni sessanta quando Clark e Lyons (1962) introdussero il concetto di usare un enzima accoppiato con un elettrodo come reagente. Alcuni anni dopo Updike ed Hicks (1967) prepararono il primo elettrodo ad enzima utilizzando la glucosio ossidasi immobilizzata su un gel e posta su di un sensore elettrochimico. Con questo sensore si è misurata la concentrazione di glucosio in soluzioni biologiche. La semplicità nell'usare questo sensore ad enzima ne ha fatto crescere vertiginosamente il numero. Al giorno d'oggi ogni grande industria chimica, clinica, farmaceutica o ad indirizzo biotecnologico ha uno o due progetti riguardanti lo sviluppo dei biosensori. Inoltre sono già disponibili sul mercato elettrodi ad enzima e strumenti per scopi clinici od industriali utilizzando biosensori.



## Biosensori elettrochimici

Attualmente la ricerca sullo sviluppo e applicazione dei biosensori è portata avanti da molti gruppi internazionali seguendo diverse strade e con differenti approcci nelle scelte e del mediatore biologico e del trasduttore di segnale, ma i biosensori che offrono migliori garanzie per le applicazioni analitiche in termini di sensibilità, riproducibilità e selettività sono quelli elettrochimici. Essi sono i soli al giorno d'oggi ad essere commercializzati per scopi clinici, sono relativamente facili da assemblare ed hanno tempi di vita abbastanza lunghi per gli usi cui sono destinati. Un biosensore elettrochimico è formato da un trasduttore di segnale elettrico chiamato generalmente elettrodo e da un sistema biologico, che quasi sempre è un enzima immobilizzato sulla sua superficie. Il principio di funzionamento di un sensore così preparato è il seguente: una specie chimica, non elettroattiva, reagisce con l'enzima immobilizzato sulla superficie dell'elettrodo. Il prodotto di questa reazione è un elemento o composto elettroattivo che diffonde sulla superficie elettrodica e genera un segnale elettrico che viene rilevato da uno strumento e messo in relazione alla concentrazione del metabolita in esame.

In Fig. 1 è illustrato lo schema di funzionamento di un biosensore elettrochimico. La grande sensibilità ed affidabilità di questi biosensori deriva dal fatto che l'enzima è nella maggior parte dei casi estremamente specifico per la specie che si vuol misurare, mentre l'elettrodo è selettivo per il prodotto elettroattivo. Questo è indubbiamente un enorme vantaggio poichè consente di applicare i biosensori in matrici cosiddette "sporche" dove altri metodi di analisi richiederebbero procedure lunghe e molto complicate. Gli elettrodi che normalmente si utilizzano per assemblare biosensori elettrochimici sono di due tipi: amperometrici e potenziometrici.

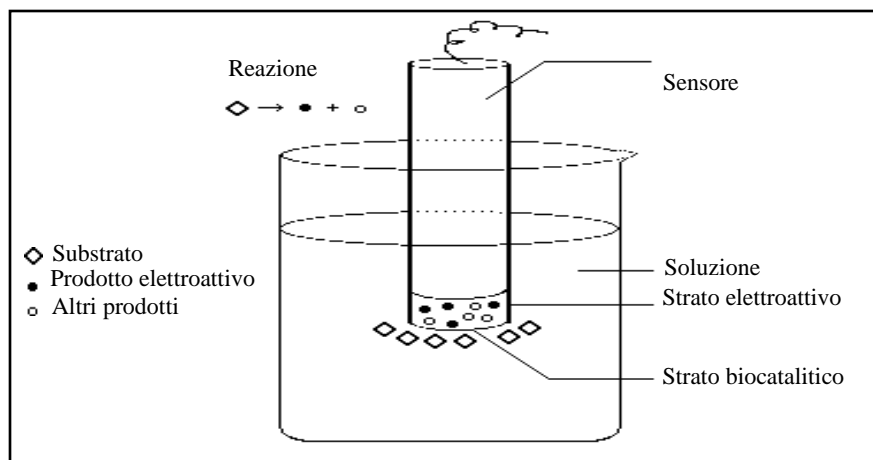


Figura 1. Principio di funzionamento di un biosensore elettrochimico. Una sostanza da determinare ( $\diamond$ ) reagendo con lo strato biocatalitico può generare un prodotto elettroattivo ( $\bullet$ ) che a sua volta interagisce con il sensore generando un segnale elettrico proporzionale alla concentrazione della specie in esame.

## Sensori amperometrici.

Una misura amperometrica consiste nel rilevare una corrente che passa tra due elettrodi ai quali è stata applicata una differenza di potenziale che viene mantenuta rigorosamente costante. Gli elettrodi sono chiamati rispettivamente elettrodo di lavoro ed elettrodo di riferimento; l'insieme dei due elettrodi immersi nella soluzione da misurare è chiamato cella elettrochimica. Tra i due elettrodi normalmente passa una corrente di valore costante. Se in soluzione avviene una reazione tale da produrre o da consumare una specie elettroattiva e quest'ultima interagisce a quel dato potenziale applicato con l'elettrodo di lavoro, si produrrà una variazione di corrente che verrà registrata da uno strumento connesso con gli elettrodi. Questa variazione di corrente è linearmente correlata alla variazione della concentrazione della specie che si sta misurando. I sensori amperometrici più importanti sono l'elettrodo ad ossigeno, ad acqua ossigenata, elettrodi a carbone utilizzando mediatori ed elettrodi a NADH.

### Elettrodi ad ossigeno

Un sensore ad ossigeno è mostrato in figura 2 e consiste in un elettrodo di lavoro di platino o di oro separato dall'elettrodo di riferimento d'argento da una resina epossidica isolante. I due elettrodi sono fissati in un contenitore di plastica con una soluzione

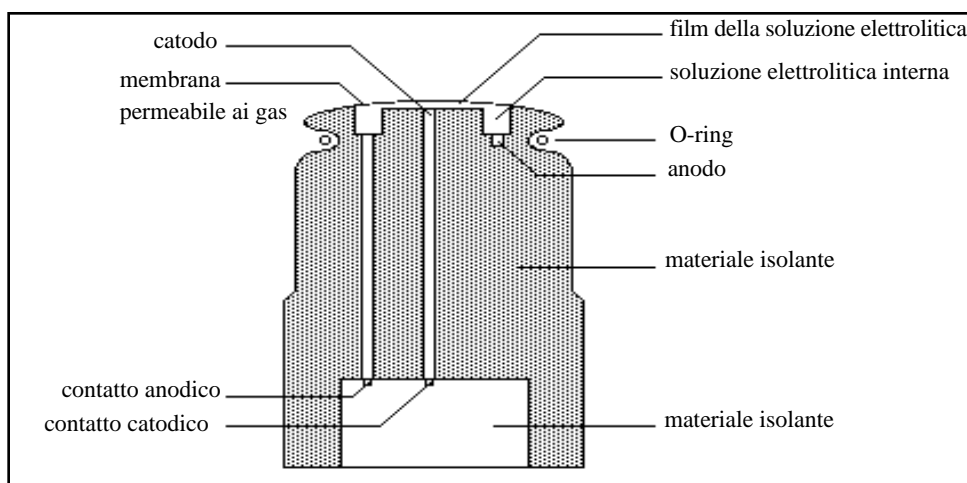
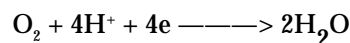


Figura 2. Schema di un sensore ad ossigeno. Il catodo rappresenta lo strato elettroattivo.

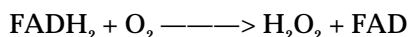
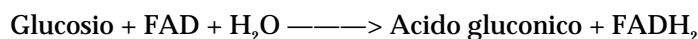
elettrolitica. Il tutto è separato dalla soluzione esterna, che contiene il campione da misurare, da una membrana permeabile solo ai gas. L'elettrodo di lavoro è mantenuto ad un potenziale di circa  $-0.8$  V rispetto all'elettrodo d'argento ed è schiacciato contro la membrana a gas al fine di ottenere una rapida risposta. In queste condizioni tra i due



elettrodi passa una corrente dovuta alla riduzione dell'ossigeno ad acqua secondo la seguente reazione:



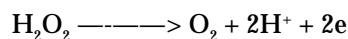
Nel paragrafo seguente verrà illustrata l'utilizzazione di questo sensore per la misura del glucosio. L'applicazione più interessante del sensore ad ossigeno è dovuta al suo accoppiamento con un gran numero di enzimi ossidasi. Dopo il classico lavoro di Clark e Lyons nel 1962 con l'enzima glucosio ossidasi, un gran numero di applicazioni è apparso in letteratura. Qui di seguito è riportato lo schema della reazione enzimatica per la determinazione del glucosio. La glucosio ossidasi catalizza la seguente reazione in due passaggi:



La glucosio ossidasi è immobilizzata sulla membrana a gas del sensore così l'elettrodo di lavoro compete con l'enzima per l'ossigeno molecolare; di conseguenza la corrente dovuta alla riduzione dell'ossigeno diminuisce all'aumentare della concentrazione del glucosio in soluzione.

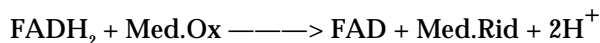
### Sensore ad acqua ossigenata

La stessa reazione catalizzata dalla glucosio ossidasi può essere utilizzata per monitorare la produzione di acqua ossigenata con un sensore specifico per quest'ultima specie. Questo sensore amperometrico è realizzato con la stessa configurazione di quello ad ossigeno solo che questa volta tra l'elettrodo di lavoro di platino e quello di riferimento è imposta una differenza di potenziale di +0.7 V. Il sensore ad acqua ossigenata è in diretto contatto con la soluzione da misurare, la sua selettività è dovuta ad una membrana di acetato di cellulosa che copre il sensore ed impedisce il passaggio a composti con peso molecolare superiore a 100-150 che potrebbero essere elettroattivi o che potrebbero avvelenare gli elettrodi. L'acqua ossigenata è ossidata all'elettrodo di lavoro secondo la seguente reazione:

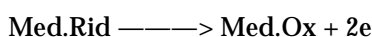


Anche in questo caso l'enzima è immobilizzato e tenuto il più vicino possibile l'elettrodo di lavoro, quindi l'acqua ossigenata che si forma dalla reazione enzimatica diffonde attraverso la barriera di acetato di cellulosa, raggiunge l'elettrodo di lavoro e produce una corrente proporzionale alla concentrazione del metabolita da analizzare. Un fattore limitante di questi sensori è che sono dipendenti dalla solubilità dell'ossigeno nelle soluzioni campione. Ciò potrebbe creare problemi specie quando si vuol misurare per esempio il glucosio nel sangue intero. In questo caso, essendo il glucosio presente in

concentrazione superiore a quella dell'ossigeno disciolto in soluzione, si perde la linearità di risposta tra la corrente e la concentrazione del metabolita. L'ostacolo può essere aggirato o rallentando la diffusione del glucosio oppure utilizzando dei sensori amperometrici indipendenti dall'ossigeno che utilizzano dei composti a basso peso molecolare detti mediatori. Questi composti si sostituiscono all'ossigeno e reagiscono con il  $\text{FADH}_2$  nel seguente modo:



mentre all'elettrodo di lavoro avviene la riossidazione del mediatore:



Attualmente il mediatore più idoneo è il ferrocene ed i suoi derivati (Cardosi e Turner 1987). Le applicazioni utilizzando questi composti verranno trattate in seguito. Un'altra classe di sensori amperometrici potenzialmente utilizzabili per scopi medici e di recentissimo sviluppo è quella degli elettrodi a NADH. Il NADH è una molecola coinvolta in circa 250 reazioni che utilizzano enzimi deidrogenasi. Questo cofattore enzimatico in presenza dell'enzima e del substrato passa dalla forma ossidata  $\text{NAD}^+$  alla forma ridotta NADH. Questa forma ridotta viene riossidata per via elettrochimica utilizzando un sensore amperometrico a grafite (Palleschi 1987).

## Sensori potenziometrici

Una misura potenziometrica consiste nel rilevare un potenziale di membrana tramite due elettrodi di riferimento posti da entrambi i lati della membrana stessa. Se un lato della membrana è immerso in una soluzione di riferimento a composizione chimica costante e l'altro lato è immerso in una soluzione che contiene una specie che interagisce selettivamente con essa, si produce ai capi della membrana una variazione di potenziale che viene registrata da un apposito strumento detto potenziometro. I sensori che consentono misure potenziometriche sono i cosiddetti elettrodi selettivi per ioni alcuni dei quali possono essere assemblati anche come elettrodi a gas. A questa classe di elettrodi appartiene l'ormai ben noto elettrodo a vetro per la misura del pH ed un certo numero di altri elettrodi tra cui quelli a sodio, potassio e calcio per citarne solo alcuni che ormai fanno parte della strumentazione clinica. Proprio l'elettrodo per la misura del pH risulta essere il più idoneo per l'assemblaggio come elettrodo a gas per determinare l'anidride carbonica e l'ammoniaca. Poiché molte reazioni enzimatiche producono ioni idrogeno, ammoniaca, anidride carbonica, cianuro, ioduro, ecc. sono stati utilizzati molti sensori potenziometrici accoppiandoli a questi enzimi (Mascini e Liberti 1974; Mascini e Palleschi 1982; Mascini e Palleschi 1983). La relazione che intercorre tra potenziale misurato e la concentrazione della specie in esame non è di tipo lineare come in amperometria bensì di tipo logaritmico (equazione di Nernst). Questo, se da un lato espande considerevolmente il "range" di misura (range ristretto a 1-2 decenni di concentrazione nella misura amperometrica) dall'altro diminuisce la sensibilità della

misura non consentendo un certo numero di applicazioni. Nella tabella 1 sono riassunti i sensori potenziometrici accoppiati con diversi enzimi, i substrati determinati e l'intervallo di concentrazione analizzato.

Sensore Elettrochimico	Enzima	Metabolita	Range di misura mmol/l
<b>vetro, pH</b>	ureasi	urea	0.05 - 5
	glucosioossidasi	glucosio	0.1 - 1
	penicillinasi	penicillina	0.01 - 3
	acetilcolina		
<b>antimonio, pH</b>	esterasi	acetilcolina	0.01 - 10
	ureasi	urea	0.1 - 10
<b>ISFET, pH</b>	ureasi	urea	1 - 1000
	glucosioossidasi	glucosio	1 - 50
	penicillinasi	penicillina	1 - 20
<b>sensore NH<sub>3</sub></b>	ureasi	urea	0.05 - 50
	glutaminasi	glutamina	0.05 - 5
	fenilalanina		
	ammonia liasi	fenilalanina	0.05 - 1
	asparaginasi	asparagina	0.1 - 10
	AMP deaminasi	5'-AMP	0.1 - 10
	fosfodiesterasi		
	+ AMP deaminasi	3',5'-AMP ciclico	0.01 - 10
<b>sensore CO<sub>2</sub></b>	creatinina diimino		
	idrolasi	creatinina	0.1 - 10
	ureasi	urea	0.1 - 10
	uricasi	acido urico	0.1 - 2.5
	enzimi		
	decarbossilasi	tirosina	0.1 - 2.5
		asparagina	0.1 - 10
<b>ammonio ISE (basato su scambiatore neutro)</b>		lisina	0.1 - 30
		glutammato	0.5 - 5
	ureasi	urea	0.01 - 10
	creatininasi	creatinina	0.01 - 5
<b>ioduro ISE redox</b>	asparaginasi	asparagina	0.01 - 1
	aminoacidoossidasi	amminoacidi	0.01 - 10
<b>redox</b>	lattato		
	deidrogenasi	lattato	0.1 - 1
<b>cianuro ISE</b>	β-glucosidasi	amigdalina	0.1 - 100

Tabella 1. Elettrodi Potenzialmetrici ad Enzima

## Mediatori biologici

Come già accennato possono essere diversi, i più usati attualmente per assemblare biosensori sono gli enzimi. La reazione base di un mediatore biochimico è in genere una reazione enzimatica; queste sono infatti molto specifiche, agiscono solo su determinati substrati in modo molto veloce e generano o consumano nel loro evolversi delle specie chimiche che possono essere selettivamente ed in modo assai sensibile determinate dai sensori elettrochimici. Nella tabella 2 sono elencati una serie di substrati di interesse biologico, chimico e farmaceutico che negli anni hanno costituito l'oggetto di ricerca per la realizzazione di "biosensori specifici".

Substrato	Catalizzatore	Specie	Sensore
Urea	Ureasi	NH <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	gas membr. liquida
Glucosio	Glucosioossidasi	O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Clark anodo platino
Galattosio	Galattosioossidasi	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	anodo platino
Amigdalina	β-glucosidasi	CN <sup>-</sup>	ISE
Colesterolo	Colesteroloossidasi	O <sub>2</sub>	Clark
Proteine	Proteasi+L-aminoac.os.	NH <sub>3</sub>	gas
Ac.Ascorbico	Ascorbatoossidasi	O <sub>2</sub>	Clark
Lattato	Lattatoossidasi	O <sub>2</sub>	Clark
Alcool	Alcooldeidrogenasi	NADH	catodo
Penicillina	Penicillasi	H <sup>+</sup>	vetro
Ossalato	Ossalatoossidasi	CO <sub>2</sub>	gas

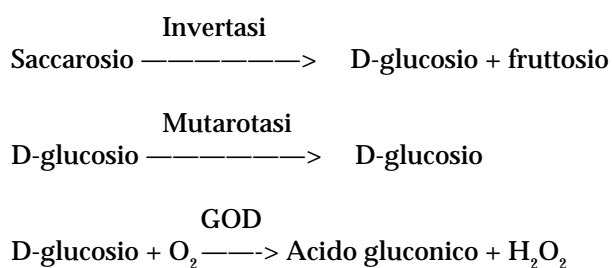
Tabella 2. Alcuni substrati che possono essere convertiti in specie chimiche individuate da sensori amperometrici e potenziometrici.

Fissando l'attenzione sul tipo di sensore elettrochimico utilizzato, troviamo appunto alcuni sensori potenziometrici (elettrodi a vetro, a cianuro, ad ammonio), alcuni sensori a gas potenziometrici come i sensori per ammoniaca (NH<sub>3</sub>) ed anidride carbonica (CO<sub>2</sub>); quindi sensori amperometrici come l'elettrodo di Clark (O<sub>2</sub>) e i sensori per acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e catodi di grafite per la riduzione del NAD<sup>+</sup>. Nella tabella 3 sono riportati i tipi di mediatore biochimico che sono stati utilizzati in ordine crescente per la loro complessità; infatti non sempre è sufficiente, o anche possibile utilizzare l'enzima cosiddetto "crudo"; talvolta più di un enzima è necessario alla trasformazione di una serie "sentita" da un sensore elettrochimico. Il caso più semplice è quello del

Substrato	Catalizzatore	Specie	Sensore
Urea	Enzima ureasi	$\text{NH}_4^+$	ISE liquida
Gluconato	Sequenza enzimi	$\text{CO}_2$	gas
Saccarosio	Sequenza enzimi	$\text{O}_2$	Clark
Glutammina	Mitocondri del tes.renale	$\text{NH}_3$	gas
Cisteina	Cellule batteriche	$\text{H}_2\text{S}$	gas
Glucosio	Lievito	$\text{O}_2, \text{CO}_2$	Clark, gas
Adenosina monofosfato	Tessuto muscolare del coniglio	$\text{NH}_3$	gas
BOD	Funghi, batteri	$\text{O}_2$	gas
Amigdalina	Tessuto stomaco lumaca	CN-	ISE
Glutammina	Tessuto rene maiale	$\text{NH}_3$	gas
$\text{H}_2\text{O}_2$ -ormoni	Tessuto fegato vitello	$\text{O}_2$	Clark
Glutamato	Tessuto vegetale	$\text{CO}_2$	gas

Tabella 3. Tipici accoppiamenti di biocatalizzatori e sensori elettrochimici

saccarosio dove sono necessari ben tre enzimi in sequenza per ottenere una relazione tra il saccarosio e l'ossigeno disciolto in soluzione:



Altri casi riguardano invece enzimi labili, che se usati in un ambiente più adatto, mitocondri, membrane cellulari, batteri, tessuti interi, sono molto stabili; infatti il tempo di vita è un parametro molto importante nella realizzazione di un sensore biochimico. Gli esempi riportati nella Tabella 2 non sono casuali, sono il frutto di lunghe ricerche che hanno portato a dei tipi di "mediatori biochimici" differenti. Alla base c'è sempre una reazione enzimatica, ma spesso l'enzima non è usato come tale in forma liofilizzata ma in un "ambiente" dove è protetto, dove sono presenti altri cofattori, altri enzimi, e dove appunto il tempo di vita è più lungo. Interessante è per esempio il paragone tra diversi

tipi di biosensori il cui “mediatore biologico” è la glutammina, un enzima demolitore della glutammina in ammoniaca. Si possono usare diverse “preparazioni”, diversi “mediatori biochimici”; la reazione enzimatica è sempre la stessa, ma la forma in cui in pratica, si realizza l'accoppiamento con l'elettrodo ad ammoniaca influenza molto il tempo di vita del sensore. Da uno sguardo alla Tabella 3 si vede come i ricercatori abbiano avuto molta fantasia nel selezionare alcuni batteri particolari. Nella Tabella sono inclusi solo alcuni esempi dei lavori realizzati negli ultimi anni, ma questi danno un'idea abbastanza precisa del ventaglio delle soluzioni realizzabili.

## Immobilizzazione di mediatori biologici

Vorrei ricordare alcuni tipi di immobilizzazione attraverso cui questi mediatori biochimici sono utilizzabili per i fini analitici a cui siamo interessati. In genere ciò è particolarmente importante nel caso di sistemi basati su enzimi data la loro solubilità in soluzione acquosa. Non ci sono infatti particolari problemi nell'immobilizzazione di una cultura batterica, in quanto le dimensioni dei batteri sono tali per cui un filtro di cellulosa è già un favorevole supporto per l'immobilizzazione. I metodi di immobilizzazione degli enzimi sono schematicamente indicati nella Figura 3; tra questi la pratica ha stabilito che la realizzazione più semplice è la immobilizzazione fisica di qualche mg

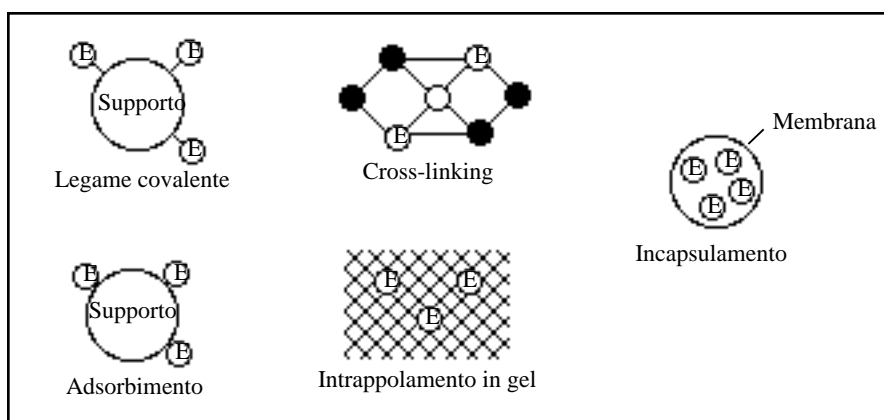


Figura 3. Schema di tecniche per la immobilizzazione di enzimi.

di enzima sulla superficie elettrodica, ottenuta semplicemente con una membrana da dialisi. E' un procedimento di tipo preliminare, che permette di sapere se la reazione a cui siamo interessati effettivamente avviene, e se la sua cinetica è compatibile con i tempi di risposta del sensore scelto; essa deve precedere sempre l'immobilizzazione ottenuta con altri sistemi generalmente di natura chimica. Viene descritta per questo in dettaglio. Si prepara un impasto viscoso mescolando l'enzima con acqua o con un'appropriata soluzione tampone (ad esempio 1 mg di enzima ed 1 µl di soluzione).

L'impasto così ottenuto è disteso sulla superficie elettrodica e lo strato coperto con una membrana da dialisi molto sottile (20-25  $\mu$  di spessore). L'elettrodo ad enzima così realizzato è stabile per circa una settimana purchè conservato, quando non è in funzione, a temperatura 5-10° C. Il procedimento è illustrato nelle sue fasi essenziali nella Fig. 4. La quantità di enzima da stratificare sulla superficie dell'elettrodo,

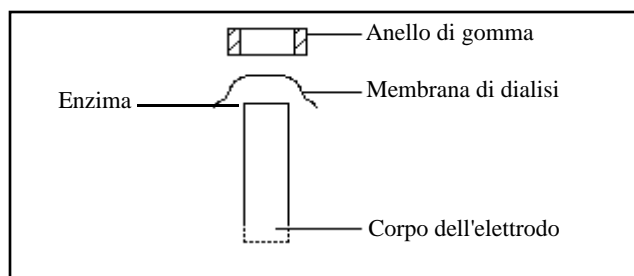


Figura 4. Preparazione di un elettrodo ad amigdalina. Il corpo dell'elettrodo ha gli angoli della sezione con la membrana arrotondati; 1 mg di enzima con 1  $\mu$ l di acqua sono stratificati direttamente sulla superficie; la membrana da dialisi è spessa 20  $\mu$ m;

possibilmente piatta, oscilla intorno a 1-10 mg pari a 10-15 unità. Lo spessore dello strato deve essere il più piccolo possibile per non impedire la diffusione delle specie elettroattive alla superficie dell'elettrodo e per eliminare il substrato rapidamente passando da un campione ad un altro a concentrazione diversa. Anche lo spessore della membrana da dialisi deve essere il più sottile possibile, pur mantenendo una struttura resistente. Spessori intorno ai 30  $\mu$  sono risultati i più efficienti. L'elettrodo così preparato deve essere tenuto in acqua o soluzione tampone in modo da mantenere la membrana di cellulosa umida e, quando non in uso, in frigorifero per una più lunga vita dell'enzima. Questo tipo di immobilizzazione è talvolta anche conveniente dal punto di vista analitico, poichè il processo di immobilizzazione non comporta una reazione dell'enzima. La diminuzione di attività nel tempo è dovuta a processi di demolizione spontanea degli enzimi con conseguente diffusione attraverso la membrana da dialisi, alla degradazione spontanea degli enzimi nella soluzione tampone durante la misura e alla stessa diffusione dell'enzima attraverso la membrana.

## Immobilizzazione di enzimi attraverso reazioni chimiche.

Negli ultimi anni si sono sviluppate diverse tecniche per insolubilizzare gli enzimi formando un legame di tipo covalente tra l'enzima e alcuni supporti insolubili (Guilbault 1985). Gli enzimi così legati hanno spesso una maggiore stabilità nel tempo ed il legame covalente con il supporto non è influenzato dall'ambiente esterno come pH, forza ionica, tipo di substrato e temperatura. Oggi infatti questo è il metodo più importante di immobilizzazione tenendo presente anche la semplicità di alcuni metodi di preparazione. Il legame è ottenuto tra i gruppi funzionali dell'enzima che non partecipano alla reazione enzimatica e che quindi non influenzano l'attività enzimatica

stessa, e quelli dei derivati reattivi di polimeri insolubili. In pratica si ottiene quasi sempre una parziale denaturazione dell'enzima a causa di reazioni casuali, anche perchè spesso non è affatto individuata la parte dell'enzima che determina la sua attività catalitica. Nella maggior parte dei casi quindi la scelta deve essere necessariamente sperimentale, ma nonostante ciò i risultati ottenuti invogliano a proseguire nella messa a punto di questa tecnica. Gli elettrodi ad enzima realizzati con questo sistema di immobilizzazione hanno come caratteristica peculiare una maggiore stabilità nel tempo; si passa cioè da tempi di vita di 1-2 settimane per gli elettrodi realizzati con il metodo di intrappolamento del precedente paragrafo a circa 1-6 mesi cioè un vero ordine di grandezza.

### Le reazioni di immobilizzazione.

La reazione in senso generale consiste in due fasi, che sono: la trasformazione o attivazione del composto insolubile in un derivato reattivo e la reazione tra i gruppi funzionali dell'enzima con questo derivato. Nella Tabella 4 sono riportati i composti più

Supporto	
Poliacrilammide	Collagene
Acido poliacrilico	Polivinil alcool
Carbossimetilcellulosa	Vetro poroso
Acido poliaspartico	Polistirene
Cellulosa	Sepharose
Acido poliglutammino	Sephadex
Nylon	
Polimeri Biocompatibili	
Poliuretani	Acetato di cellulosa
Acrilonitrile	

Tabella 4. Supporti insolubili utilizzati per la insolubilizzazione chimica di enzimi.

comuni utilizzati come supporti, essi sono composti inorganici come il vetro, polimeri naturali come la cellulosa o il collagene e polimeri artificiali. Questi composti sono attivati con opportune reazioni e quindi fatti reagire con gli enzimi. In genere i residui degli amminoacidi adatti alle reazioni di accoppiamento sono: i gruppi amminici in alfa ed in epsilon l'anello fenolico della tirosina, i gruppi carbossilici in  $\beta$  e, il gruppo solfidrilico della serina ed il gruppo imidazolico dell'istidina. Di questi i primi tre sono i più comunemente usati. La Tabella 5 mostra inoltre gli amminoacidi coinvolti nei metodi di immobilizzazione più comuni da questo esame conoscendo i siti attivi dell'enzima si potrà scegliere il metodo chimico più adatto per un particolare enzima. Questa è però ancora una strada teorica che, come spesso avviene nelle scienze chimiche, non rappresenta ancora l'alternativa rispetto alla sperimentazione, cioè al metodo del "trial and error".



Reattivo insolubilizzante	amminoacidi coinvolti nella reazione
Azide acido	Lis, Tir, Cis, Ser.
Sale di diazonio	Lis, His, Tir, Arg, Cis. Lis, His, Tir. Lis, Tir, Arg. His, Tir.
Glutaraldeide	Lis. Lis, His, Tir, Cis.
Derivato isotiocianato	Lis, Arg.
Diimmide	Lis, Tir, Cis, Asp, Glu.

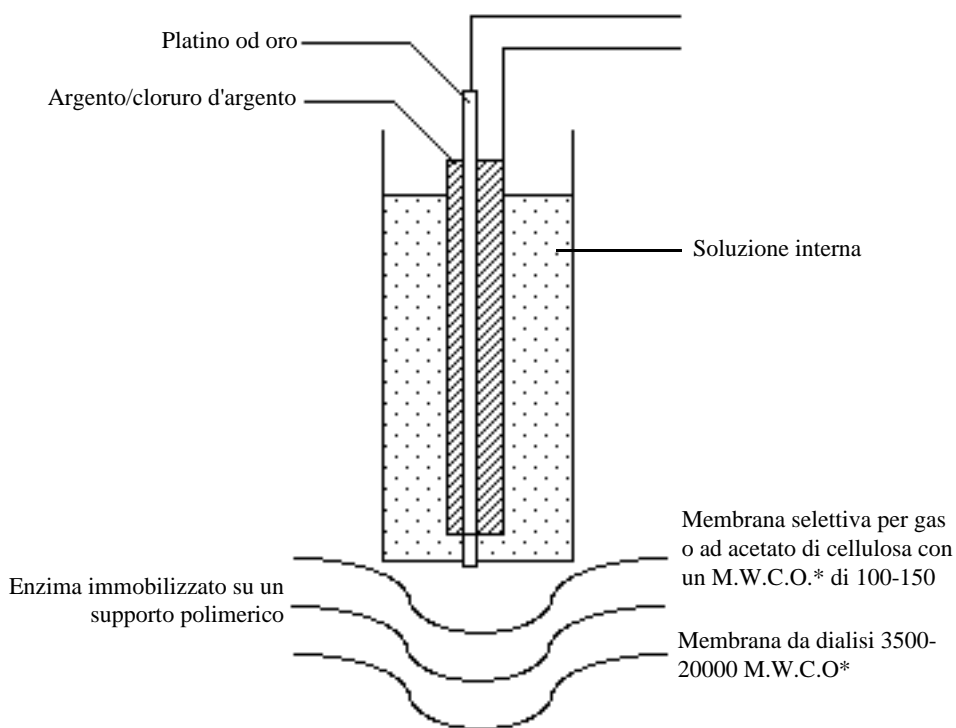
Tabella 5. Residui reattivi degli amminoacidi in alcuni metodi di insolubilizzazione chimica

## Membrane da dialisi.

Le membrane che si usano per preparare un elettrodo ad enzima giocano un ruolo molto importante specie quando si lavora con composti biologici (Palleschi e al. 1986). Nel caso dell'elettrodo ad ossigeno la membrana a gas è di per sé un'eccellente protezione per l'elettrodo di lavoro e di riferimento tanto è vero che tale sensore è definito come esente da interferenze di natura elettrodica. Per quanto riguarda il sensore ad acqua ossigenata sono state sviluppate delle membrane ad acetato di cellulosa che vengono poste sulla superficie del sensore. Queste membrane hanno lo scopo principale di proteggere gli elettrodi da specie interferenti cioè da composti elettroattivi che darebbero, se arrivassero all'elettrodo di lavoro, un segnale elettrico che falserebbe la misura in esame. Sostanze come l'acido ascorbico, l'acido urico, la glutatione, l'acetamminofene (componente attivo del Tylenol, negli USA comunemente usato come l'aspirina) vengono bloccate oppure il loro passaggio è fortemente rallentato da queste membrane consentendo ai sensori di eseguire misure su sangue intero, siero o plasma con buoni risultati. Un'altra classe di membrane sono quelle che hanno una permeabilità tale da non far passare composti di peso molecolare superiore a 3.500. Questo ha un duplice vantaggio: da un lato protegge l'enzima da batteri, proteine e da altri composti che potrebbero assorbirsi; dall'altro impedisce all'enzima di fuoriuscire verso la soluzione specie nella messa a punto di immobilizzazioni fisiche.

## Assemblaggio di biosensori elettrochimici

Vediamo ora come si utilizzano tutti questi sistemi descritti per assemblare un biosensore. Il primo "step" consiste nell'immobilizzare il mediatore biologico sulla membrana dell'elettrodo che può essere o a gas (elettrodo ad ossigeno o a  $\text{CO}_2$  o ad  $\text{NH}_3$ ) oppure di acetato di cellulosa (elettrodo ad  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Nel caso in cui il mediatore biologico è immobilizzato su di una membrana polimerica allora si adagerà la stessa sulla membrana a gas facendo in modo che il mediatore copra il meglio possibile l'elettrodo di lavoro. Una terza membrana da dialisi con un "cut-off" tra 3.500-20.000 viene posta sulle prime due ed il tutto è saldamente tenuto da un anello di gomma o neoprene fissato attorno al sensore. Il sistema di assemblaggio è chiaramente illustrato in figura 5.



\*M.W.C.O. (molecular weight cut-off) è il peso molecolare massimo che le sostanze possono avere per poter attraversare la membrana.

Figura 5. Assemblaggio di un biosensore elettrochimico

# Applicazioni in Medicina

## Determinazione del glucosio.

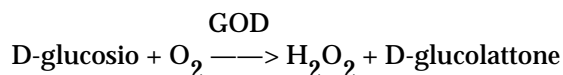
Circa il 5% della popolazione adulta dei paesi industrializzati ha il diabete. La Chimica Analitica ha avuto e tuttora gioca un ruolo molto importante nella lotta contro il diabete mellito (Turner e Pickup 1985). Sono stati sviluppati innumerevoli metodi di misura del glucosio ma la specificità della reazione enzimatica e la sensibilità e selettività dei sensori elettrochimici ha reso ormai popolare ed estremamente vantaggioso l'uso delle tecniche elettrochimiche. La Tabella 6 riporta i sistemi sviluppati in diversi paesi per la

Tecnica elettrochimica	Specie formata o consumata	Sensore elettrochimico	Mediatore biochimico
Potenziometria	H+	vetro	GOD*
Potenziometria	H+	FET	GOD
Amperometria	O <sub>2</sub>	Clark	GOD
Amperometria	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Platino	GOD
Amperometria	Ferrocene	Carbone	GOD
Potenziometria	F-	ISE	GOD
Amperometria	O <sub>2</sub>	Clark	lievito
Potenziometria	CO <sub>2</sub>	gas	lievito
Potenziometria	I-	ISE	GOD

\* Glucosioossidasi

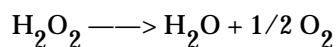
Tabella 6. Biosensori elettrochimici sviluppati per la misura del glucosio

misura del glucosio che utilizzano biosensori. Il principio di funzionamento è sempre basato sulla reazione catalizzata dalla glucosio ossidasi (GOD) come segue



Il sensore usato è un sensore ad ossigeno. In altri strumenti viene usato il sensore ad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e recentemente un sensore a carbone "mediato" con ferrocene. Questi strumenti sono stati realizzati principalmente per le analisi cliniche quindi essi analizzano campioni singoli, li diluiscono, ne analizzano la specie in esame ed infine confrontano i valori di corrente con quelli ottenuti misurando soluzioni standard di glucosio. Tuttavia uno dei più significativi problemi della misura del glucosio nel sangue è stato recentemente affrontato dalle industrie giapponesi. Nello strumento Gluco 20 A il sensore lavora con 20 µl di sangue intero non diluito e si è ottenuta una buona correlazione tra questo metodo e quello dell'esokinasi che utilizza invece il siero. Studi

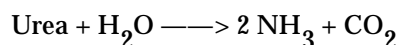
comparativi hanno però mostrato che i valori del glucosio nel sangue sono sempre il 13% più bassi di quelli presenti nel siero. Questa differenza è stata riscontrata anche con lo strumento Auto and Stat GA-1110 e usando il Glukometer GKM 01. Dai risultati ottenuti si è giunti alla conclusione che questa differenza di valori riflette nel caso del sangue intero non diluito, una indicazione incompleta dovuta al glucosio presente negli eritrociti. Usando infatti il sangue diluito 1/10 ed un metodo di misura differenziale basato sull' $\text{H}_2\text{O}_2$ , i risultati ottenuti con lo strumento Glukometer GKM 01 sono risultati in buon accordo con quelli ottenuti con il metodo di riferimento glucosio ossidasi-perossidasi. Il gruppo tedesco quindi ha suggerito la diluizione del campione al fine di ottenere una indicazione "reale" della concentrazione del glucosio nel sangue. Tuttavia alcuni laboratori di ricerca stanno ancora studiando su questo problema in quanto l'enzima catalasi presente nel sangue catalizza la seguente reazione:



quindi potrebbe competere per l'acqua ossigenata con un sensore basato sulla misura di questo metabolita.

## Determinazione dell'urea.

Come il glucosio, l'urea è stato il metabolita per il quale rapidamente si è sviluppato un metodo di misura che utilizza un biosensore. L'enzima usato per la determinazione dell'urea è l'ureasi che catalizza la seguente reazione:



Da una mole di urea quindi si ottengono due moli di ammoniaca ed una mole di anidride carbonica. A causa della  $\text{CO}_2$  endogena contenuta nel sangue la misura di questo metabolita viene eseguita utilizzando o un sensore ad ammonio o un sensore ad ammoniaca (gas). L'enzima ureasi è stato immobilizzato in diversi modi su questi sensori ed un innumerevole numero di analisi nel sangue, siero ed urine sono state eseguite con precisione ed accuratezza utilizzando i biosensori. Molti strumenti al giorno d'oggi sono disponibili per l'analisi dell'urea con elettrodi selettivi per ioni od elettrodi a gas. Il primo è stato introdotto dalla Kimble Division of Owen, Illinois. L'analizzatore usa un sensore ad  $\text{NH}_3$  accoppiato con l'enzima ureasi immobilizzato su di un supporto poroso a base di allumina. Il campione da analizzare passa prima attraverso l'enzima immobilizzato dove avviene la reazione enzimatica ad un optimum di pH controllato e di temperatura, in seguito, l'ammonio sviluppatosi dalla reazione enzimatica è convertito in ammoniaca ed inviato sotto la superficie sensibile del sensore che dà un segnale proporzionale alla concentrazione di urea. Lo schema di misura è illustrato in figura 6. Come si può osservare questa misura richiede una separazione tra la misura enzimatica e la misura elettrochimica. Ciò è dovuto al fatto che a pH elevati il sensore ad ammoniaca è al massimo della sensibilità perchè tutto l'ammonio presente nel campione è convertito in ammoniaca ma l'enzima a tali valori di pH si troverebbe

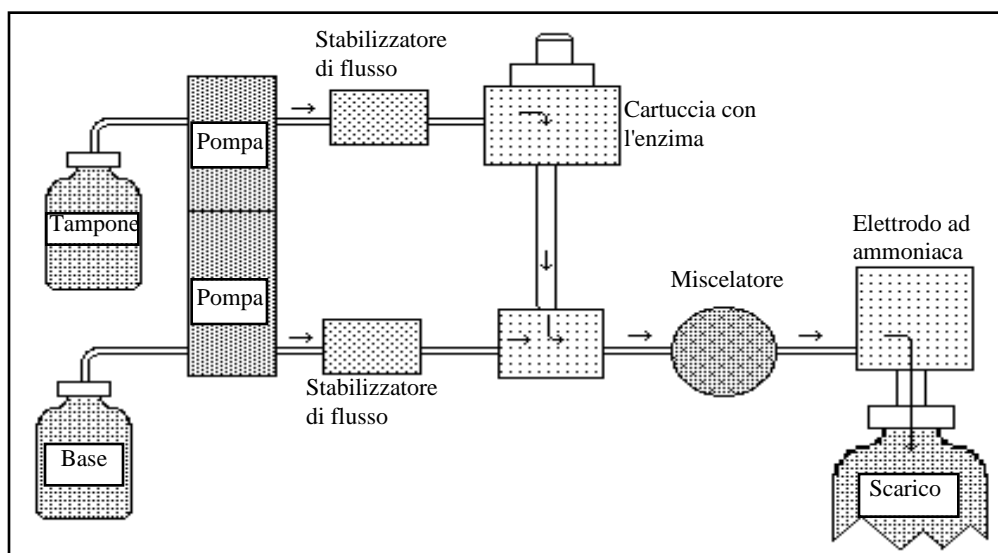


Figura 6. Diagramma di flusso e reazioni dell'analizzatore Kimble BUN per la misura dell'urea con un sensore ad ammoniaca.

al minimo della sua attività inoltre potrebbe denaturarsi. Questo problema è stato affrontato da Mascini e Palleschi (1983) nello studio della misura simultanea del glucosio ed urea con i rispettivi elettrodi ad enzima. La determinazione della azotemia e glicemia occupa il primo posto nella classifica delle analisi più frequenti nel laboratorio medico per cui sviluppare un metodo che misurasse entrambi i metaboliti contemporaneamente e nello stesso campione è apparsa subito di estremo interesse. E' stata utilizzata una cella dello strumento IL mod. 213 usata per la misura dell'ossigeno e della  $CO_2$  nel sangue all'interno della quale sono stati inseriti un sensore a glucosio ed uno ad urea (vedi schema Figura 7). E' stata quindi misurata l'attività dei due enzimi

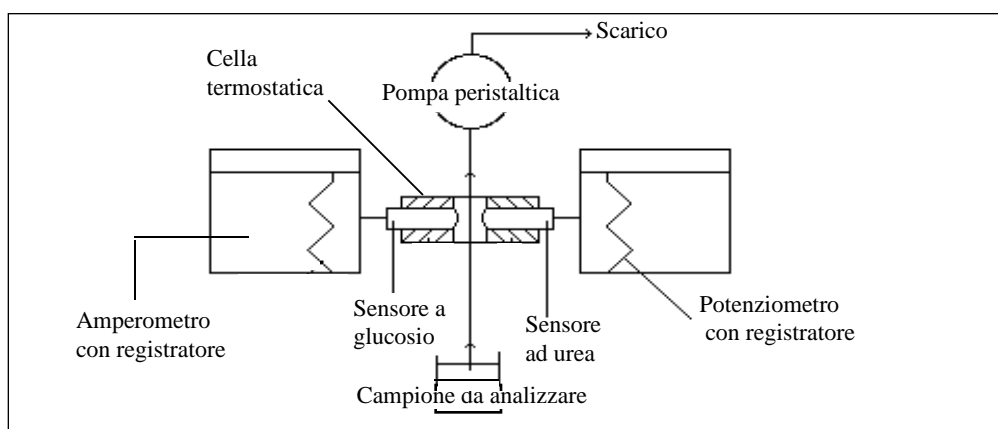


Figura 7. Sistema a flusso continuo per la determinazione contemporanea di glucosio ed urea nello stesso campione.

al variare del pH e si è visto che anche se l'attività degli enzimi diminuiva all'aumentare del pH l'attività residua a pH 8.3 consentiva l'analisi per entrambi i metaboliti nel siero con buona precisione ed accuratezza. Sono stati analizzati con questo metodo 20 sieri umani ed i risultati sono stati confrontati con un metodo di riferimento colorimetrico

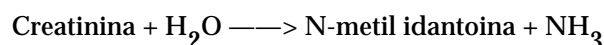
Siero	Spettrofotometria		Metodo proposto		errore(%)	
	Glucosio	Urea	Glucosio	Urea	Glucosio	Urea
	(mg dl-1)	(mg dl-1)	(mg dl-1)	(mg dl-1)		
1	130	30	133	30	0.8	0
2	307	31	308	31	0.3	0
3	84	40	86	38	2	5
4	92	62	96	60	4	3
5	66	26	68	24	3	8
6	90	38	94	36	4	6
7	88	8	81	37	8	5
8	103	37	104	35	1	6
9	105	22	106	24	1	8
10	105	24	103	24	2	0
11	100	42	102	40	2	5
12	88	34	86	33	2	3
13	91	51	94	57	3	12
14	89	39	89	37	0	5
15	102	24	105	34	3	41
16	94	50	101	48	7	4
17	135	48	149	41	10	14.5
18	140	42	156	37	11	12
19	64	38	67	31	5	18
20	80	35	85	34	6	3

Tabella 7. Analisi di glucosio ed urea in campioni di siero umano.

mostrando un'ottima correlazione (tabella 7). I tempi di analisi di 3 minuti per campione consentono quindi una velocità di analisi di 20 campioni per ora estremamente interessante in analisi d'urgenza ed in casi patologici particolari. Un'altra tecnica messa recentemente a punto da Luzzana ed al. (1983) consente di misurare anche se non contemporaneamente, glucosio ed urea con uno strumento che utilizza sensori. Il metodo è basato sulla misura differenziale del pH ed offre il vantaggio di eliminare tutte le interferenze di natura chimica presenti nei liquidi biologici. Uno strumento basato su questa tecnica (Delpas) è stato recentemente commercializzato. Attualmente lo strumento utilizza l'enzima in soluzione e necessita di frequenti lavaggi per la pulizia degli elettrodi, sono tuttavia in corso studi per lavorare con enzimi immobilizzati e proteggere i sensori.

## Determinazione della creatinina

Quando si è parlato della determinazione dell'urea con un sensore ad ammoniaca si è visto che lavorare a pH 8.3, era un buon compromesso per le prestazioni dell'elettrodo e dell'enzima ureasi; inoltre la concentrazione dell'urea nei campioni clinici è abbastanza elevata da assicurare una risposta lineare dell'elettrodo ad enzima nel "range" clinico normale e patologico. Nel caso invece della creatinina, essendo il "range" di concentrazione utile per le analisi cliniche troppo basso per la sensibilità dell'elettrodo ad  $\text{NH}_3$  a pH 8.3, si è usato un reattore enzimatico accoppiato con il sensore a gas. In questo modo il campione poteva reagire con l'enzima nel reattore al suo "optimum" di pH (7.35), poi la soluzione all'uscita del reattore veniva alcalinizzata a pH 12 consentendo di trasformare tutti gli ioni ammonio in  $\text{NH}_3$  aumentando considerevolmente la sensibilità della misura. L'enzima usato era la creatinina immuno idrolasi che catalizza la seguente reazione:



L'enzima immobilizzato su tubi di nylon è reperibile in commercio sotto il nome Clinibond. Lo schema di misura e della strumentazione usata è descritto in figura 8.

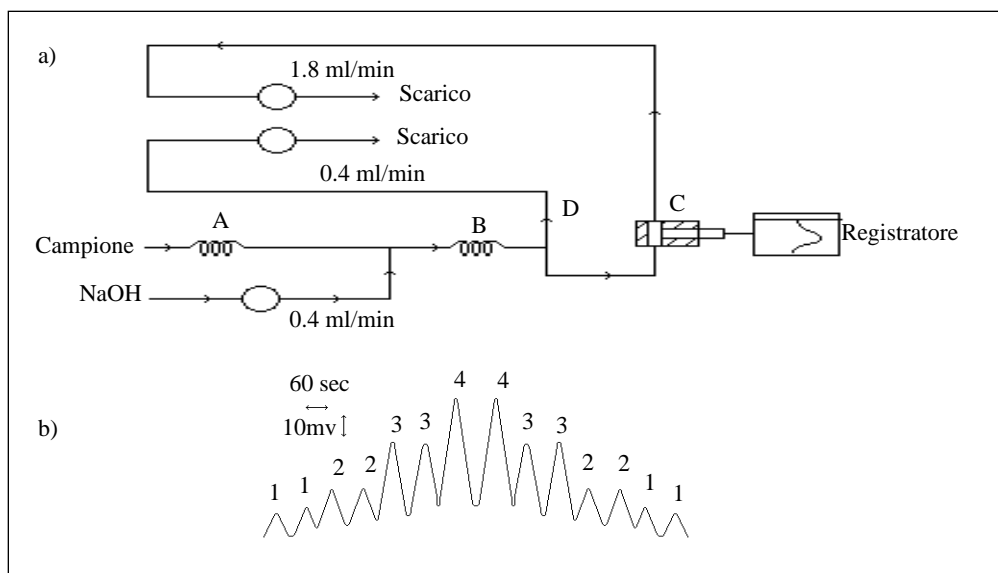


Figura 8. a. Schema a flusso continuo per la misura della Creatinina

A = Spirale con l'enzima creatininasi immobilizzato

B = Spirale di mescolamento;

C = Elettrodo ad ammoniaca

D = Degorgogliatore

b. Risultati dell'analisi in flusso ottenuti con campioni di creatinina

1=30  $\mu\text{M}$ ; 2=50  $\mu\text{M}$ ; 3=100  $\mu\text{M}$ ; 4=300  $\mu\text{M}$ .

Poichè la misura della creatinina nel sangue viene eseguita misurando l'ammoniaca bisogna non trascurare l'ammonio endogeno presente nel sangue stesso. Nel caso dell'urea questo problema non è stato preso in considerazione poichè i livelli di ammonio nei sieri erano sufficientemente bassi da essere trascurati rispetto all'ammonio proveniente dalla reazione enzimatica dell'ureasi. Nel caso della creatinina invece si sono trovati valori di ammonio nei sieri di controllo un ordine di grandezza più alti di quelli provenienti dalla reazione enzimatica. Ciò non è una novità in quanto è risaputo che nella misura dell'ammonio nel sangue i campioni devono essere processati non più tardi di mezz'ora dal prelievo; inoltre è preferito il plasma al siero in quanto l'effetto preservante dell'EDTA o dell'eparina impedisce il "breakdown" delle proteine fonte di produzione di ioni ammonio. Tuttavia anche analizzando il plasma non più tardi di mezz'ora dal prelievo non si è potuta trascurare l'ammoniaca endogena presente nel plasma per cui la misura della creatinina è stata eseguita prima misurando il contenuto di ammonio nel plasma senza inserire il reattore enzimatico, poi inserendolo, si è misurata l'ammoniaca totale (endogena + quella proveniente dalla reazione enzimatica), quindi per sottrazione si è calcolata l'ammoniaca residua proporzionale alla concentrazione di creatinina nel campione (Mascini e Palleschi 1982). Anche in questo caso si può evidenziare il fatto che con lo stesso apparato, utilizzando un sensore, si riesce a misurare due parametri importanti nell'analisi chimico clinica. In

Campione	Metodo Potenziometrico		Metodo Colorimetrico		Differenza (%)
	[NH <sub>3</sub> ] (x 10 <sup>-5</sup> M)	[Creatinina] (x 10 <sup>-5</sup> M)	[Creatinina] (mg dl <sup>-1</sup> )	[Creatinina] (mg dl <sup>-1</sup> )	
1	4.5	9.0	1.02	0.98	4
2	3.3	6.0	0.68	0.72	6
3	3.6	6.8	0.77	0.70	10
4	2.8	8.2	0.93	0.95	2
5	2.2	7.8	0.88	0.89	1
6	5.2	6.8	0.77	0.91	18
7	2.2	7.8	0.88	0.91	3
8	2.6	6.4	0.72	0.82	14
9	2.2	7.8	0.88	0.91	3
10	3.4	3.2	0.72	0.82	14
11	4.0	3.6	0.81	0.91	12
12	3.2	2.5	0.57	0.70	23
13	4.0	2.6	0.59	0.73	24
14	3.6	4.0	0.90	0.98	9

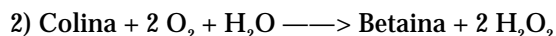
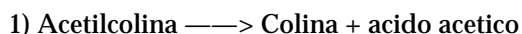
Tabella 8. Analisi della Creatinina in campioni di plasma umano. I valori sono stati ottenuti analizzando il campione non più tardi di 30 minuti dal prelievo.



tabella 8 sono riportate le analisi di 14 plasma e confrontati con un metodo di riferimento. La misura della creatinina con questa tecnica è stata eseguita anche nelle urine ma in questo caso è stato necessario usare una colonna scambiatrice di cationi per rimuovere l'alto contenuto di ioni ammonio presente nei campioni. Con questa procedura si è potuta eseguire l'analisi della clearance creatinina che risulta essere il test principale per la valutazione della funzione renale. Un miglioramento a questa tecnica è stato apportato in seguito da Mascini ed al. (1985 a.) inserendo nel campione di misura l'enzima glutammato deidrogenasi che in presenza del cofattore  $\text{NAD}^+$  consuma gli ioni ammonio in soluzione. Dopo la rimozione degli ioni ammonio la soluzione era dializzata tramite una membrana che impediva il passaggio dell'enzima glutammato deidrogenasi e veniva analizzata per la creatinina secondo la procedura precedentemente descritta. Il tutto era eseguito in flusso continuo e si potevano effettuare 20 analisi per ora.

## Determinazione della colina ed acetilcolina

L'acetilcolina è il primo neurotrasmettitore conosciuto e studiato mentre la colina è il suo metabolita. Vi è molto interesse nell'ambiente scientifico medico nella misura in vivo di neurotrasmettitori ma i sensori utilizzati sino ad ora non hanno le caratteristiche di selettività e sensibilità tali da effettuare misure di concentrazione così basse come quelle presenti nei tessuti cerebrospinali (ordine  $\mu\text{Molare}$ ). Una misura della colina ed acetilcolina nei tessuti nervosi si può eseguire con il metodo della cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC), però è necessario un lento lavaggio del campione prima dell'analisi. Una simultanea determinazione di entrambi i metaboliti in questione può essere eseguita utilizzando due sensori uno a colina ed uno ad acetilcolina direttamente sullo stesso campione (Mascini e Moscone 1986) utilizzando una cella a flusso continuo come quella utilizzata per la determinazione del glucosio ed urea. Le reazioni enzimatiche coinvolte in quest'analisi sono le seguenti:



La reazione 1) è catalizzata dall'enzima acetilcolinesterasi mentre la reazione 2) dall'enzima colina ossidasi. Per l'assemblaggio del sensore a colina, l'enzima colina ossidasi è stato immobilizzato su una membrana di nylon che poi è stata fissata sulla superficie di un elettrodo ad  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; un altro sensore ad  $\text{H}_2\text{O}_2$  è stato invece assemblato sempre con una membrana di nylon sulla quale sono stati immobilizzati l'enzima acetilcolinesterasi e l'enzima colina ossidasi ognuno su una faccia della membrana. Questi sensori si sono mostrati altamente selettivi per i metaboliti analizzati e possono essere utilizzati per misure negli estratti di tessuto nervoso. Infatti come si può vedere dalle figure 9 e 10 sia il sensore a colina che ad acetilcolina rispondono linearmente a concentrazioni di substrato  $10^{-6}$  molare che sono quelle presenti negli estratti di tessuto nervoso.

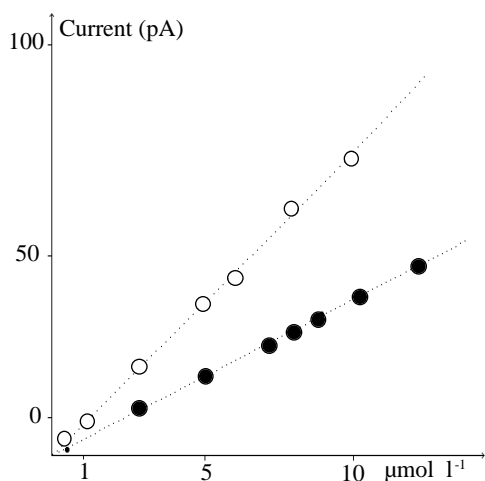


Figura 9. Calibrazione del sensore a colina in tampone glicina 0.1 M pH 9.0 a 25°C ( ○ ) soluzioni standard di colina; ( ● ) soluzioni standard di acqua ossigenata.

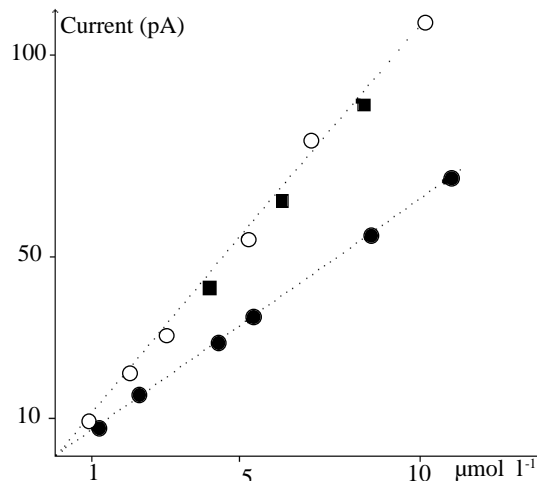
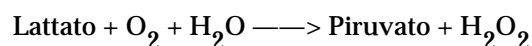


Figura 10. Calibrazione del sensore ad acetilcolina ( ○ ) acetilcolina; ( ■ ) colina; ( ● ) acqua ossigenata. Tampone glicina 0.1 M, pH 9.0 25°C.

## Determinazione dell'acido lattico

L'importanza della determinazione del lattato nel sangue è tenuta sempre più in considerazione dall'ambiente scientifico medico perchè è correlata a specifici stati patologici come shock, insufficienza respiratoria, malattie cardiache e principalmente per il suo coinvolgimento nel metabolismo del glucosio. Un settore particolare ove la misura dell'acido lattico riveste grande importanza è la medicina sportiva. Inoltre la misura del lattato nel fluido cerebrospinale è un parametro importante per discriminare tra meningite virale o purulenta e nella determinazione della diminuzione di ossigeno nel cervello. Per determinare il lattato con un biosensore amperometrico sono disponibili ben 4 enzimi, il più efficiente ed utile per applicazioni cliniche è stato l'enzima lattato ossidasi che catalizza la seguente reazione (Matsunaga e al 1982; Mascini e al 1985 b):



Quest'enzima è risultato essere altamente selettivo per il lattato, molto stabile nel tempo ed esente da interferenze come ad esempio gli ioni cloruro che sono invece risultati essere una severa interferenza per un altro enzima lattato ossidasi (Mascini e al 1984). Questo enzima è stato immobilizzato su di un sensore ad ossigeno e dopo aver "collaudato" l'elettrodo con soluzioni standard rientranti nel "range" di misura del lattato nel sangue, si è misurato il lattato in sieri umani e si è correlata la risposta del sensore con quella ottenuta con il metodo spettrofotometrico in uso nei laboratori clinici. I risultati sono mostrati in tabella 9. Esistono in commercio numerosi analizzatori per il lattato basati su elettrodi ad enzima.

Tipo di siero	Contenuto di lattato (mmol <sup>-1</sup> )		
	Valore nominale	Range	Valore trovato <sup>a</sup>
Precinorm U 4-567	3.53	3.10-3.94	3.79
Monitrol I E	3.02	2.72-3.32	3.15
Precipath U 2-512	2.17	1.91-2.42	2.18
Precipath U 14-517	1.63	1.47-1.79	1.72
Precipath U 3-518	1.84	1.60-2.20	1.86
Precinorm U 09558	1.68	1.48-1.88	1.83
Monitrol II E	2.33	2.08-2.59	2.35
Precinorm U3-577	1.75	1.54-1.97	1.72

<sup>a</sup> Media di tre determinazioni

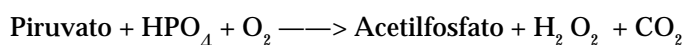
Tabella 9a. Determinazione del lattato in sieri ricostituiti reperibili in commercio.

Siero n	lattato trovato (mmol.l-1)	
	Metodo proposto	Metodo spettrofotometrico
1	2.15	2.10
2	2.66	2.40
3	2.81	2.53
4	2.85	2.40
5	2.51	2.03
6	2.70	2.31
7	3.40	3.20
8	2.28	2.10

Tabella 9b. Confronto dei risultati ottenuti nella misura del L-lattato in sieri umani ottenuti da un ospedale.

## Determinazione dell'acido piruvico.

L'acido piruvico è un metabolita coinvolto nella ossidazione dei carboidrati. In condizioni anaerobiche il piruvato insieme con il lattato aumenta nel sangue mentre in condizioni aerobiche i metaboliti vengono convertiti in anidride carbonica ed acqua. La concentrazione del piruvato nel sangue è molto importante essendo legata alla concentrazione del glucosio e del lattato ed alle loro variazioni che sono connesse con molti stati patologici. Lo sviluppo di un sensore per il piruvato è quindi visto con notevole interesse. L'enzima piruvato ossidasi è molto costoso quindi la prima cosa a cui si è pensato per la determinazione del piruvato è stato di immobilizzare l'enzima. La reazione catalizzata da quest'ultimo è la seguente:



Come si può vedere dalla reazione, possono essere usati per l'analisi del piruvato sia un sensore ad ossigeno che un sensore ad acqua ossigenata. Si potrebbe usare anche un sensore a CO<sub>2</sub>, però insorgerebbero problemi connessi con la CO<sub>2</sub> endogena che sarebbe un forte interferente essendo la concentrazione del piruvato nel sangue relativamente bassa. Per ottenere infatti un biosensore a piruvato è necessario usare un elettrodo ad acqua ossigenata perchè il "range" del piruvato nel sangue è tra 0.04 e 0.12 mmol/litro (Mascini e Mazzei 1987). Considerando che durante la misura il campione viene diluito almeno 10 volte, questo intervallo di concentrazione è troppo basso anche per il sensore ad ossigeno essendo il limite di determinazione per quest'ultimo intorno a 0.02 mmol/litro. La reazione enzimatica del piruvato procede in presenza di molti cofattori che la ottimizzano e che quindi devono essere aggiunti al campione prima della misura. L'enzima immobilizzato non è così stabile come per il lattato; si è ottenuto infatti un tempo di vita utile per l'analisi di un mese. Il sensore è stato usato quindi per l'analisi dei sieri umani ed i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con il metodo clinico di riferimento spettrofotometrico UV (tabella 10). Attualmente non sono in commercio strumenti per la misura del piruvato utilizzando biosensori.

Siero n.	piruvato trovato (mmol.l-1)	
	amperometrico	spettrofotometrico
1	0.34	0.35
2	0.28	0.27
3	0.26	0.28
4	0.30	0.28
5	0.29	0.30
6	0.31	0.29
7	0.12	0.10
8	0.15	0.16

Tabella 10. Confronto delle concentrazioni di piruvato trovate in campioni di siero utilizzando un metodo amperometrico ed uno spettrofotometrico.

## Determinazione delle proteine totali

L'importanza della determinazione delle proteine totali nel plasma e le cause che portano ad una variazione delle stesse sono argomenti noti e ben descritti in letteratura per cui non mi soffermerò su di essi. Descriverò invece questo metodo come un esempio di accoppiamento di due reattori enzimatici con un sensore a gas. Per la determinazione delle proteine totali si è utilizzata una tecnica di analisi articolata in tre fasi distinte: nella prima si realizza una idrolisi enzimatica delle proteine con formazione di un miscuglio di amminoacidi. Per questa fase si è utilizzato un enzima proteasi già immobilizzato su agarosio e reperibile in commercio, o una proteasi immobilizzata sulle pareti interne di un tubo di nylon. Gli L-amminoacidi formati nella prima fase reagiscono con un secondo enzima, la L-amminoacido ossidasi; anche in questo caso, in maniera analoga

alla precedente, si è immobilizzato l'enzima. Questa seconda reazione enzimatica porta alla formazione di ioni  $\text{NH}_4^+$ ; nella terza ed ultima fase vengono determinati gli ioni  $\text{NH}_4^+$  come  $\text{NH}_3$  mediante un sensore elettrodico ad ammoniacca. La quantità di ioni che si formano è proporzionale alla concentrazione proteica della soluzione biologica analizzata. Tutta questa sequenza di reazioni è stata realizzata usando un sistema a flusso continuo allo scopo di rendere ogni valutazione altamente riproducibile, manualmente pratica e veloce. I campioni scelti per le analisi in flusso sono stati soluzioni di albumina bovina e sieri standard. Le soluzioni di albumina bovina possono essere determinate nell'intervallo di concentrazione 10-1.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  con buona riproducibilità; l'intervallo dipende comunque da molti fattori quali velocità di analisi, quantità di enzima immobilizzato, tipo di immobilizzazione scelto. Nel nostro caso si è cercato di ottimizzare tali fattori per applicazioni cliniche. I valori totali delle proteine del plasma sono compresi in un intervallo di 6-8 g per 100 ml e comprendono, quindi, un'ampia gamma se si tiene conto che per questi composti i limiti della variabilità patologica sono assai più ristretti che in molti altri casi. Le cause che portano ad una variazione delle proteine plasmatiche possono essere molte e sono descritte in letteratura. La prima fase di questo lavoro consiste nell'analisi in flusso continuo di L-amminoacidi. In figura 11 è schematizzato l'intero sistema. La soluzione di L-amminoacidi viene inviata in flusso

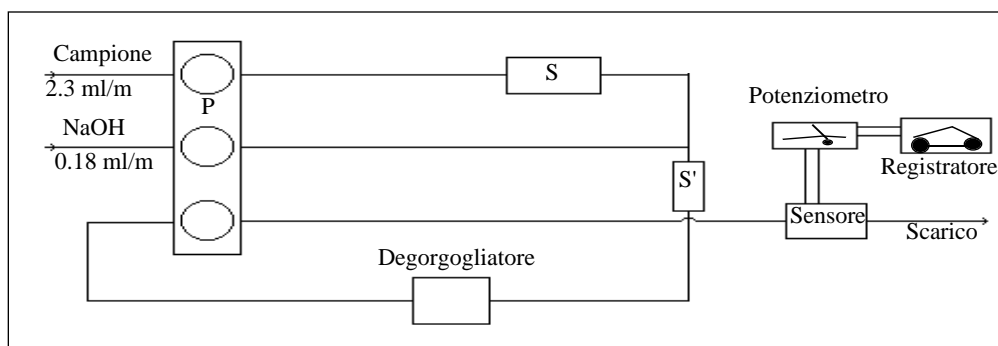
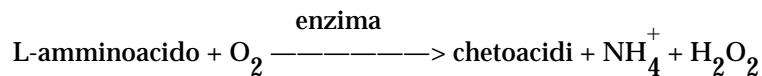


Figura 11. Schema a flusso continuo per l'analisi degli L-amminoacidi: P=pompa peristaltica; S=spirale enzimatica termostata a 37°C; S'=spirale termostata a 25°C.

attraverso una spirale S termostata a 37°C, dove è stato immobilizzato l'enzima L-amminoacido ossidasi; in questa spirale avviene la reazione enzimatica tra l'ossigeno disciolto in soluzione e l'amminoacido con formazione di  $\text{NH}_4^+$ :



Il campione, dopo la reazione, viene mescolato con NaOH, che ha la funzione di spostare il pH a valori alcalini, e quindi di convertire lo ione ammonio formatosi in  $\text{NH}_3$  gassoso. Una seconda spirale S', termostata a 25°C, è stata inserita nel circuito; la sua funzione è quella di assicurare una temperatura costante della soluzione all'ingresso

del sensore e di mescolare la soluzione con NaOH. Dato che le analisi sono state eseguite in flusso, è stata costruita una cella (figura 12) per far arrivare i campioni alla superficie della membrana. L'elettrodo è stato per lo più utilizzato in posizione orizzontale con l'uscita verso l'alto, in modo da facilitare l'eliminazione di eventuali bolle d'aria. E' stata eseguita una calibrazione del sensore ad  $\text{NH}_3$  e sono stati calcolati i tempi di risposta. Si arriva a determinare una concentrazione di  $\text{NH}_3$  nell'intervallo  $10^{-5}$ - $10^{-2}$  molare con tempi di risposta intorno al minuto (figg. 13 e 14). Sono stati preparati degli standards di amminoacidi in tampone fosfato pH 7.0 ed eseguite delle curve di taratura. I risultati sono mostrati in figura 14. Le risposte ottenute dalla maggior parte di amminoacidi provati sono simili e questo permette di applicare il sistema per l'analisi di L-amminoacidi all'analisi di proteine.

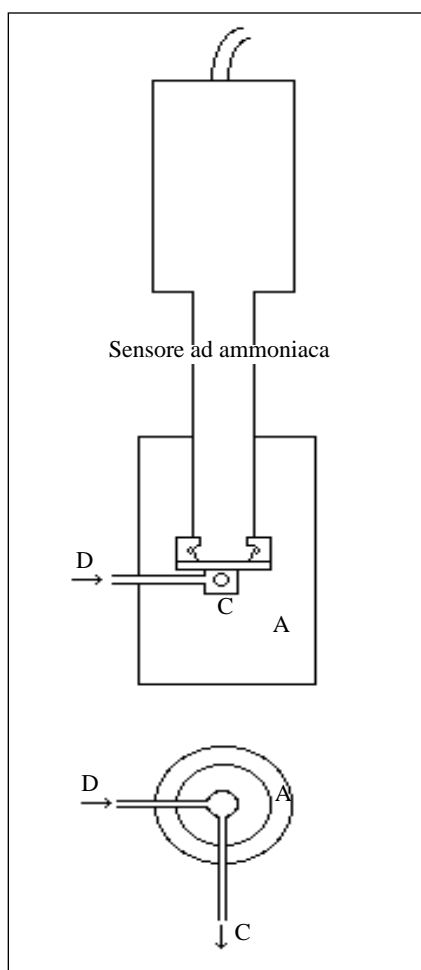


Figura 12. Sistema di misura della ammoniaca in flusso continuo: A=cella di perspex; C=uscita; D=entrata.

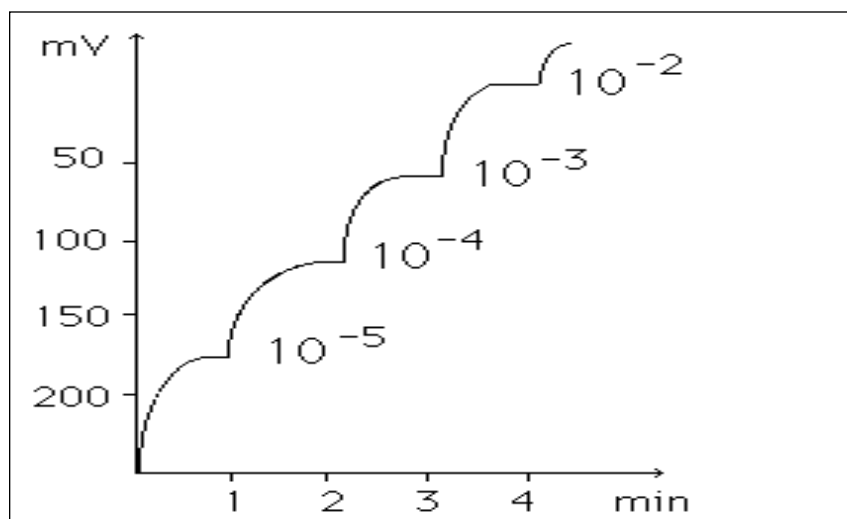


Figura 13. Velocità di risposta del sensore a varie concentrazioni di  $\text{NH}_3$ .

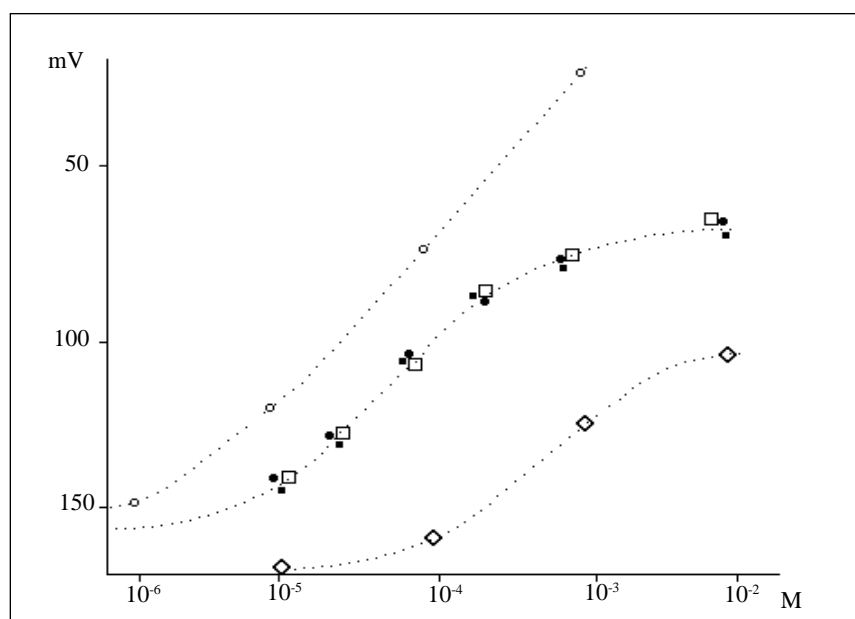


Figura 14. Curve di calibrazione di  $\text{NH}_3$  e di L-amminoacidi

- = ammoniaca;
- = fenilalanina;
- = leucina;
- = triptofano
- ◇ = isoleucina.

## Procedimento e risultati per le analisi di proteine

### A) Proteasi immobilizzata su agarosio

Il sistema a flusso continuo descritto per l'analisi di L-amminoacidi è stato utilizzato anche per l'analisi di proteine, dopo aver eseguito alcune opportune modifiche. Nella figura 15 viene presentato l'intero schema del sistema di analisi di proteine. Le varianti rispetto al sistema illustrato in figura 11 sono due: la prima è l'aggiunta della spirale e

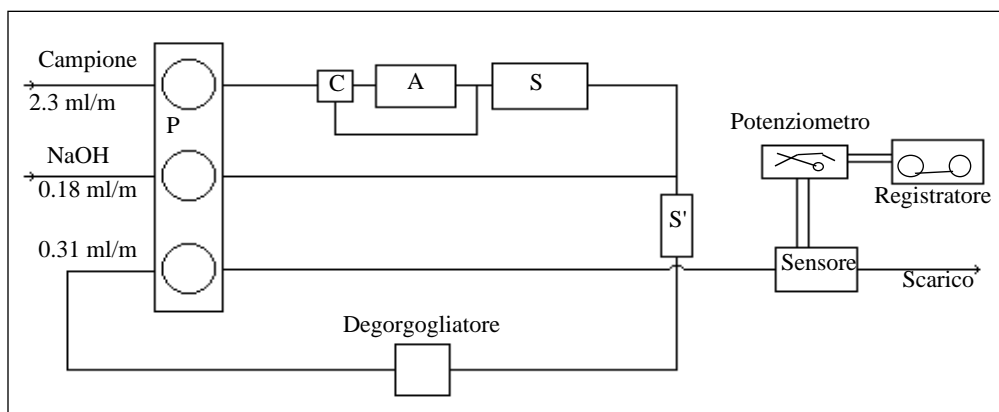


Figura 15. Schema a flusso continuo per l'analisi di proteine: P=pompa peristaltica; C=rubinetto a 3 vie; A=reattore a spirale con proteasi; S=spirale con L-amminoacido ossidasi; S'=spirale termostata a 25°C.

del reattore con la proteasi immobilizzata e sempre termostata a 37°C, che naturalmente precede la spirale dell' L-amminoacido ossidasi; la seconda è l'introduzione nel circuito di un rubinetto a tre vie, che permette di trattenere, per un tempo voluto, le soluzioni di proteina da analizzare all'interno del sistema con la proteasi. Si può, quindi, con questo accorgimento, aumentare il grado di idrolisi, aumentando il tempo della reazione enzimatica, che per le analisi in flusso si riduce a circa 30". Il primo metodo messo in atto per l'analisi di proteine sfrutta una proteasi già immobilizzata, che si trova in commercio. Un reattore con un volume di 3 ml è stato riempito con l'enzima proteasi immobilizzato su agarosio. Alle estremità di questo reattore si possono applicare dei tubi, in modo tale che esso possa essere introdotto nel sistema a flusso descritto in fig. 15. Per evitare che l'enzima venga portato via dal flusso, è posto alla base del reattore un filtro di vetro sinterizzato, che trattiene la proteasi e lascia facilmente scorrere le soluzioni attraverso di esso. Prima di passare alla misura di proteine, si è eseguita una curva di calibrazione di  $\text{NH}_3$ , rappresentata in figura 16. Le soluzioni standard di proteine sono state preparate dalla albumina bovina e inviate in flusso attraverso il reattore e la spirale di L-amminoacido ossidasi. Inviando la soluzione di albumina 1 g/l in flusso, la quantità di  $\text{NH}_3$  che si otteneva era minore di  $10^5\text{M}$ . Tale valore è considerato troppo basso per avere un'accettabile precisione. Si è tentato



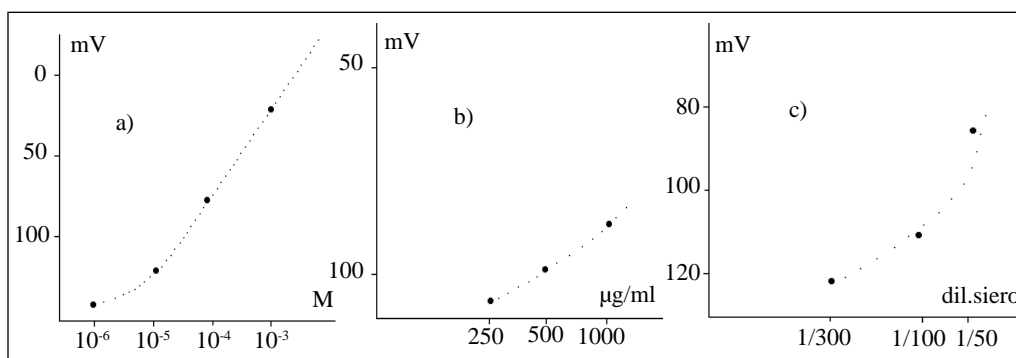


Figura 16. a=curva di calibrazione di  $\text{NH}_3$ ; b=curva di calibrazione di albumina; c=curva di calibrazione relativa a siero diluito ottenuta con reattore di proteasi immobilizzata su agarosio.

di aumentare il tempo di idrolisi della albumina lasciandola a contatto della proteasi immobilizzata per un tempo definito. Il procedimento è stato il seguente: il reattore con la proteasi immobilizzata su agarosio è stato caricato con la soluzione standard di albumina; girando il rubinetto a tre vie si è isolato il reattore, mentre la soluzione di tampone continuava a fluire lungo tutto il circuito per 5 minuti. Trascorso questo tempo, girando nuovamente il rubinetto a tre vie, si analizzava la soluzione di albumina idrolizzata. La curva ottenuta con le varie concentrazioni di albumina è mostrata in figura 16b. Confrontando i valori della curva di albumina con quelli della curva di calibrazione di  $\text{NH}_3$  (figg. 16a e 16b) si può vedere che le soluzioni di albumina nell'intervallo di concentrazione compreso tra 100 e 1.000 g/ml corrispondono all'incirca all'intervallo di  $\text{NH}_3$  compreso tra  $10^{-6}$ - $10^{-4}$ M. Questo esperimento è stato eseguito anche con alcuni campioni ottenuti per diluizione di un siero standard liofilizzato la cui concentrazione di proteine totali con il metodo del biuretto ha un valore di 50 g/l. Questo siero, opportunamente ricostituito, è stato diluito 1/50 con tampone fosfato/bifosfato 0.05 M. La curva ottenuta con le soluzioni di siero standard è descritta in figura 16c. E' da precisare che anche questa curva è stata realizzata mantenendo le soluzioni di siero standard ferme per 5 minuti all'interno del reattore con la proteasi immobilizzata. Se si confrontano i valori ottenuti con le soluzioni di siero standard con quelli dell' $\text{NH}_3$  si vede che le diluizioni 1/100 e 1/50 del siero sono comprese nell'intervallo di concentrazione di  $\text{NH}_3$   $10^{-5}$ - $10^{-4}$ M. In seguito è stato inserito nel sistema un secondo reattore, identico al primo, collocato subito dopo questo; in questo modo si sono raddoppiati la quantità di enzima ed il tempo di contatto tra l'enzima immobilizzato e l'albumina. Ne è risultato aumentato il grado di idrolisi delle proteine. In figura 17a è riportata la curva di calibrazione dell' $\text{NH}_3$  in queste condizioni ed in fig17b una curva di calibrazione di albumina. Anche in questo caso l'intervallo apprezzabile è quello che corrisponde alla concentrazione di  $\text{NH}_3$   $10^{-5}$ - $10^{-4}$ M, con il vantaggio, però, di avere eseguito una misura in flusso veloce e pratica. Questa volta le concentrazioni analizzate di albumina sono comprese nell'intervallo 250-1.000 µg/ml. Analoghi risultati, come si può vedere dalla figura 17c, sono stati ottenuti con il siero standard, anch'esso inviato in flusso continuo. Dopo aver eseguito delle prove in bianco per valutare eventuali interferenze si è potuto dedurre che il metodo di analisi una volta standardizzato può essere applicato all'analisi di proteine nei sieri.

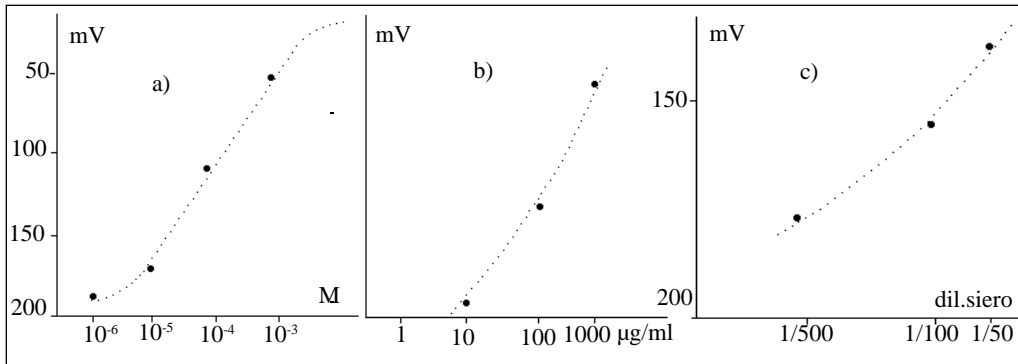


Figura 17. a=curva di calibrazione di  $\text{NH}_3$ ; b=curva di calibrazione di albumina; c=curva di calibrazione relativa a siero diluito ottenuta con due reattori di proteasi immobilizzata su agarosio senza incubazione.

### B) Proteasi immobilizzata su tubi di nylon

Si è pensato di utilizzare un altro metodo per la determinazione di proteine, in quanto i reattori descritti precedentemente presentano qualche inconveniente come bolle d'aria che rimangono intrappolate nel gel di agarosio e tempi di lavaggio lunghi tra una misura e l'altra. Il metodo consiste nell'immobilizzare una proteasi sui tubi di nylon. Il procedimento di immobilizzazione è stato uguale a quello utilizzato per l'enzima L-amminoacido ossidasi. La spirale di nylon con l'enzima proteinasi è stata inserita nel circuito di figura 15 prima della spirale con l'enzima L-amminoacido ossidasi; sono stati così eliminati i problemi provocati dall'uso dei reattori. Con questa spirale sono state tracciate curve di calibrazione di  $\text{NH}_3$  e curve di albumina (figg. 18a e 18b). Tutte le

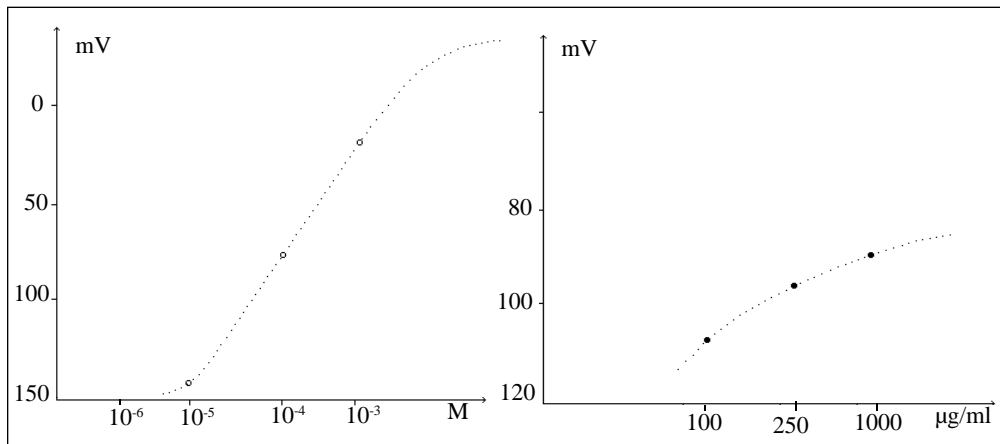


Figura 18. a=curva di calibrazione di  $\text{NH}_3$ ; b=curva di calibrazione di albumina ottenuta con reattore di proteasi immobilizzata su nylon senza incubazione.

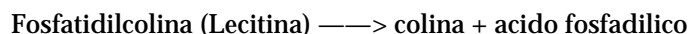
misure sono state eseguite in flusso continuo ed i risultati, pur essendo simili a quelli dei reattori in serie, sono leggermente migliori se raffrontati con le curve di calibrazione di  $\text{NH}_3$ . I risultati ottenuti con due tipi diversi di enzima proteasi e con due diverse immobilizzazioni mostrano che questo metodo può essere applicato alla determinazione di proteine in soluzioni acquose e nei sieri.

## **Determinazione del colesterolo libero e totale nella bile umana.**

La determinazione del colesterolo nella bile è utile per la diagnosi dei calcoli biliari e per il calcolo del cosiddetto indice litogenico (Campanella e al 1985), quest'indice è funzione del contenuto totale del colesterolo nella bile ma non dei sali biliari e dei fosfolipidi; inoltre i campioni di bile sono estremamente complessi e fortemente colorati tanto è vero che i metodi colorimetrici danno risultati spesso insoddisfacenti. Utilizzando un sensore ad ossigeno e gli enzimi colesterolo esterasi e colesterolo ossidasi è stato possibile misurare sia il colesterolo libero che quello totale in campioni di bile sia epatica che colecistica (Mascini e al 1983). L'enzima colesterolo ossidasi è stato immobilizzato su una rete di nylon poi fissata sul sensore e protetta da una membrana da dialisi. Le soluzioni standard di colesterolo sono state preparate con tampone fosfato contenente lo 0.1% di Triton X-100 che assicurava la solubilità del colesterolo. La procedura di misura era estremamente semplice consistendo nell'aggiungere ad una soluzione tampone prima il campione di bile e poi lo standard. Le variazioni di corrente erano registrate e correlate alla concentrazione di colesterolo totale, al campione di bile in soluzione era prima aggiunto l'enzima colesterolo esterasi e dopo aver atteso un tempo opportuno per l'idrolisi, veniva eseguita la stessa procedura per la misura del colesterolo libero. In tabella 11 sono riportati i risultati ottenuti col sensore ad enzima confrontati con quelli ottenuti spettrofotometricamente col metodo di Roeschlau.

## **Determinazione dei fosfolipidi nella bile e nel siero.**

Un sensore a colina è stato utilizzato per la determinazione dei fosfolipidi nella bile e nel siero (Campanella e al. 1985). Il metodo consiste nel far reagire i fosfolipidi con l'enzima fosfolipasi D che catalizza la seguente reazione:



la colina sviluppata dalla idrolisi enzimatica viene determinata tramite l'enzima colina ossidasi secondo la reazione già descritta quando si è parlato della determinazione dell'acetilcolina. In questo caso, essendo la matrice biliare estremamente "sporca" ed essendo la concentrazione di fosfatidilcolina nella bile relativamente elevata, si è utilizzato un sensore ad ossigeno che è, come già detto, esente da interferenze di natura elettrochimica e lavora con buona accuratezza e precisione in un range di concentrazioni  $2 \cdot 10^{-5}$ - $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Sono stati analizzati campioni di bile e di sieri ed i risultati sono

A	B	C	D	E	F	G	H
1	g.b.	9.3	8.7	-6.5	20.7	20.2	-2.4
2	g.b.	14.5	14.3	-1.4	23.0	22.0	4.3
3	g.b.	6.9	6.9	0.0	7.2	9.0	25.0
4	h.b.	1.2	1.4	16.7	1.4	1.4	0.0
5	h.b.	2.5	2.4	4.0	2.9	3.6	24.1
6	g.b.	11.0	10.7	-2.7	13.0	12.8	-1.5
7	g.b.	3.5	4.2	20.0	3.7	4.4	18.9
8	g.b.	3.8	4.7	23.7	3.8	4.7	23.7
9	h.b.	2.8	3.4	21.4	3.0	3.7	23.3
10	h.b.	0.1	~0	-	0.1	~0	-

Tabella 11. Confronto dei risultati delle concentrazioni di colesterolo libero e totale ottenuti con un sensore ad enzima e il metodo spettrofotometrico di Roeschlau in 10 campioni di bile umana (i valori sono espressi in mmol.l<sup>-1</sup> ed ogni valore e' la media di tre determinazioni. A=Numero campione; B=Specie di Campione; C=Colesterolo libero trovato con il metodo di Roeschlau; D=Colesterolo libero trovato con il sensore ad enzima; E=%; F=Colesterolo totale trovato con il metodo di Roeschlau; G=Colesterolo totale trovato con il sensore ad enzima; H=%.  
g.b.=bile colecistica; h.b.=bile epatica;

stati confrontati con quelli ottenuti utilizzando un metodo di riferimento spettrofotometrico (tabelle 12 e 13). Come si può vedere dalla tabella 12 alcuni valori hanno un errore relativo abbastanza elevato. Questa inaccuratezza può essere attribuita al fatto che alcuni campioni di bile sono fortemente colorati per cui richiedono prima di essere

A	B	a	b	c	d	e
1	c.a.	0.6	4.3	4.9	5.1	-4.1
2	g.b.	15.2	36.8	52.0	42.3	+18.7
3	g.b.	19.0	60.9	79.9	70.4	+11.9
4	c.a.	0.6	16.4	17.0	18.6	-9.4
5	c.a.	4.4	4.8	9.2	8.7	+5.4
6	g.b.	24.0	88.0	112.0	84.9	+24.2
7	g.b.	4.6	36.2	40.8	38.8	+4.9
8	g.b.	9.0	11.0	20.0	21.3	-6.5
9	c.a.	1.6	0.5	2.1	2.1	0.0
10	c.a.	22.8	9.1	31.9	30.0	+6.0

Tabella 12. Confronto dei risultati delle concentrazioni di (lecitina+colina) ottenuti con un metodo amperometrico e spettrofotometrico in 10 campioni di bile umana. I valori sono espressi in mmol.l<sup>-1</sup>. Ogni valore e' la media di almeno tre determinazioni. A=Bile numero; B= Specie di campione; a=Valore trovato per la colina (metodo amperometrico); b=Valore trovato per la lecitina (metodo spettrofotometrico); c= (a+b); d=Valore trovato per la lecitina+colina (metodo spettrofotometrico); e=(c-d)%; ca=aspirato colecistico; g.b.=bile colecistica.

n.	Specie del campione	Valore trovato colina	Media	SD%	Valore trovato lecitina	Media	SD%
1	c.s.	0.0	-	-	1.18	1.20	1.3
		“			1.20		
		“			1.21		
2	c.s.	0.0	-	-	1.07	1.04	2.5
		“			1.03		
		“			1.02		
3	c.s.	0.0	-	-	4.34	4.41	2.3
		“			4.37		
		“			4.53		
1	B.(c.a.)	0.57	0.60	4.4	4.26	4.30	0.9
		0.62			4.30		
		0.61			4.34		
2	B.(g.b.)	15.2	15.2	0.0	35.2	36.8	5.8
		15.2			36.0		
		15.2			39.2		
3	B.(g.b.)	19.0	19.0	0.0	61.2	60.9	0.5
		19.0			60.6		
		19.0			60.8		

c.s.=siero di controllo; B.(c.a.)=aspirato colecistico; B.(g.b.)=bile colecistica

Tabella 13. Repetibilità nella determinazione della colina e lecitina in sieri umani di controllo e campioni di bile con un elettrodo ad enzima. I valori sono espressi in mmol.l<sup>-1</sup>. I campioni sono stati opportunamente diluiti prima della misura.

processati, pretrattamenti laboriosi che inducono errori nella misura. Il metodo elettrochimico non richiede reagenti nè trattamento del campione. La riproducibilità della misura inoltre è inferiore al 5%. Questo metodo è stato in seguito esteso alla determinazione della lecitina in composti di interesse farmaceutico e nel liquido amniotico (Campanella e al. 1987).

## Determinazione della gonadotropina corionica.

Elettrodi selettivi per ioni ed elettrodi voltammetrici sono stati proposti come sensori per reazioni immunologiche. Infatti alcune di queste reazioni utilizzano come misura finale l'attività di un enzima. Un enzima può essere legato (coniugato) ad antigeni od anticorpi. Questi coniugati sono usati per la determinazione analitica di substrati immunologicamente attivi; in questo caso il sensore usato per l'analisi è chiamato "immunosensore" e la tecnica usata è l'enzyme immunoassay (EIA). Questa tecnica è ben nota all'ambiente scientifico medico ed è stata trattata e riportata ampiamente in

letteratura. In molti casi la EIA ha il vantaggio della rapidità, convenienza, ed ovviamente il non uso di sostanze radioattive necessarie invece nella metodica radioimmunoassay (RIA). In questa analisi viene descritto un metodo che utilizza un sensore per la determinazione di un ormone tramite la tecnica dell' "enzyme immunoassay". In particolare si è usato l'enzima acetilcolinesterasi come marcatore ed un elettrodo per la misura del pH per seguire l'attività dell'enzima (Mascini e al 1982 a). Lo schema generale di come funziona un'analisi in cui sono coinvolti antigeni ed anticorpi è illustrato in figura 19. Nel caso specifico l'anticorpo per la gonadotropina corionica

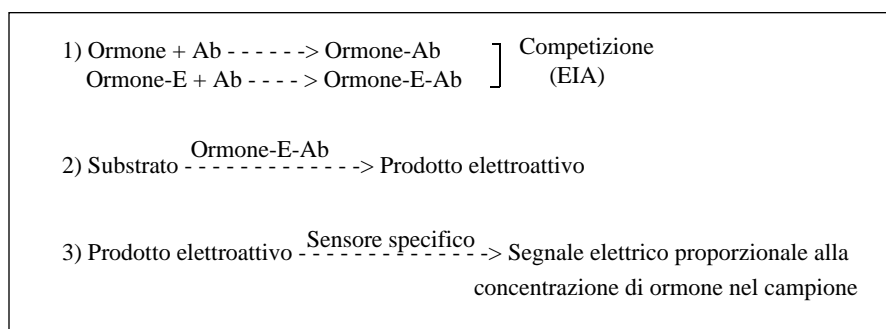


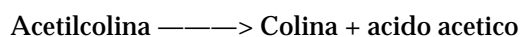
Figura 19. Schema generale per la determinazione di un antigene (in questo caso un generico ormone) usando il metodo dell'enzyme immunoassay (EIA) ed un sensore elettrochimico.

1) L'anticorpo Ab (di solito immobilizzato) viene fatto reagire in presenza dell'ormone libero (campione in esame) e dell'ormone preventivamente coniugato con un enzima che mantiene la sua attività catalitica (reazione di competizione EIA). Ovviamente meno ormone libero è presente più ormone coniugato si legherà all'anticorpo e viceversa.

2) Nella seconda fase l'enzima coniugato con l'ormone viene separato dalla soluzione di reazione e messo in contatto con un substrato specifico il quale reagendo con l'enzima dà un prodotto elettroattivo (es.:  $H_2O_2$ ).

3) Nella terza fase il prodotto elettroattivo viene messo in contatto con un sensore specifico generando così un segnale elettrico che grazie alla competizione della fase 1) può essere messo in relazione alla concentrazione di ormone.

(HCG) è immobilizzato su di una membrana tramite una rete di polietilene. Questa membrana viene poi immersa nella soluzione da analizzare alla quale è stata prima aggiunta una definita quantità di enzima coniugato all'ormone. Dopo due ore di incubazione la membrana viene rimossa dal campione da analizzare, lavata ed immersa questa volta in una soluzione di acetilcolina. Questo substrato reagisce con l'enzima coniugato con l'ormone (E-HCG) la cui quantità sarà tanto maggiore quanto minore è la concentrazione di ormone libero nel campione. La sensibilità di questa determinazione sta nel porre la membrana in intimo contatto con l'elettrodo a vetro il quale "sente" una variazione locale di pH secondo la seguente reazione catalizzata dall'enzima acetilcolinesterasi.



La variazione di pH dovuta all'acido acetico è correlata alla concentrazione di gonadotropina corionica presente nel campione. Il sensore a pH utilizzato per quest'analisi è mostrato in figura 20. Questo sensore ha una membrana piatta che consente il suo adagiamento sulla membrana contenente l'enzima da misurare. In figura 21 è mostrata una tipica risposta del sensore utilizzando una soluzione standard di HCG di 1 I.U./ml mentre nella figura 22 sono riportati i risultati sperimentali ottenuti con soluzioni

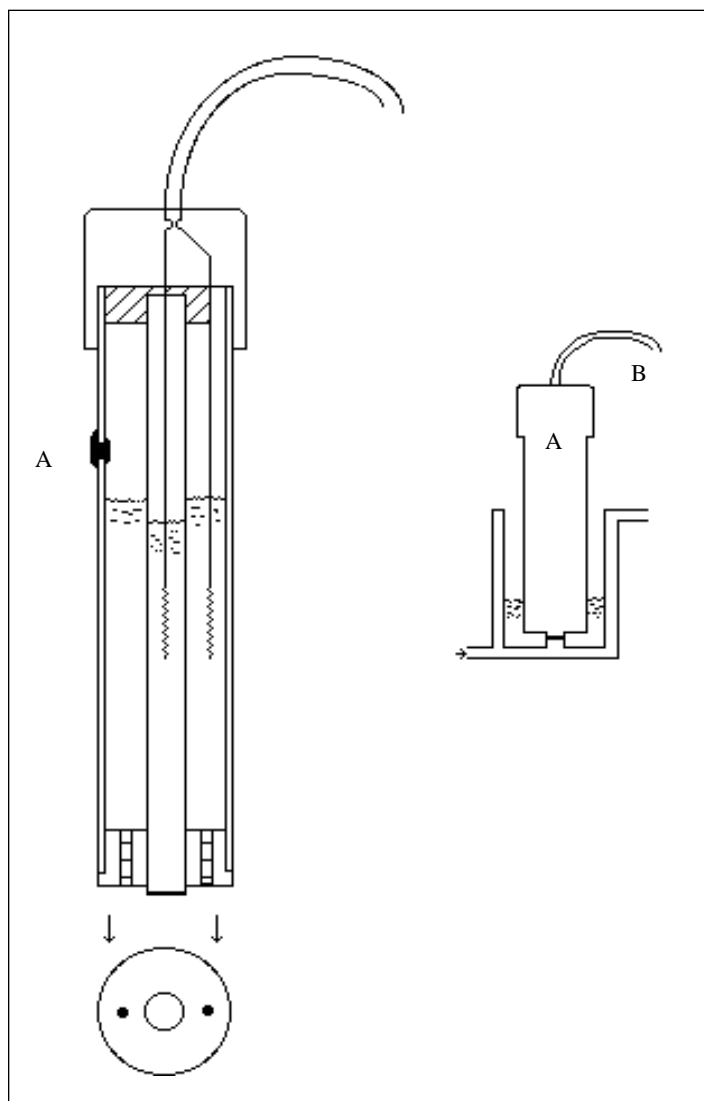


Figura 20. A - Elettrodo a vetro a membrana piatta. B - Schema di misura dell'attività enzimatica.

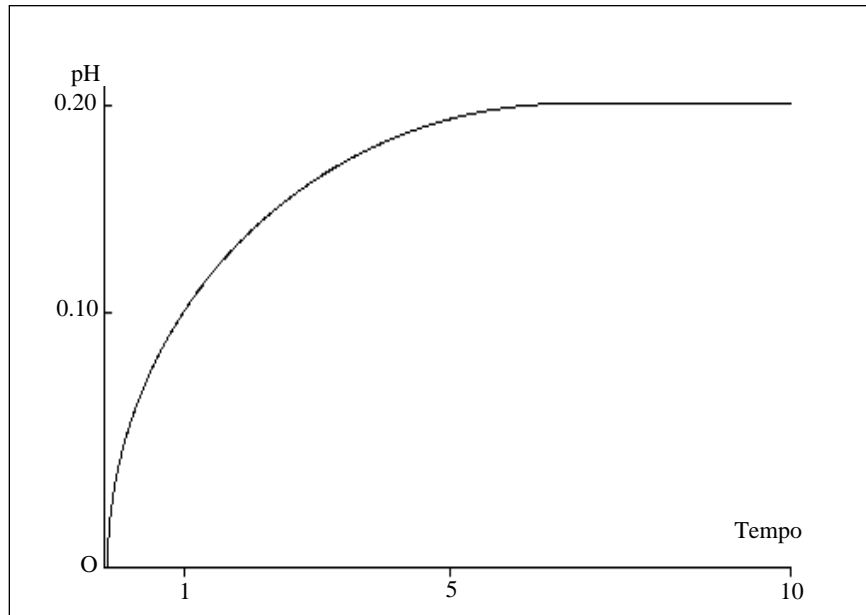


Figura 21. Tempo di risposta dell'immunosensore

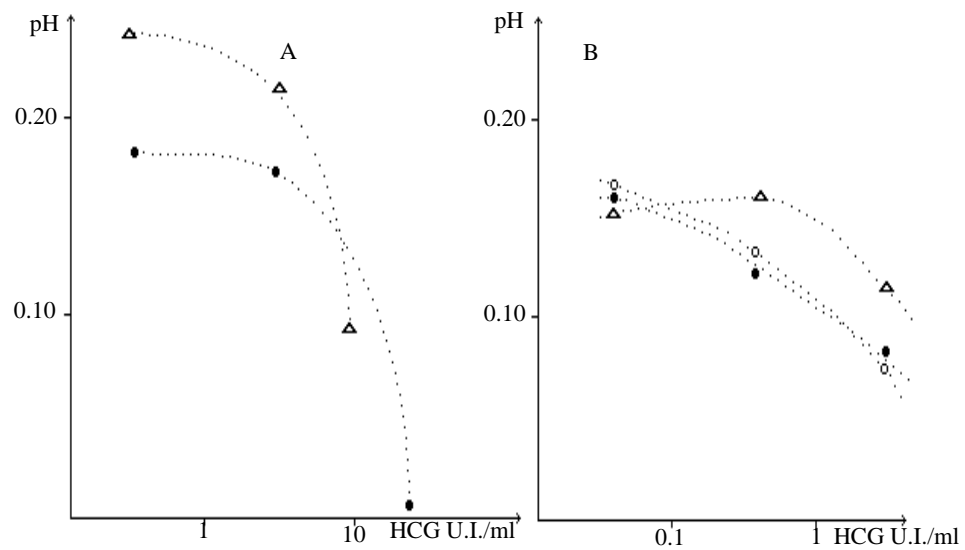


Figura 22. Variazioni di pH in funzione della HCG in soluzioni standard. Le membrane con l'anticorpo erano preparate usando una diluizione 1:10 di antisiero. La concentrazione dell'enzima coniugato era in A=55 U.I./ml<sup>-1</sup> ed in B=10 U.I./ml<sup>-1</sup>.



standard di gonadotropina comprese nell'intervallo 0.05-25 U.I./ml. Per ogni serie di misure effettuate a 25°C si è prima misurata la variazione di pH dovuta alla idrolisi spontanea della acetilcolina in tampone fosfato 0.002 molare a pH 8.00. Questa variazione che era di circa 0.05 unità di pH, è stata sottratta a tutti i valori riportati nelle figure. Nella figura 22 le curve A e B sono state ottenute diluendo la soluzione contenente l'anticorpo (antisiero) 1/10 ed usando una quantità di coniugato di 5, 10 o 25 U.I./ml. in figura 23 è stata invece usata una diluizione di antisiero di 1/5 e 1/10 usando concentrazioni di coniugato comprese tra 5 e 55 U.I./ml. In questi grafici nell'asse delle ordinate la variazione di pH può essere considerata una misura diretta della attività

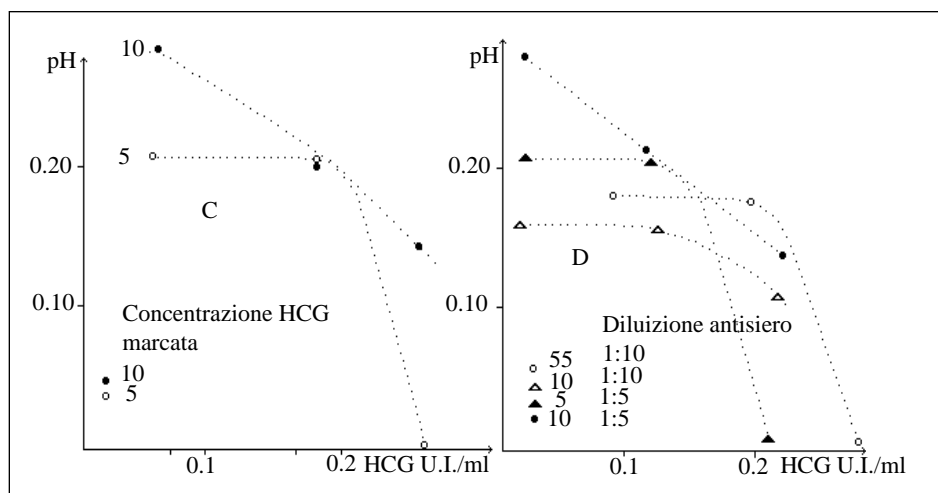


Figura 23. Variazioni di pH in funzione di HCG in soluzioni standard. In C le membrane con l'anticorpo erano preparate con una diluizione 1:5 di antisiero. Le curve 5 e 10 corrispondono ad una concentrazione finale di enzima coniugato aggiunto rispettivamente di 5 e 10 U.I./ml<sup>-1</sup>. Il grafico D riassume gli esperimenti cambiando i due parametri: diluizione dell'antisiero e concentrazione del coniugato.

dell'enzima. Infatti le variazioni totali di pH nella soluzione sono relativamente basse così la capacità tampone della soluzione può ritenersi costante. Nella figura 22 le varie curve corrispondono a ripetuti esperimenti e danno un'idea della riproducibilità delle misure. Da un punto di vista prettamente analitico è interessante notare che 1 I.U./ml di HCG corrisponde ad una concentrazione di circa 1 nanomole, quindi si può avere un'idea della sensibilità di queste determinazioni. Tutti gli effetti dovuti a diverse concentrazioni di antisiero e di coniugato sono stati attentamente studiati e riassunti nella figura 23 D. In figura 24 sono riportati i risultati preliminari ottenuti con sieri umani la cui concentrazione di HCG era stata determinata mediante RIA. I sieri sono stati diluiti 1/10 con tampone fosfato 0.05 mol. pH 6.8 al fine di ottenere lo stesso "range" di concentrazione dell'ormone nelle soluzioni standard. Per quest'analisi si è usata una concentrazione di coniugato 5 I.U./ml ed una membrana ottenuta utilizzando antisiero diluito 1/5. Come si può osservare dalla figura 24, le variazioni di pH

sono inferiori a quelle ottenute con le soluzioni standard anche se la forma della curva riflette lo stesso comportamento. Questo problema è attualmente fonte di ricerca nello studio della messa a punto e ottimizzazione di immunosensori.

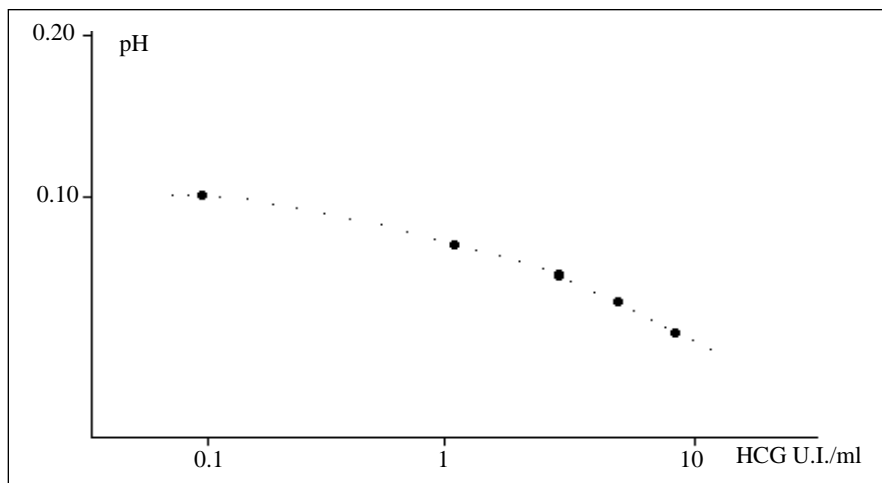


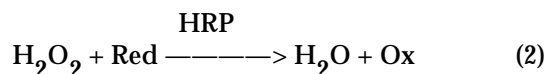
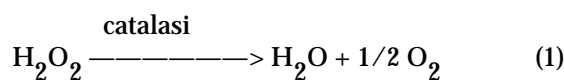
Figura 24. Variazioni di pH in funzione di HCG in sieri umani e diluiti 1:10. L'analisi di HCG e' stata eseguita con il metodo RIA.

## Determinazione dell'insulina.

Nella prima parte di questa monografia, parlando dei mediatori biologici, si è accennato all'uso di tessuti animali o vegetali che contengono enzimi in forme molto stabili che possono essere utilizzati per assemblare biosensori. In questo caso un sensore elettrochimico per la determinazione di acqua ossigenata realizzato con tessuto epatico è stato utilizzato per la determinazione dell'attività dell'enzima perossidasi in soluzione (Mascini e Paleschi 1983). Il suo funzionamento è basato sull'accoppiamento tra un sensore ad ossigeno e l'enzima catalasi abbondantemente presente nel tessuto epatico. La competizione tra le due reazioni enzimatiche per l'acqua ossigenata, basata sulla catalasi immobilizzata e la perossidasi in soluzione, trasforma il sistema in un sensore per la determinazione dell'attività della perossidasi nell'intervallo  $5 \times 10^{-3}$  -  $2.5 \times 10^{-1}$  U/ml. Recentemente la perossidasi (HRP) è sempre più usata nelle tecniche immunoenzimatiche (EIA) per la sua capacità a formare coniugati con antigeni e anticorpi, per cui la sua determinazione analitica è di considerevole importanza. La gran parte dei saggi è basata su misure spettrofotometriche ed il requisito necessario di campioni otticamente puri è spesso una notevole limitazione. In questo lavoro vengono riportati alcuni risultati ottenuti con kit commerciali nell'analisi clinica, dove il biosensore a tessuto è stato impiegato in confronto con il sistema spettrofotometrico.

### Procedimento con il sensore a tessuto epatico

Il biosensore assemblato con il tessuto epatico è immerso in 2 ml di tampone fosfato in un piccolo termostato a 25°C e piccole quantità (microlitri) di acqua ossigenata, 4 amminoantipirina (4AA) e l'enzima perossidasi erano aggiunti. La soluzione era agitata con un piccolo magnete. La corrente era misurata con lo strumento IL213. Negli esperimenti di EIA il sensore era direttamente immerso nelle provette fornite con il test-kit. In tal caso era impiegato un microaggitatore. Nella provetta si introduceva 1 ml di soluzione. Tutte le incubazioni delle immunoreazioni erano eseguite secondo le istruzioni del kit. La risposta del sensore è basata sulle due seguenti reazioni:



La prima reazione è catalizzata dall'enzima catalasi contenuto in gran quantità nel fegato bovino e immobilizzato sulla superficie dell'elettrodo ad ossigeno. La seconda reazione è catalizzata dalla perossidasi (HRP) che è in soluzione con un opportuno substrato riducente e compete con la prima. La presenza di HRP in soluzione diminuisce la corrente elettrica del sensore ad ossigeno limitando l'ossigeno prodotto dalla prima reazione. La figura 25 mostra la corrente registrata dopo l'aggiunta di perossidasi. La velocità della diminuzione è la misura dell'attività dell'enzima in soluzione. In figura 26 è riportata una curva di calibrazione per l'attività della perossidasi. La variazione di corrente era registrata per pochi minuti ed è riportata sull'ordinata come  $i/\text{min}$ ; esiste una relazione lineare tra la velocità e l'attività della perossidasi nell'intervallo  $2.5 \times 10^{-3} - 2.5 \times 10^1 \text{ U/ml}$ . Il limite di sensibilità è fissato dalla velocità della reazione

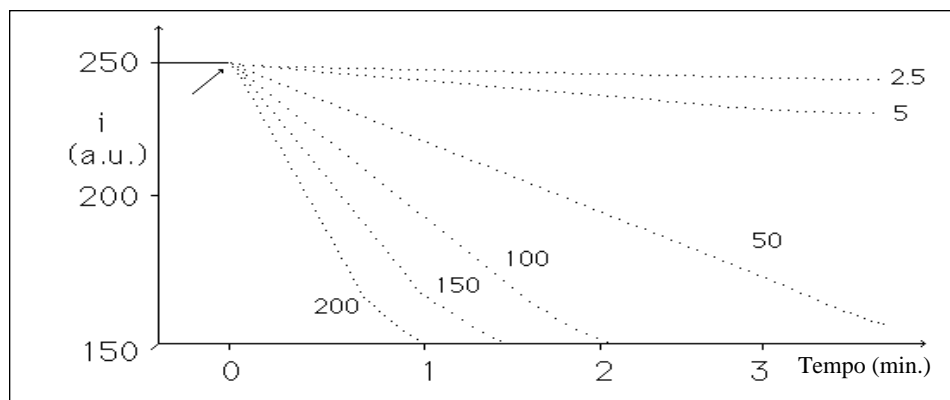


Figura 25. Risposta del biosensore elettrochimico all'attività della perossidasi. La freccia indica l'introduzione della perossidasi. Le cifre indicano l'attività enzimatica in  $10^{-3} \text{ U.ml}^{-1}$ .  $\text{H}_2\text{O}_2 = 10^{-3} \text{ M}$ ;  $4\text{AA} = 0.1 \text{ M}$ . Tampone fosfato  $0.1 \text{ M}$  pH 6.8.

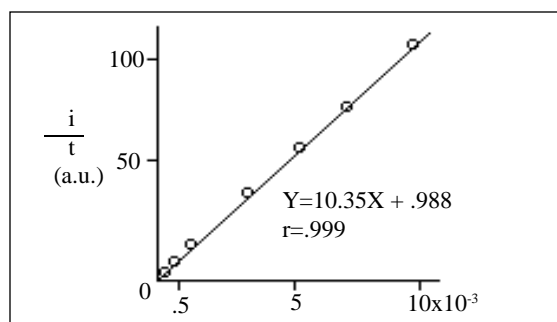


Figura 26. Curva di calibrazione dell'enzima perossidasi in tampone fosfato 0.1 M pH 6.8  $H_2O_2=10^{-3}M$  4AA=0.1 M.

diretta tra acqua ossigenata e 4AA e dalla lenta decomposizione dell'acqua ossigenata dovuta alla catalasi contenuta nel tessuto epatico. Questo intervallo permetteva di controllare l'attività della perossidasi coniugata ad antigeni di 3 kit commerciali, cioè insulina e digossina; 50  $\mu$ l di ogni campione erano aggiunti a 1 ml di tampone con acqua ossigenata e 4AA e la velocità della diminuzione di corrente era registrata e poi paragonata con la curva della figura 27. L'attività della perossidasi coniugata agli antigeni risultava essere rispettivamente 2.0 e  $3.0 \times 10^{-1}U/ml$  per insulina e digossina.

### Immunoassay con insulina

L'insulina è stata determinata usando l'elettrodo a base di tessuto epatico con la tecnica EIA usando il coniugato contenuto nel test kit per l'insulina disponibile commercialmente. Il test dell'insulina è basato sul principio della saturazione sequenziale. Gli anticorpi dell'insulina sono immobilizzati sulle pareti interne delle provette del kit. Nella prima fase dell'incubazione l'insulina del siero è legata alle pareti della provetta; nella seconda fase dell'incubazione l'insulina coniugata alla perossidasi occupa i siti di legame degli anticorpi rimasti liberi (saturazione sequenziale). La quantità dell'HRP fissata sulle pareti della provetta era misurata aggiungendo alla provetta acqua ossigenata e la soluzione di 4AA e seguendo con il biosensore a base di tessuto epatico la diminuzione di corrente invece di aggiungere la soluzione di cromogeno e di seguire la variazione di assorbanza. A causa della piccola quantità di attività di perossidasi fissata sulle pareti delle provette, il procedimento per valutare l'HRP veniva variato. La provetta con i reattivi, acqua ossigenata e 4AA, era lasciata ad incubare insieme ad una provetta "in bianco", cioè una provetta dove l'HRP non era fissata; dopo un periodo di 24 e 48 ore, il biosensore era introdotto direttamente nella provetta insieme con un piccolo magnete per avere una leggera agitazione e veniva misurata la corrente; la corrente corretta per il valore del bianco è riportata nella figura 27 (curva a) per cinque soluzioni standard e un siero contenuti nel kit in commercio. La riproducibilità analitica della determinazione è dell'ordine 5-10% con questo procedimento. La figura 27 (curva b) mostra la risposta del test kit aggiungendo il cromoforo e seguendo il procedimento

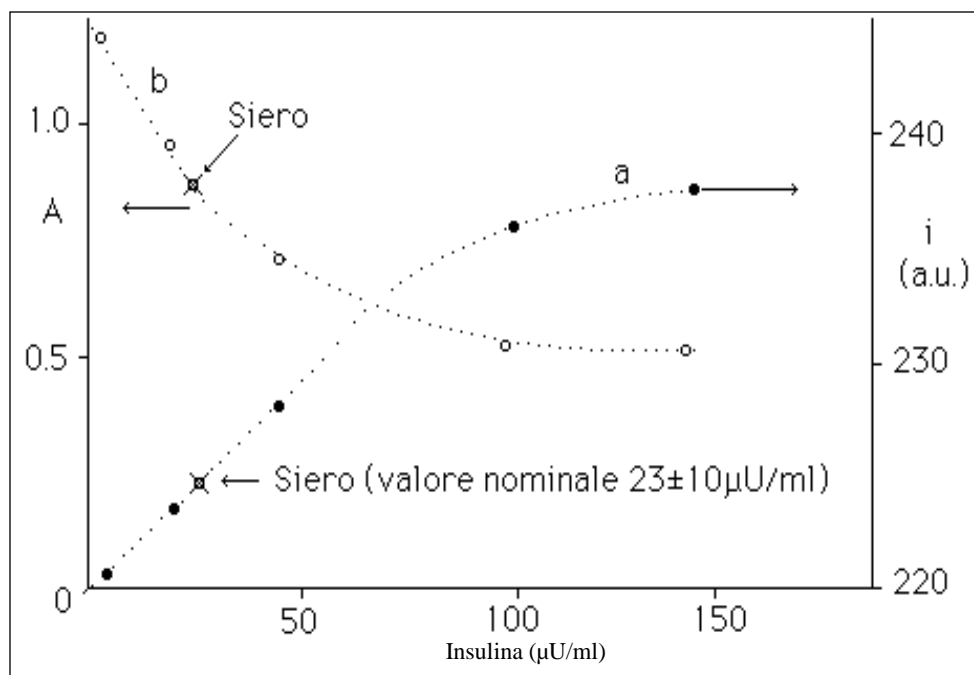


Figura 27. a) Curva di calibrazione con un biosensore elettrochimico assemblato con tessuto di fegato bovino per la determinazione di insulina. Standard e siero erano di un kit in commercio; ●=Standard; ◐=siero ricostituito. b) Curva di un kit in commercio ottenuta con il metodo spettrofotometrico; ○= Standard; ◐=siero ricostituito.

standard spettrofotometrico. Il biosensore a base di tessuto epatico utilizzato in questo lavoro è risultato riproducibile, affidabile e perfettamente adatto per una applicazione delicata e precisa come la EIA. Semplici precauzioni, come conservare l'elettrodo in frigorifero in una soluzione tampone in presenza di sodioazide, un controllo accurato di temperatura (specialmente per il funzionamento del sensore ad ossigeno), fanno ottenere una riproducibilità della corrente entro l'1% e un tempo di vita di alcuni mesi (più di tre). Questo lavoro mostra d'altra parte la possibilità di utilizzare un biosensore a tessuto epatico per nuove applicazioni di grande interesse biologico e gli esempi riportati per EIA possono essere estesi ad altri sistemi; d'altra parte il limite di sensibilità, cioè la minima variazione che può essere rivelata è intorno a  $10^{-5}$  M di acqua ossigenata in soluzioni saturate con aria e questo significa lunghi tempi di risposta in alcuni casi come nella determinazione di insulina riportata. Questo è un limite imposto dall'elettrodo ad ossigeno e dalla solubilità dell'ossigeno nei campioni.

## Applicazioni in diabetologia

Lo scopo principale nella terapia del diabete mellito è la correzione delle alterazioni metaboliche causate dalla deficienza insulinica. Recentemente sono stati introdotti sul mercato dell'analisi strumentale sistemi automatici per l'infusione di insulina con un meccanismo di "feedback" regolato dalla concentrazione di glucosio nel sangue del paziente. Sebbene questi strumenti rappresentino un importante miglioramento in terapia, non normalizzano completamente le alterate concentrazioni dei metaboliti legati al glucosio come per esempio il lattato e il piruvato. Il monitoraggio di questi due metaboliti insieme al glucosio utilizzando tre biosensori specifici per i rispettivi substrati è stata la più recente applicazione dei biosensori in diabetologia (Mascini e al 1985; Mascini e al 1987). Un sensore a lattato ed uno a piruvato assemblati come riportato precedentemente sono stati inseriti nel sistema a flusso continuo di un nuovo pancreas artificiale chiamato "Betalike". Il betalike dializza il sangue diluito con una soluzione fisiologica a pH 7.4, reinfonde le cellule nel flusso sanguigno del paziente, mentre analizza il dializzato per conoscere la concentrazione del glucosio. Aggiungendo i nuovi sensori per il lattato e piruvato al Betalike si è misurato glucosio, lattato e piruvato in continuo, in tempo reale in un dializzato libero da proteine avente la stessa viscosità di una soluzione acquosa. Le prestazioni analitiche dei biosensori utilizzati in quest'analisi sono già stati illustrati. In figura 28 è illustrato lo schema del pancreas artificiale betalike modificato aggiungendo i sensori per il lattato e piruvato. Poiché il sensore a piruvato necessita di alcuni cofattori per ottimizzare la risposta una pompa peristaltica tramite una connessione a T introduceva nel flusso del dializzato una soluzione concentrata di cofattori. Nella figura 29 sono mostrati i risultati di una determinazione in vivo dei tre metaboliti in un soggetto nondiabetico di 23 anni sottoposto a trattamento con il pancreas artificiale. Il sangue prelevato dal paziente tramite un catetere a doppio lume viene eparinizzato e diluito 10 volte con la soluzione fisiologica, poi viene dializzato tramite il filtro da dialisi. Il dializzato viene pompato verso il sensore a glucosio con una velocità di flusso di 0.5 ml/min, poi attraverso la cella a flusso che contiene i sensori a lattato e piruvato. Ogni 15-20 minuti venivano effettuati dei prelievi di sangue dal paziente e ne veniva analizzato spettrofotometricamente il contenuto di lattato e piruvato. I risultati, rappresentati dalle linee tratteggiate in figura 29 illustrano il confronto dei risultati dell'analisi tra i due metodi. L'ottima relazione tra i due metodi esclude la possibilità che vi sia una reciproca interferenza. Inoltre è da escludere anche una possibile interferenza dovuta al consumo di ossigeno da parte del glucosio durante la reazione enzimatica. Il consumo di ossigeno calcolato dalla misura di corrente all'elettrodo a glucosio mostra una diminuzione di poche nanomoli per litro assolutamente trascurabile. Come illustrato in figura 29 queste variazioni inducono a considerare lo sviluppo di nuovi e più complessi algoritmi per l'infusione di insulina, algoritmi che appunto tengano presenti anche le variazioni dei metaboliti del glucosio. L'affidabilità dei biosensori quindi darà un contributo decisivo a questa ricerca. Un'altra applicazione molto importante in campo diabetico e strettamente correlata alla precedente è l'utilizzazione della tecnica del "glucose clamp" per

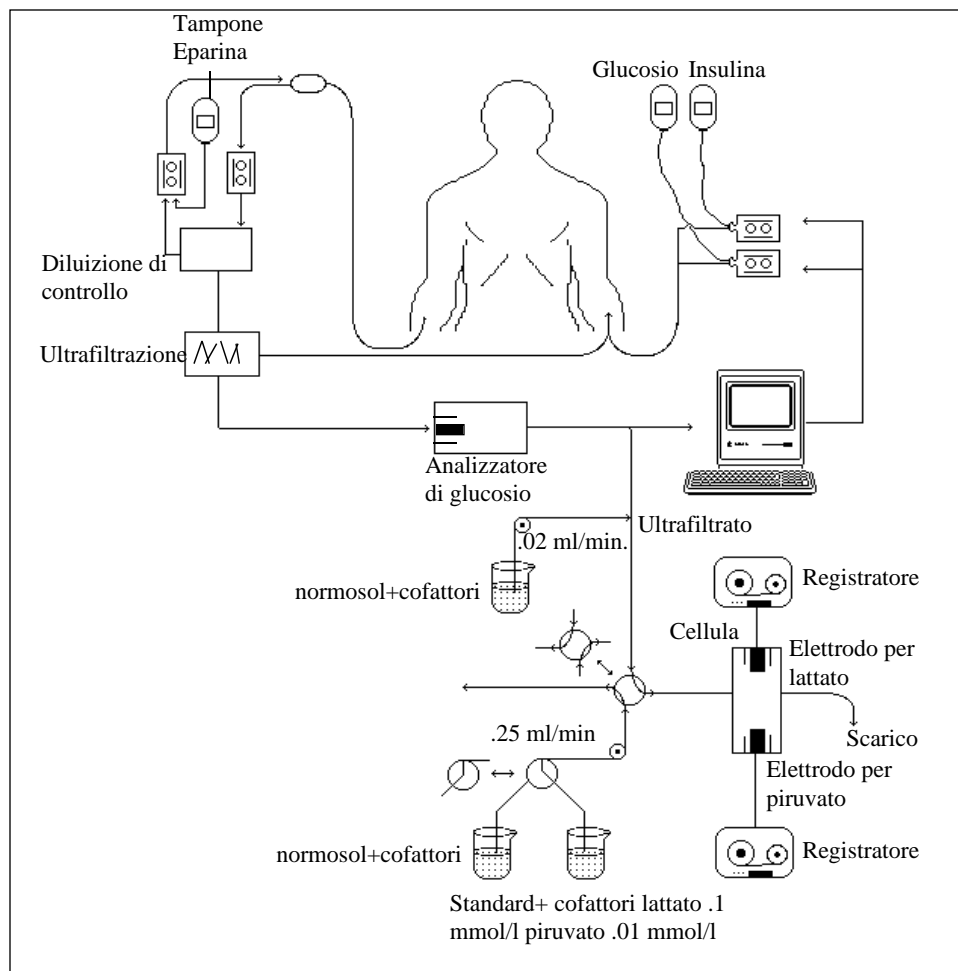


Figura 28. Schema del pancreas artificiale "Betalike" modificato aggiungendo una cella contenente i sensori a lattato e piruvato.

scopi diagnostici e terapeutici (Bombardieri e al 1988; Palleschi e al 1988). Nell'uomo esiste un opposto e simultaneo feedback tra la concentrazione di glucosio e la secrezione di insulina, vale a dire che al variare di una delle due variabili corrisponde una opposta variazione dell'altra. Questo feedback così complesso e integrato può essere rotto facilmente usando sistemi in vitro dove il pancreas o tessuti individuali possono essere isolati ed esposti a differenti concentrazioni di glucosio o di insulina. A causa di questa complessa interazione tra glucosio ed insulina o di entrambi i tessuti periferici e le cellule beta, diventa importante sviluppare un sistema in cui le variabili interessate possono essere manipolate indipendentemente. Questo obiettivo è stato raggiunto la prima volta da De Fronzo ed al. nel 1979. In seguito si sono sviluppate altre tecniche di

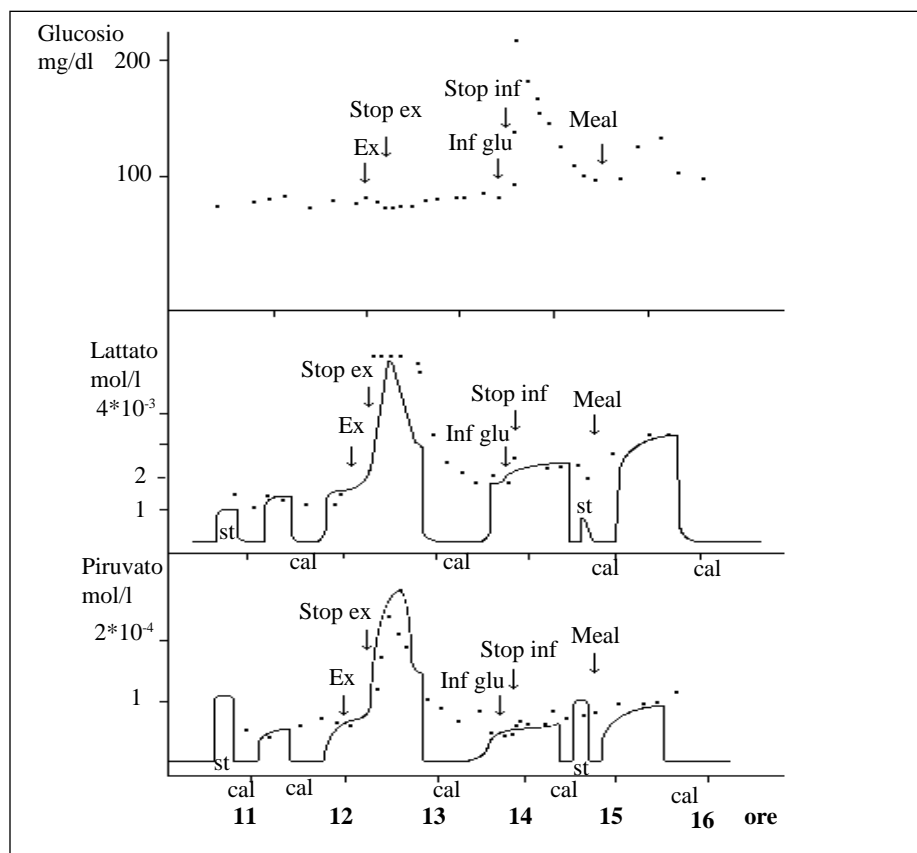


Figura 29. Misura in continuo del glucosio, lattato e piruvato in vivo durante un esperimento con il pancreas artificiale "Betalike". st=Soluzioni standard di lattato e piruvato per la calibrazione dei sensori. Al tempo indicato con cal il sensore a glucosio del "Betalike" e' stato calibrato. Al tempo indicato con Ex e' stato chiesto al paziente di eseguire un breve esercizio fisico che e' stato fermato al tempo indicato con Stop ex. Al tempo indicato con Inf glu e' stata rapidamente infusa una quantita' di glucosio pari a 50 g. Meal indica il periodo in cui il paziente ha consumato il pasto.

glucose clamp e sono apparse numerose pubblicazioni nella letteratura specializzata. Utilizzando invece il pancreas artificiale Betalike modificato opportunamente dal produttore, si è eseguita la tecnica del glucose clamp in modo automatico mediante un algoritmo sviluppato dalla ditta che commercializza la macchina, inoltre sono stati connessi in serie al sensore di glucosio due sensori per la misura in continuo del potassio e lattato. Sono stati effettuati clamp su sangue venoso della durata di 6 ore, con glicemia di clamp di 130 mg/dl ed insulinemia di circa 200 U/ml su tre soggetti normali e quattro diabetici, di sesso femminile, di età compresa tra 45 e 65 anni. I soggetti diabetici erano in terapia con dieta ed ipoglicemizzanti orali di associazione. Venivano effettuati prelievi ogni mezz'ora per il confronto dei valori misurati con metodi di riferimento



tradizionali. I sensori a glucosio e lattato erano quelli usati nei precedenti lavori, il sensore a potassio invece è un elettrodo a flusso costruito con un tubo di gomma al silicone biocompatibile e di alto affidamento. I risultati mostrano che la strumentazione adoperata presenta un'estrema maneggevolezza ed affidabilità nel raggiungere e mantenere la glicemia di clamp a  $\pm 3\%$  automaticamente; le glicemie misurate avevano un coefficiente di correlazione di 0.98 confrontate con il metodo di riferimento. Anche le rilevazioni di latticidemia sono state accurate mostrando un lieve incremento durante la fase iniziale (priming) nei soggetti diabetici. Il potassio aveva invece una tendenza opposta, con una rapida riduzione della concentrazione ematica in corrispondenza del priming con ritorno a valori basali ed una successiva lenta diminuzione dei livelli misurati (fig.30). Da un punto di vista analitico è da notare la riproducibilità delle calibrazioni dei due sensori prima e dopo l'esperimento.

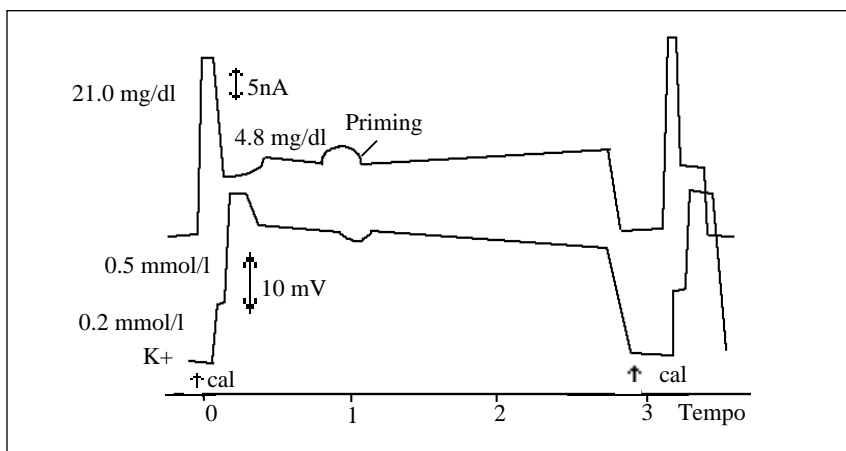


Figura 30. Misura in continuo del lattato e potassio in vivo durante un esperimento di "glucose clamp" con il pancreas betalike. La freccia con le lettere "cal" indica le calibrazioni per l'elettrodo a potassio e per il sensore a lattato prima ed alla fine dell'esperimento.

## Applicazioni in Medicina Sportiva

### **Determinazione del livello di soglia anaerobica in atleti durante esercizio fisico.**

Un altro esperimento effettuato con biosensori è stato la determinazione della soglia anaerobica (SA) in atleti che praticano le cosiddette discipline di fondo come maratona, 10000 metri, ciclismo, ecc. (Zeppilli e al 1988; Palleschi e al 1988). La soglia anaerobica è correlata alla capacità massima di consumo di ossigeno ( $VO_2\text{max}$ ) cioè alla massima intensità di lavoro che un soggetto può sostenere in condizioni aerobiche, durante sforzi incrementali dopo la quale l'aumento della concentrazione del lattato nel sangue causa una acidosi metabolica. Molti autori hanno misurato la SA utilizzando metodi indiretti come l'alterazione di alcune variabili selezionate dell'ossigeno e della  $CO_2$ . Un altro metodo indiretto è quello proposto da Conconi ed al. (1982) che si basa sul monitoraggio della frequenza cardiaca e la SA viene determinata sull'ipotesi che sopra il livello di SA, un aumento della velocità di corsa di un atleta è almeno in parte indipendente dalla  $VO_2\text{max}$ , quindi dalla frequenza cardiaca. Questa ipotesi è basata sul fatto che in alcuni soggetti Pendergast e al. (1979) hanno osservato che sopra la SA l'aumento di  $VO_2$  è minore dell'aumento dell'intensità di lavoro. In breve la soglia anaerobica è identificata dal punto in cui è osservata una relazione non lineare tra la frequenza cardiaca e la velocità di corsa. Questo metodo si presta molto bene per l'effettuazione di tests su campo ed è di estrema semplicità anche se la determinazione grafica appare qualche volta soggettiva e non sempre accurata. Il metodo proposto utilizzando il Betalike è diretto, cioè consente agli atleti di controllare la produzione di acido lattico in continuo simulando una corsa sul nastro trasportatore. La misura del lattato è possibile in questo caso sostituendo al pancreas artificiale il sensore a glucosio con uno a lattato. In questo caso è stato disconnesso il sistema a feed-back glucosio-insulina ed è stato elaborato un sistema per la misura del lattato. Il Betalike quindi è stato usato come uno strumento che preleva sangue dal paziente, lo diluisce, lo filtra e ne analizza il contenuto di lattato. In questo lavoro è stato aggiunto in serie al sensore a lattato un sensore per il glucosio, così è stato possibile monitorare entrambi i metaboliti in esperimenti di 20 minuti circa in atleti che simulavano corse sul nastro trasportatore. Il primo esperimento è stato il monitoraggio del lattato di un atleta di livello amatoriale che correva sul nastro trasportatore ad una velocità di 8 Km/ora chiedendogli di aumentare la velocità di 1 Km/ora ogni 5 minuti. Dopo 20 minuti (fig. 31) è iniziato l'aumento della concentrazione del lattato misurando dopo 5 minuti 3.6 mmol/l (una concentrazione di lattato pari a 4 mmol/l è considerata da alcuni autori come il punto di inizio della soglia anaerobica). A questo punto è stato chiesto all'atleta di fermarsi; la concentrazione di lattato è diminuita e tornata al valore iniziale. Dopo questo esperimento ne sono seguiti altri due di cui uno effettuato su di un maratoneta che ha variato la velocità molte volte ed a 19 Km/ora si è osservata una drastica variazione di lattato. In questo caso si è monitorato anche il glucosio che è rimasto costante durante la prestazione ma che è aumentato alla fine della prova durante la diminuzione del

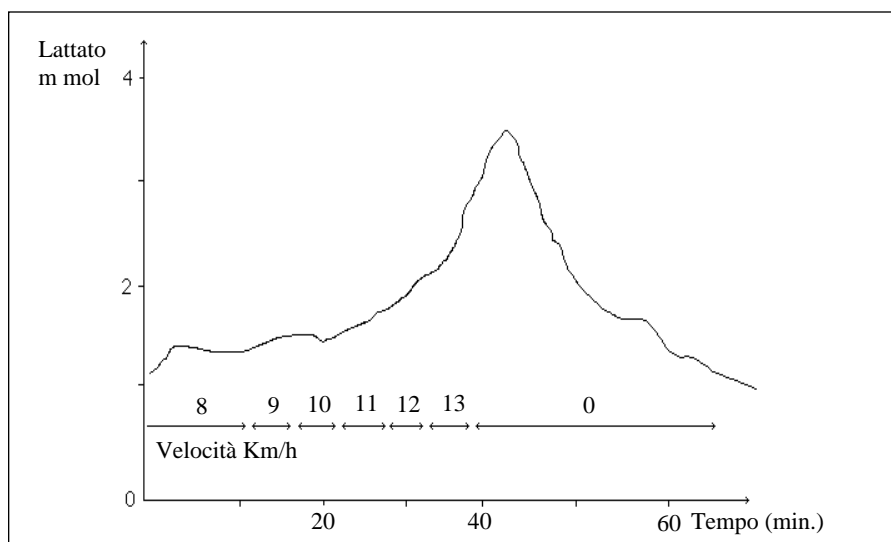


Figura 31. Misura in continuo del lattato in un atleta di livello amatoriale durante un esperimento preliminare per la valutazione della soglia anaerobica con il pancreas artificiale "Betalike". La prestazione e' stata effettuata su un nastro trasportatore.

lattato (fig. 32). Questo risultato è stato riportato da Siliprandi (1988) come un esempio della glicolisi anaerobica muscolare; qui è stato osservato in vivo in continuo, in tempo reale per la prima volta utilizzando due biosensori. Anche un secondo esperimento effettuato al cicloergometro su un pilota di formula 1 si è osservato per il lattato e

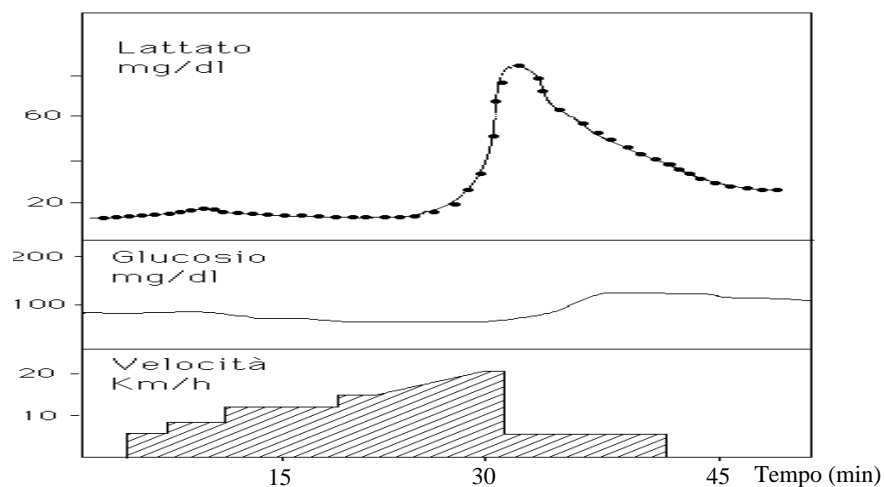


Figura 32. Misura in continuo del lattato e del glucosio in un maratoneta durante un esperimento per la valutazione della soglia anaerobica utilizzando il pancreas artificiale "Betalike". La prestazione e' stata effettuata su di un nastro trasportatore.

glucosio l'andamento descritto precedentemente anche se l'aumento della concentrazione di glucosio alla fine della prova non è stata così vistosa come per il maratoneta (fig. 33). Dopo questi esperimenti si è analizzato il contenuto di lattato in 13 persone di età compresa tra 24 e 56 anni eseguendo la procedura descritta. Nove soggetti erano atleti di alto livello e precisamente tre maratoneti, due triatleti e sei fondisti. Due erano corridori a livello amatoriale e tre sedentari. In questi soggetti non solo è stato possibile

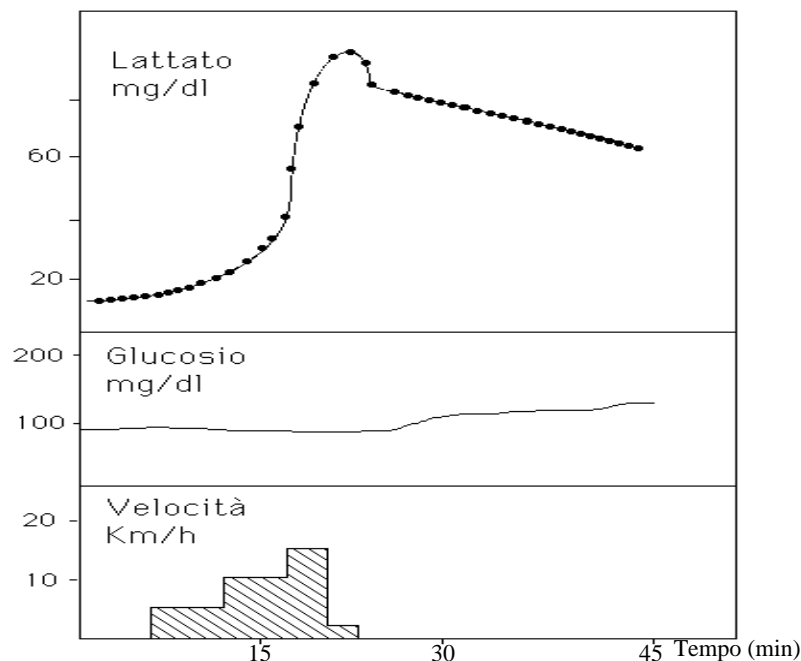
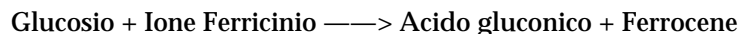


Figura 33. Misura in continuo del lattato e glucosio in un pilota di formula 1 durante un esperimento per la valutazione della soglia anaerobica utilizzando il pancreas artificiale "Betalike". La prestazione atletica è stata effettuata su di un cicloergometro.

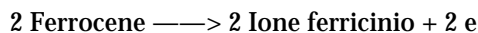
determinare il livello di soglia anaerobica ma anche la identificazione precisa ed in tempo reale del punto di inizio dell'accumulo di lattato in tutti i soggetti analizzati indipendentemente dal loro livello atletico. Questo valore che secondo alcuni autori è fissato ad una concentrazione di acido lattico di 2 mmol/l ma che in pratica è sempre compreso tra 1.5 e 2 mmol/l coinciderebbe con la individuazione della soglia aerobica e sarebbe ben individuato dalla variazione di acido lattico oltre un certo sforzo (vedi fig. 31). Questi risultati dovrebbero consentire quindi una più accurata programmazione dei protocolli delle prove da sforzo di molti atleti ed individuare con maggior precisione e direttamente il valore del punto di inizio del lattato.

## Sviluppi, applicazioni e prospettive future.

Quando si è parlato dei sensori amperometrici indipendenti dall'ossigeno si è accennato ai mediatori come sostanze elettroattive che possono sostituirlo nelle reazioni che coinvolgono enzimi ossidoriduttasi e che possono estendere il "range" di linearità di una determinazione altrimenti impossibile con sensori convenzionali. Un'applicazione di avanguardia in questo settore è stata la realizzazione di un dispositivo elettrochimico per la misura del glucosio su sangue intero chiamato "Glucose Pen". Il dispositivo dalle dimensioni appunto di una penna misura il glucosio in modo estremamente semplice: basta pungersi la punta di un dito e mettere la goccia di sangue sulla superficie di una striscetta metallica che è stata preventivamente fissata ad una estremità della penna. Si schiaccia un pulsante dopo aver atteso 30 secondi appare il valore della concentrazione del glucosio in mg/dl. Il principio di questa analisi sviluppato in Gran Bretagna ad Oxford e Cranfield (Green e Hill 1982) è basato sulla seguente reazione catalizzata dalla glucosio ossidasi:



il ferrocene, essendo un mediatore elettroattivo, viene ossidato a ione ferricinio sotto la superficie di un elettrodo opportunamente scelto nel modo seguente:



La corrente prodotta da questa ossidazione anodica è proporzionale alla concentrazione di glucosio nel sangue. Tutte queste reazioni sono state "condensate" grazie alla tecnologia dei biosensori, sopra una striscetta metallica e tutta la strumentazione racchiusa dentro il volume di una penna. Questo dovrebbe far pensare all'enorme potenzialità di questi metodi in termini di rapidità di risposta di affidabilità della misura (la precisione della misura è dell'1%) e di costo della strumentazione (100 dollari c.a.) ed agli innumerevoli risvolti in campo applicativo. Attualmente oltre al ferrocene sono allo studio molti altri mediatori per aumentare il numero di analisi cliniche con queste tecniche utilizzando altri enzimi. Lo sviluppo dei biosensori attualmente è in una fase incredibilmente fertile basti pensare che esistono più di 200 gruppi di ricerca nel mondo che stanno lavorando sulla realizzazione ed applicazione di questi "probes" e più del 50% di essi si occupa di applicazioni mediche. Un settore molto promettente è lo sviluppo dei sensori a fibre ottiche che consistono nella immobilizzazione di uno strato biocatalitico sulla punta di una fibra ottica. In presenza del bioanalita si genera un segnale luminoso che viene misurato e messo in relazione con la concentrazione del bioanalita. Sono già stati realizzati sensori a glucosio, urea, ed a NADH e con quest'ultimo è stato possibile determinare l'etanolo ed il lattato (Arnold 1987). Il vantaggio di usare fibre ottiche consiste nel fatto che essendo il segnale analitico di tipo luminoso il rivelatore non deve essere necessariamente in contatto con l'analita. Questo è indubbia

mente un grosso vantaggio specie nelle misure di campioni biologici; inoltre le fibre ottiche sono estremamente maneggevoli e facili da usare, sono molto adatte ad essere miniaturizzate quindi idonee per analisi in vivo. Il maggior interesse che suscita la ricerca e la applicazione medica dei biosensori è la miniaturizzazione di essi per analisi di monitoraggio in vivo. Ricercatori giapponesi, francesi ed inglesi stanno lavorando alla realizzazione di sensori "ad ago"; sono già stati realizzati sistemi per la misura del glucosio utilizzando sensori ad ago ed un sistema telemetrico di rivelazione funzionante sino a 20 metri (Shichiri e al 1988). Sebbene i risultati siano molto promettenti, non sono stati risolti ancora quelli della biocompatibilità del sensore impiantato, della stabilità e durata nel tempo e dell'aumento della linearità di risposta per alcuni metaboliti come il glucosio. Questi problemi sono oggetto di ricerca in Italia da parte di Mascini e Moscone che lavorano su sensori ad ago, utilizzando membrane biocompatibili "fabbricate in situ" sulla punta di un ago e che contengono tutti "gli ingredienti" per la misura analitica e da Campanella e coll. che sviluppano nuovi sensori con migliorate caratteristiche di sensibilità, stabilità e biocompatibilità. Quale è quindi il futuro delle applicazioni mediche dei biosensori? E una domanda alla quale non è difficile rispondere. I potenziali vantaggi dei biosensori per applicazioni medico-cliniche sono molto al di sopra dei normali metodi di analisi. I biosensori possono andare oltre i correnti limiti di velocità e sensibilità di analisi, inoltre si prestano molto bene alla realizzazione di metodi che hanno un basso costo per analisi. Questa è una cosa estremamente importante per i risvolti di politica economica che ne possono derivare, basti pensare che negli Stati Uniti il governo sta chiedendo agli ospedali e laboratori di analisi una politica di gestione più rigida in termini di "taglio dei costi" per le analisi cliniche e questo ha stimolato le industrie a sviluppare nuovi metodi di analisi veloci ed affidabili utilizzando una strumentazione poco costosa e di facile manutenzione (Technical Insights Inc. 1985). I biosensori in questo contesto sono visti come una potenziale miniera d'oro per le industrie chimico farmaceutiche. In alcuni casi i biosensori possono essere costruiti con materiale così poco costoso che il componente biologico può anche essere monouso. Una delle migliori opportunità per l'uso dei biosensori è la capacità che essi offrono per analisi "in loco" specie nei laboratori medici, o nelle analisi d'urgenza. Questo eliminerebbe l'invio dei campioni negli ospedali o nei laboratori di analisi. Un'altra idea di chi si occupa di sviluppo di metodi d'analisi per il controllo della salute direttamente "a casa" è quella di creare sistemi di misura economici che non si sono potuti fino ad ora realizzare a causa dei costi troppo elevati. I biosensori sembrano essere i sistemi idonei per disporre un giorno di un rivelatore a basso costo che ci avverta di qualche malattia in arrivo. I biosensori sono sistemi semplici da usare, quindi dovrebbero incontrare il parere favorevole dei pazienti sottoposti molte volte ad analisi piuttosto fastidiose. Un'idea sarebbe quella di avere un vetrino che il paziente semplicemente tocca con la punta della lingua per vedere se ha l'epatite o l'herpes; oppure sviluppare un multisensore racchiuso in un'area estremamente piccola da poter essere inserito nel paziente, e tramite esso i medici potrebbero monitorare diversi parametri ed eliminare i molti tubi o fili connessi al paziente.

## **Analisi in vivo**

Le analisi in vivo utilizzando i biosensori sia a breve che a lungo termine, potrebbero rappresentare un gran numero di possibilità virtualmente inesplorate. Misure come la tensione dell'ossigeno in cellule tumorali per scopi radiobiologici, livelli di tossine nel sangue, concentrazioni di elettroliti per evitare shock e livelli di sostanze rilasciate dai tessuti possono potenzialmente essere eseguite utilizzando i biosensori. Si potrebbe impiantare un sensore per esempio in un tumore localizzato tra la pelle ed il cranio di un paziente, monitorare sia lo sviluppo che la somministrazione di farmaci. Questo sarebbe un campo tutto da esplorare specie nel trattamento di aree infette da cancro. Questo sistema di rilascio di farmaci in continuo, sotto controllo e per un certo periodo di tempo, è un obiettivo non a lungo termine che si vuole raggiungere utilizzando sensori e biosensori. I biosensori troveranno una larga applicazione nello sviluppo degli organi e delle protesi artificiali. Sia il diabete che le malattie renali sono purtroppo ai primi posti delle classifiche nei paesi industrializzati. L'aver sviluppato sensori per glucosio, urea, e creatinina significa aver fatto un decisivo passo avanti verso la realizzazione di un pancreas o di un rene artificiale. I ricercatori sperano di poter sviluppare un sistema che misuri glucosio od insulina nel sangue e ne corregga il bilancio automaticamente allo stesso modo del pancreas; prima di realizzare questo si dovranno risolvere problemi di biocompatibilità e di stabilità del sistema impiantato in quanto è impensabile reimpiantarli ogni 1 o 2 settimane. Per quanto riguarda le protesi artificiali, si pensa di usare sensori nella interfaccia neurone-cellule muscolari per coordinare i movimenti e le risposte di protesi quali arti, occhi ed orecchi. Lo sviluppo di sensori a colina ed acetilcolina consentirà di investigare i problemi connessi con il più ininvestigato e misterioso elemento del corpo umano: il cervello. Verranno altresì sviluppati altri sensori per cercare di capire come il cervello lavora, il che potrebbe tradursi nella messa a punto di un nuovo tipo di computers con sistemi non ancora progettati.

## **Ringraziamenti**

Un particolare ringraziamento è dovuto a Roberta Saioni per la sua preziosa collaborazione nella stesura di questo lavoro.

## Bibliografia

- Arnold, M.A. Development of biosensors using optical fibers in: "Biosensors International Workshop 1987" Edited by R.D.Schmid pag.223
- Bombardieri, G. e al. Evaluation of a new system for the continuous monitoring of blood glucose, lactate and potassium. *International Journal of Artificial Organs* 1988 in press.
- Campanella e al. Metodi elettrochimici e chemiometrici nella determinazione dell'indice litogenico, in: "La bile: Aspetti chimici, farmacologici e fisiologici". Roda, A.; Roda, E.; D'ascenzo, G.; Barbara, L. Eds. 43, 1985
- Campanella e al. Determination of choline containing phospholipids in human bile and serum samples by a new enzyme sensor. *Clin. Chim. Acta* 151: 71, 1985
- Campanella e al. A new assay for choline containing phospholipids in amniotic fluid by an enzyme sensor. *Clin.Chim.Acta* 169: 175, 1987
- Cardosi, M. F. and Turner, A. P. F. The realization of electron transfer from biological molecules to the electrodes in: "Biosensors Fundamentals and Applications", pag 257
- Clark, L.C. and Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 102: 583, 1962
- Conconi, F e al. Determination of the anaerobic threshold by a non invasive field test in runners. *J. Appl. Physiol.* 52: 869, 1982
- Green, J.M. e Hill, O.H.A. Amperometric enzyme electrodes. *J.Chem.Soc., Faraday Trans. 1*, 82: 1237, 1986
- Guilbault, G.G. *Analytical uses of immobilized enzymes* Marcel Dekker esd 1984
- Introzzi, P. *Trattato Italiano di Medicina Interna. Malattie del sangue e degli organi emopoietici; malattie del sistema reticolo istiocitario.* USES, 1979
- Luzzana, M. e al. Measurement of glucose in plasma by a differential pH technique. *Clin.Chem* 29: 80, 1983.
- Mascini, M. e al. Ammonia abatement in flow system for creatinine determination in clinical samples. *Anal.chim.Acta* 171: 175, 1985a .
- Mascini, M. e al. A lactate electrode with lactate oxidase immobilised on nylon net for blood serum samples in flow system. *Anal.chim.Acta* 157: 45, 1984
- Mascini, M. e al. An L-lactate sensor with immobilised enzyme for use in vivo studies with an endocrine artificial pancreas. *Clin.chem.* 31: 415, 1985b
- Mascini, M. e al. Determination of free and total cholesterol in human bile samples using an enzyme electrode. *Clin.chim.Acta* 132: 7, 1983
- Mascini, M e al. pH Electrode-based enzyme immunoassay, human chorionic gonadotropin. *Anal Letters* 15(B2): 101, 1982a
- Mascini, M. e al. A liver tissue-based electrochemical sensor for hydrogen peroxide. *Anal.chim.Acta* 138: 65, 1982b
- Mascini, M. e Palleschi, G. A tissue-based electrode for peroxidase assay: preliminary results in hormone determinations by EIA *Anal. Letters* 16: 1053, 1983



- Mascini, M. e al. A Lactate sensor with immobilized enzyme for use in vivo with an endocrine artificial pancreas. *Clin.chem.*31: 451, 1985 .
- Mascini, M. e al. Lactate and pyruvate electrochemical biosensors for whole blood in extracorporeal experiments with an endocrine artificial pancreas. *Clin.Chem.*33: 591, 1987
- Mascini, M. and Liberti, A. An enzyme coupled cyanide solid state electrode *Anal.chim.Acta* 68: 177, 1974
- Mascini, M. and Mazzei, F. Amperometric sensor for pyruvate with immobilised pyruvate oxidase. *Anal.chim.Acta* 192: 9, 1987
- Mascini, M. and Moscone, D. Amperometric acetylcholine and choline sensors with immobilised enzymes. *Anal.chim.Acta* 179: 439, 1986
- Mascini, M. and Palleschi, G. Design and Application of Enzyme Electrode Probes. *Selective Electrode Review* 1988-89 in press
- Mascini, M. and Palleschi, G. A flow-through detector for simultaneous determinations of glucose and urea in serum samples. *Anal.Chim.Acta* 145: 213, 1983
- Mascini, M. and Palleschi, G. Determination of creatinine in clinical samples with a creatininase reactor and an ammonia probe. *Anal.Chim.Acta* 136: 62, 1982
- Matsunaga, T. e al. Determination of cell numbers of lactic acid producing bacteria by lactate sensor. *Eur.J.Appl.Microbiol Biotechnol.* 16: 157, 1982
- Palleschi, G. Immobilised dehydrogenase enzymes coupled with a NADH sensor, in: "Analytical uses of immobilised biological compounds for detection, medical and industrial uses". Guilbault & Mascini Eds. D.Reidel Publishing Co N.Y. 1987
- Palleschi, G. e al. A study of interferences in glucose measurements in blood by hydrogen peroxide based glucose probes. *Anal.Biochem.* 159: 114, 1986
- Palleschi, G. e al. Biosensor application in Medicine by continuous monitoring of metabolites. *Proceedings of MRS International Meeting Tokyo* 30 May 2 June 1988
- Pendergast, D., Cerretelli, P. and Rennie, D.W. Aerobic and glycolytic metabolism in arm exercise. *J. App. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 47: 754-60, 1979
- Shichiri, M. e al. Needle-type glucose sensor and its clinical application. In "Biosensors" APF Turner, I? Karube and GS Wilson Editors. Oxford Science Publication 1988 pag 409
- Siliprandi, N. *Aspetti Biochimici dell'esercizio fisico e dell'allenamento.* *Biochimica Clinica* 12: 165, 1988
- Technical Insights, Inc. Eds. *Biosensors: Today's Technology Tomorrow's products* SEAI Madison, GA 1985
- Turner, A. P. F. and Pickup, J. C. *Diabetes Mellitus: Biosensors for Research and Management* *Biosensor* 1: 85, 1985
- Updike, G. J. and Hicks, G. P. The enzyme electrode *Nature* 214: 986, 1967
- Zeppilli, P. e al. *Esercizio e curva lattacidemica.* *Scuola dello Sport (Rivista di cultura sportiva CONI) Anno VII Nuova serie No 13, Giugno 1988*

# Indice

Editoriale.....	pag. 3
Introduzione.....	» 5
Biosensori elettrochimici .....	» 7
Sensori amperometrici .....	» 8
Elettrodi ad ossigeno .....	» 8
Sensore ad acqua ossigenata.....	» 9
Sensori potenziometrici.....	» 10
Mediatori biologici .....	» 12
Immobilizzazione di mediatori biologici .....	» 14
Immobilizzazione di enzimi attraverso reazioni chimiche.....	» 15
Reazioni di immobilizzazione .....	» 16
Membrane da dialisi.....	» 17
Assemblaggio di biosensori elettrochimici .....	» 18
Applicazioni in medicina .....	» 19
Determinazione del glucosio.....	» 19
Determinazione dell'urea .....	» 20
Determinazione della creatinina.....	» 23
Determinazione della colina e dell'acetilcolina .....	» 25
Determinazione del lattato .....	» 26
Determinazione del piruvato .....	» 27
Determinazione delle proteine totali.....	» 28
Procedimento e risultati per le analisi di proteine .....	» 32
Proteasi immobilizzata su agarosio .....	» 32
Proteasi immobilizzata su tubi di nylon .....	» 34
Determinazione del colesterolo libero e totale nella bile umana .....	» 35
Determinazione dei fosfolipidi nella bile e nel siero .....	» 35
Determinazione della gonadotropina corionica.....	» 37
Determinazione dell'insulina.....	» 42
Procedimento con il sensore a tessuto epatico.....	» 43
Immunoassay con insulina .....	» 44
Applicazioni in diabetologia.....	» 46
Applicazioni in medicina sportiva.....	» 50
Determinazione del livello di soglia anaerobica in atleti durante esercizio fisico.....	» 50
Sviluppi, applicazioni e prospettive future .....	» 53
Analisi in vivo .....	» 55
Bibliografia .....	» 56
Indice .....	» 58

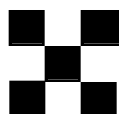
## Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio

1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rassu S.: *L'obesità*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La  $\beta$ -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimoimmunologico ed fluoroimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.
31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnassi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M., Gullo D.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.

***Ad ogni passo nasce un pensiero!!!!***

*Abbiamo una esperienza ultradecennale.  
Abbiamo pubblicato riviste in italiano, inglese, francese, spagnolo,  
albanese...*

*Abbiamo distribuito le nostre riviste in tutto il mondo: dalle  
Americhe all'Australia, dall'Europa alla Cina, dall'Africa alla  
Confederazione degli Stati Indipendenti.*



**MEDICAL SYSTEMS S.P.A.**

*...IL FUTURO HA IL CUORE ANTICO*

**Editor in Chief:** Dott. Sergio Rassu

Via Pietro Nenni, 6

07100 Sassari

Tel. e Fax 079 270464; E-mail: rassu@mbox.vol.it

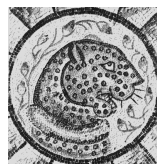
**Amministrazione:** Medical Systems S.p.A.

Via Rio Torbido, 40 - 16165 Genova (Italy)

Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 8 01005 (senza prefisso);

Telex 270310 Ideal I.

Telefax (010) 803498- 809070.



**EDITORE**

*Abbiamo deciso di mettere a Vostra disposizione la nostra esperienza,  
la nostra passione, le nostre tecnologie  
per la pubblicazione di Atti di Congressi,  
per la ideazione e realizzazione di riviste scientifiche, per la  
pubblicazione di libri e monografie, per la raccolta e  
stampa di articoli scientifici.....*

**Consultateci!!!!!!**

**Caleidoscopio**  
anno 7, numero 42

Rivista monografica di Medicina

**Direttore Responsabile**

Sergio Rassu  
Via Pietro Nenni, 6  
07100 Sassari  
(079) 270464



**Editore**

Medical Systems S.P.A.  
Via Rio Torbido, 40  
16165 Genova (Italy)  
tel. (010) 808051(7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);  
Telex 270310 Ideal I.  
Telefax (010) 804661- 802257.

**Segretaria di Direzione**

Fiorella Gaggero

**Servizio Abbonamenti**

Tamara Sonaro

**Stampa**

G. Martelli Arte Grafica S.p.A  
Via Lungotorrente Secca, 12r - Tel. (010) 710241/2  
16163 Genova - S. Quirico

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84

Finito di stampare nel Maggio 1989

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprieta' letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Associata all'USPI  
Unione Stampa Periodica Italiana



Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:  
"L'ECO DELLA STAMPA"  
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4  
- 3/8/6 DPR 627/78)