

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Εφαρμογή αισθητήρων Βιοηλεκτρικής  
Αναγνώρισης (ΒΕΡΑ) νεότερης γενιάς  
στην ιολογία**

**ΑΝΤΩΝΙΟΣ Κ. ΠΕΡΔΙΚΑΡΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2011**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Σπυρίδων Κιντζιος**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Θέμα: Εφαρμογή αισθητήρων Βιοηλεκτρικής**  
**Αναγνώρισης (BERA) νεότερης γενιάς στην ιολογία**

**ΑΝΤΩΝΙΟΣ Κ. ΠΕΡΔΙΚΑΡΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2011**

**Επιβλέπων καθηγητής: ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΚΙΝΤΖΙΟΣ**



**Τύπος Εργασίας:** Διδακτορική Διατριβή

**Θέμα:** Εφαρμογή αισθητήρων Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (BERA) νεότερης γενιάς στην ιολογία

**Ονοματεπώνυμο φοιτητή:** Αντώνιος Κ. Περδικάρης

**Επιβλέπων καθηγητής:** Σπυρίδων Κίντζιος

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

<b>Κίντζιος Σπυρίδων</b>	Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
<b>Κλώνης Ιωάννης</b>	Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
<b>Χανιωτάκης Νικόλαος</b>	Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

<b>Κίντζιος Σπυρίδων</b>	Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
<b>Κλώνης Ιωάννης</b>	Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
<b>Χανιωτάκης Νικόλαος</b>	Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
<b>Φασσέας Κωνσταντίνος</b>	Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
<b>Λάμπρου Νικόλαος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
<b>Δελλαδέτσιμα Ιωάννα</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών
<b>Χατζηβασιλείου Ελισάβετ</b>	Επίκουρη Καθηγήτρια Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών



## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

Περιεχόμενα	5
Περίληψη	11
Abstract	15
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	19
1. Βιοαισθητήρες	21
1.1 Ορισμός κυτταρικών βιοαισθητήρων	23
1.2 Τύποι κυτταρικών βιοαισθητήρων	24
1.3 Βασικές Ιδιότητες των Κυτταρικών Βιοαισθητήρων	25
2. Περιγραφή της Βιοηλεκτρικής Μεθόδου Αναγνώρισης (BERA)	31
2.1 Βιοαισθητήρες 1 <sup>ης</sup> γενιάς	33
2.2 Βιοαισθητήρες BERA νεότερων γενιών	36
3. Δομικά τμήματα του βιοαισθητήρα BERA	41
3.1 Τα κύτταρα Vero	43
3.2 Το αλγινικό ασβέστιο στους αισθητήρες BERA	44
3.3 Χρήση «τροποποιημένων» κυττάρων στους αισθητήρες BERA	46
4. Ηλεκτρικές ιδιότητες των κυττάρων	49
4.1 Δυναμικό της Μembrάνης	51
4.2 Χωρητικότητα C του κυττάρου	53
4.3 Κανάλια Ιόντων	54
4.4 Είδη Καναλιών Ιόντων	55
4.4.1 Κανάλια Νατρίου	55
4.4.2 Κανάλια Καλίου	57
4.4.3 Κανάλια Ασβεστίου	59
4.5 Υπολογισμός δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης	61
4.5.1 Το μοντέλο Hodgkin-Huxley	62
5. Η διαδικασία της ηλεκτροπόρωσης	65
6. Νευρωνικά δίκτυα	71
6.1 Τι είναι τα νευρωνικά δίκτυα;	73
6.2 Συνδυασμός νευρωνικών δικτύων και βιοαισθητήρων BERA	76
7. Ιοί	79
7.1 Διάγνωση Ιών	81

7.2 Ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς	82
7.3 Ο ιός του κροταλισμού του καπνού	84
7.4 Ο ιός Y της πατάτας	87
7.5 Ο ιός B της ηπατίτιδας	87
7.5.1 Δομή του γονιδιώματος του HBV	89
7.5.2 Πορεία Ορολογικών Φαινομένων κατά την Οξεία Λοίμωξη από HBV	91
7.6 Ο ιός C της ηπατίτιδας	96
8. Σκοπός της Εργασίας	99
9. Πειραματικό μέρος	103
9.1 Εφαρμογή της μεθόδου BERA στην ανίχνευση του ιού του Μωσαϊκού της Αγγουριάς ( <i>Cucumber mosaic virus</i> ) και του ιού του Κροταλισμού του Καπνού ( <i>Tobacco rattle virus</i> )	105
9.1.1 Υλικά και Μέθοδοι	105
9.1.2 Παρασκευή βιοαισθητήρων για την ανίχνευση του CMV	105
9.1.3 Προετοιμασία των βιοαισθητήρων	106
9.1.4 Καταγραφή και επεξεργασία δεδομένων	107
9.1.5 Μέθοδος ανίχνευσης του CMV	108
9.1.6 Αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης κυττάρου και ιού	109
9.1.7 Πειραματικός σχεδιασμός	109
9.1.8 Παρασκευή βιοαισθητήρων για την ανίχνευση του TRV	110
9.1.9 Καταγραφή και επεξεργασία δεδομένων	110
9.1.10 Μέθοδος ανίχνευσης του TRV	110
9.1.11 Αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης κυττάρου και ιού	111
9.1.12 Πειραματικός σχεδιασμός	111
9.1.13 Μελέτη της επίδρασης των TRV και CGMMV στο δυναμικό μη «τροποποιημένων» κυττάρων Vero	112
9.2 Αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου BERA στην ανίχνευση του ιού του Μωσαϊκού της Αγγουριάς ( <i>Cucumber mosaic virus, CMV</i> ) και του ιού του Κροταλισμού του Καπνού ( <i>Tobacco rattle virus, TRV</i> )	112
9.2.1 Αποκρίσεις των βιοαισθητήρων βασισμένων σε κύτταρα των οποίων η μεμβράνη τροποποιήθηκε με αντισώματα του CMV	112

9.2.2 Αποκρίσεις των βιοαισθητήρων βασισμένων σε κύτταρα των οποίων η μεμβράνη τροποποιήθηκε με αντισώματα του TRV	114
9.2.3 Αποκρίσεις των βιοαισθητήρων βασισμένων σε κύτταρα Vero των οποίων η μεμβράνη δεν τροποποιήθηκε	117
9.3 Εφαρμογή της μεθόδου BERA στην ανίχνευση του HBV και anti-HBs σε κλινικά δείγματα	118
9.3.1 Υλικά και Μέθοδοι	119
9.3.2 Παρασκευή βιοαισθητήρων από κύτταρα Vero	120
9.3.3 Προετοιμασία δειγμάτων	120
9.3.4 Διαδικασία ελέγχου	121
9.3.5 Μελέτη των μεταβολών της συγκέντρωσης ιόντων $Ca^{2+}$	122
9.3.6 Πειραματικός σχεδιασμός	122
9.3.7 Μελέτη της επίδρασης των HBV (HBsAg) και HCV στο δυναμικό μη τροποποιημένων κυττάρων Vero	123
9.4 Αποκρίσεις των βιοαισθητήρων βασισμένων σε κύτταρα των οποίων η μεμβράνη τροποποιήθηκε με anti-HBs, anti-HBe ή HBsAg	123
9.5 Αποκρίσεις των βιοαισθητήρων βασισμένων σε κύτταρα Vero των οποίων η μεμβράνη δεν τροποποιήθηκε, στους HBV (HBsAg) και HCV	131
9.6 Εφαρμογή της μεθόδου BERA στην ανίχνευση των ιών: του Μωσαϊκού της Αγγουριάς ( <i>Cucumber mosaic virus</i> ), του Κροταλισμού του Καπνού ( <i>Tobacco rattle virus</i> ) και του Y της πατάτας ( <i>Potato virus Y</i> )	132
9.6.1 Υλικά και Μέθοδοι	135
9.6.2 Παρασκευή βιοαισθητήρων για την ανίχνευση φυτικών ιών	135
9.6.3 Ηλεκτροεισαγωγή αντισωμάτων στην κυτταρική μεμβράνη	135
9.6.4 Προετοιμασία των βιοαισθητήρων	136
9.6.5 Καταγραφή και επεξεργασία δεδομένων	136
9.6.6 Μέθοδος ανίχνευσης των ιών	137
9.6.7 Πειραματικός σχεδιασμός	138



9.7 Αποκρίσεις των βιοαισθητήρων στους ιούς του Μωσαϊκού της Αγγουριάς ( <i>Cucumber mosaic virus</i> ), του Κροταλισμού του Καπνού ( <i>Tobacco rattle virus</i> ) και του Υ της πατάτας ( <i>Potato virus Y</i> )	138
9.7.1 Δείγματα καθαρού ιού	138
9.7.2 Δείγματα τεχνητά μολυσμένων από ιό ιστών	141
9.8 Ανάπτυξη αμπερομετρικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του ιού Υ της πατάτας – Συγκριτική μελέτη με τους βιοαισθητήρες BERA	145
9.8.1 Υλικά και εξοπλισμός	146
9.8.2 Διαδικασία Ελέγχου	148
9.9. Αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης του αμπερομετρικού βιοαισθητήρα και των αισθητήρων BERA στην ανίχνευση του ιού Υ της πατάτας	148
10. Συμπεράσματα - Συζήτηση	151
11. Μελλοντικά Σημεία Έρευνας	159
Βιβλιογραφία	163
Πρότυπες Επιστημονικές Δημοσιεύσεις	177

## Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διατριβή θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους, χωρίς την υποστήριξη τους δεν θα ήταν δυνατή η περάτωση της προσπάθειας μου. Ευχαριστώ,

τον υπεύθυνο καθηγητή μου κ. Σπυρίδωνα Κίντζιο, που χωρίς τη δική του συμβολή θα ήταν πραγματικά δύσκολο να ολοκληρώσω την παρούσα διατριβή, αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο.

τα μέλη της επιτροπής μου Καθηγητές κ. Ι. Κλώνη και Ν. Χανιωτάκη για τη συνεισφορά τους στην πραγματοποίηση αυτής της διατριβής, τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, Καθηγητή κο Κ. Φασσέα, Αναπληρωτή Καθηγητή κο Ν. Λάμπρου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Ι. Δελλαδέτσιμα και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Ε. Χατζηβασιλείου για τις πολύτιμες υποδείξεις τους κατά την τελική διαμόρφωση της παρούσας διατριβής.

Δεν μπορώ να ξεχάσω την σημαντική βοήθεια των συναδέλφων μου της κας Γ. Μοσχοπούλου, στην οποία εύχομαι γρήγορα να περατώσει τη διδακτορική της διατριβή, του κ. Ι. Γιακουμέτη, του οποίου η συνεργασία ήταν ιδιαίτερα πολύτιμη καθώς και του κ. Ι. Παπαναστασίου,

το Μικροβιολογικό Τμήμα του Ιπποκράτειου Νοσοκομείου της Αθήνας και ειδικότερα τον κ. Ν. Αλεξανδρόπουλο για την παροχή υλικών αλλά και πολύτιμων συμβουλών σε θέματα που αφορούν τους Ηπατικούς ιούς.

Το κτηνιατρικό εργαστήριο του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων και ειδικότερα την κα Ο. Μαγγανά και την κα Κ. Νομικού για την παροχή υλικών και καλλιεργειών ζωικών κυττάρων αλλά και για την ηθική στήριξη τους σε όλη τη διάρκεια της διατριβής μου.

Το εργαστήριο Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου και ειδικότερα τους κ. Χ. Βαρβέρη, κ. Φ. Μπέμ και τον κ. Ν. Βασιλάκο για τη βοήθεια τους κατά τις εφαρμογές ανίχνευσης φυτικών ιών.

Θεωρώ επίσης υποχρέωση μου να ευχαριστήσω την Γενική Γραμματέα Αγροτικής Πολιτικής και Διεθνών Σχέσεων του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων κα Γ. Μπαζώτη, της οποίας έχω την τιμή να είμαι συνεργάτης, για την εμπιστοσύνη που έχει δείξει στο πρόσωπο μου

ως τώρα, αλλά και για την στήριξη και κατανόηση της για τις απουσίες μου κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Τον συνάδελφο μου κο Ι. Κασιούρα, του οποίου η βοήθεια ήταν και συνεχίζει να είναι ανεκτίμητη σε κάθε βήμα της επαγγελματικής μου πορείας.

Τέλος την οικογένεια μου τη σύζυγο μου Αγγελική για την συμπαράσταση της και την ενθάρρυνση της σε όλες μου τις προσπάθειες, αλλά και τα παιδιά μου, τον Κωνσταντίνο και την Μαριαλέτα, που με την παρουσία τους μου έδιναν πάντα κουράγιο ώστε να καταφέρω να περατώσω τη διδακτορική μου διατριβή παράλληλα με την εργασία μου.

Θέλω να ελπίζω ότι αυτή η εργασία θα αποτελέσει μια βάση για το εργαστήριο, στο οποίο εργάστηκα και μου πρόσφερε την απαραίτητη υλικοτεχνική υποδομή, για περαιτέρω έρευνα με εντατικότερους ρυθμούς και καλύτερα αποτελέσματα από εκείνα που κατάφερα στην προσπάθεια μου να επιτύχω.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή περιγράφεται η ανάπτυξη μια βασικής δομής κυτταρικών βιοαισθητήρων, οι οποίοι θα μπορούν να ανιχνεύουν σε ελάχιστο χρόνο και με ικανοποιητική ευαισθησία, αντιγόνα και αντισώματα ιών. Η μεθοδολογική προσέγγιση εστιάζεται στην χρήση γνωστών εργαστηριακών τεχνικών στη βιολογία, βασισμένων στη Βιοηλεκτρική Δοκιμή Αναγνώρισης (Bioelectric Recognition Assay – BERA) για την επίτευξη ενός απλού στη λειτουργία συστήματος ανίχνευσης ιών, σε φυτικούς και ανθρώπινους οργανισμούς.

Επίσης, περιγράφεται η χρήση της τεχνικής της ηλεκτροπόρωσης για την δημιουργία εξειδικευμένων «τροποποιημένων» κυττάρων στην παρουσία συγκεκριμένων ιών. Σαν αντιπροσωπευτικό παράδειγμα χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες Vero, στην μεμβράνη των οποίων με τη χρήση της εν λόγω τεχνικής, εισήχθησαν αντισώματα των ιών CMV ή TRV ως προς την ανίχνευση των αντίστοιχων ιών που προσβάλλουν φυτικούς οργανισμούς και αντισώματα και αντιγόνα του HBV.

Σε σχέση με το πρώτο τμήμα του πειραματικού μέρους, η πρόσδεση του CMV στα κύτταρα του αισθητήρα και, σε δεύτερο πείραμα, του TRV, είχε σαν αποτέλεσμα την πρόκληση συγκεκριμένης και μετρήσιμης μεταβολής στο δυναμικό της μεμβράνης των «τροποποιημένων» κυττάρων του βιοαισθητήρα. Αντίθετα η παρουσία μη ομόλογων ιών όπως του CGMMV και του PVY δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στο δυναμικό της μεμβράνης των κυττάρων.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού, όπου η παρουσία ομόλογου ιού ως προς τα αντισώματα που έφεραν τα «τροποποιημένα» κύτταρα, είχε σαν αποτέλεσμα τη μεταβολή της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου του κυτταροπλάσματος.

Επιπρόσθετα η εφαρμογή της ανωτέρω μεθόδου σε δείγματα καθαρού ιού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις: 0.0 ng ml<sup>-1</sup> (control), 5.0, 7.0, 10.0, 13.0 και 20.0 ng ml<sup>-1</sup>, στην περίπτωση του TRV μας έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς τη δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού του ιού.

Μελετήθηκε επίσης η επίδραση των TRV και CGMMV στο δυναμικό των ινοβλαστών Vero, καθώς και η πιθανότητα χρήσης μη

τροποποιημένων κυττάρων στην ανίχνευση των εν λόγω ιών. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η αντίδραση δεν είναι μεν εξειδικευμένη όμως είναι εμφανής η επίδραση των δύο ιών στο μεμβρανικό δυναμικό.

Η ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα BERA ως εφαρμογή στην ανίχνευση της παρουσίας ηπατικών ιών βασίστηκε στις ίδιες τεχνικές, προσαρμοσμένες στις ιδιαιτερότητες των εν λόγω ιών. Η τροποποίηση των κυττάρων περιελάμβανε την εισαγωγή, με τη χρήση της τεχνικής της ηλεκτροπόρωσης, στην μεμβράνη των κυττάρων Vero του βιοαισθητήρα, αντισωμάτων (anti-HBs, anti-HBe) σαν πρώτη εφαρμογή για την ανίχνευση των αντίστοιχων αντιγόνων του HBV και ως δεύτερη εφαρμογή την εισαγωγή αντιγόνου του ίδιου ιού (HBsAg) για την ανίχνευση του αντίστοιχου αντισώματος.

Η εφαρμογή έλαβε χώρα σε κλινικά δείγματα ορού αίματος ασθενών, ενώ ως ετερόλογος ιός χρησιμοποιήθηκε ο ιός C της ηπατίτιδας (HCV). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε πολύ μικρό χρόνο μόλις 45 δευτερόλεπτα είναι δυνατή η ανίχνευση των μολυσματικών στοιχείων του ιού, αλλά και η εξαγωγή συμπερασμάτων για το στάδιο της μολυσματικότητας που βρίσκεται ο ασθενής.

Η εκλεκτικότητα των βιοαισθητήρων BERA βασισμένων σε «τροποποιημένα» κύτταρα εξαρτάται πάντα από την εξειδίκευση των αντισωμάτων ή των αντιγόνων που έχου εισαχθεί στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Συνεπώς η περιγραφείσα μεθοδολογική προσέγγιση ενσωματώνει πολλά από τα μειονεκτήματα που εμφανίζουν και οι ορολογικές μέθοδοι. Παρόλα αυτά όμως πλεονεκτεί σημαντικά ως προς την ευαισθησία, την ταχύτητα απόκρισης και την επαναληψιμότητα. Συγκριτικά με τους οπτικούς και ηλεκτροχημικούς αισθητήρες, το σύστημα που περιγράφεται στην παρούσα εργασία έχει τα επιπλέον πλεονεκτήματα της απλούστερης χρήσης και της ολοκλήρωσης της διαδικασίας ανίχνευσης σε ένα βήμα. Θα πρέπει όμως να επισημανθεί ότι αποτελεί ένα προκαταρκτικό στάδιο για την ανάπτυξη ενός ολοκληρωμένου συστήματος βιοαισθητήρα, το οποίο θα βασίζεται σε κύτταρα των οποίων η μεμβράνη έχει τροποποιηθεί κατάλληλα,

προσδίδοντας τους εξειδίκευση ως προς το μόριο, χημική ένωση ή μικροοργανισμό που πρόκειται να αναλυθεί.

Όπως και στην περίπτωση των TRV και CGMMV μελετήθηκε και η επίδραση της παρουσίας του HBsAg και του HCV στο δυναμικό της μεμβράνης των κυττάρων Vero για μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή και διαπιστώθηκε, ότι ναι μεν δεν μπορούν απλά κύτταρα να δώσουν εξειδικευμένη αντίδραση, οι τιμές όμως του δυναμικού για τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή μεταβάλλονται γραμμικά.

Εξετάσθηκε εκ νέου η δυνατότητα ανάπτυξης βιοαισθητήρα ανίχνευσης ιών οι οποίοι προσβάλουν φυτικούς οργανισμούς, βασικά χαρακτηριστικά του οποίου ήταν η χρήση αυτοματοποιημένου συστήματος επαφής των ηλεκτροδίων με τους βιοαισθητήρες. Οι τελευταίοι παρασκευάστηκαν στο εσωτερικό των μικροκοιλοτήτων μιας πλάκας ELISA, δημιουργώντας κατά αυτό τον τρόπο ένα σταθερό σύστημα.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τους TRV, CMV και PVY, σε δείγματα καθαρού ιού αλλά και δείγματα ιστών τα οποία είχαν μολυνθεί από τους εν λόγω ιούς σε συγκεντρώσεις 1, 10 και 100 ngml<sup>-1</sup>. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι σε πρώτο στάδιο είναι εφικτή η ανίχνευση ιών σε δείγματα τεχνητώς μολυσμένα από έναν ιό ή περισσότερους, το όριο ανίχνευσης είναι παρόμοιο με το αντίστοιχο της ELISA (1.0ngml<sup>-1</sup>) και υπάρχει η δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού του ιού στο δείγμα μέσω των παραγόμενων γραφημάτων.

Για την συγκριτική μελέτη της απόδοσης των βιοαισθητήρων BERA εξειδικευμένων στην ανίχνευση του PVY αναπτύχθηκε ένας αντίστοιχος αμπερομετρικός αισθητήρας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι μεν σαφής ο διαχωρισμός θετικού και μη θετικού δείγματος (μη ομόλογοι ιοί ή υγιές δείγμα), αλλά το όριο ανίχνευσης είναι υψηλότερο από το αντίστοιχο της μεθόδου BERA. Συνεπώς δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ιών, των οποίων το φορτίο είναι πολύ χαμηλό σε ένα δείγμα. Αντίθετα, η ανίχνευση είναι δυνατή με την χρήση των βιοαισθητήρων BERA.

**Λέξεις κλειδιά:** Κυτταρικοί βιοαισθητήρες, Βιοηλεκτρική Μέθοδος Αναγνώρισης, Ιοί Υπατίτιδας, κύτταρα Vero, ηλεκτροπόρωση, TRV, CMV, PVY

## ABSTRACT

In the present PhD thesis the development of a cell-biosensor basic structure is described, which might detect, in minimal time and with satisfactory sensitivity, antigens and antibodies of viruses. The methodological approach is focused on the use of established laboratory techniques in biology, based on Bioelectric Recognition Assay (BERA), for the development of a simple operating system for the detection of viruses, in plants and humans.

The use of electroporation is also described, for the preparation of “membrane-engineered” cells displaying a specific response to certain viruses. As representative example Vero fibroblasts were used, in the membrane of which, were inserted antibodies of CMV or TRV. The attachment of the homologous virus triggered the change of the cell membrane potential. All cells were immobilized in an alginate matrix.

Regarding the first experimental part, the attachment of CMV on the cell-biosensor cells, bearing the homologous antibody and respectively in the studies with TRV, had as result the measurable change of the “membrane-engineered” cells’ potential. On the contrary the presence of non-homologous viruses such as CGMMV and PVY did not trigger any change.

The above results were also confirmed with the use of fluorescence microscopy, where the presence of a homologous virus caused the change of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the cytoplasm.

The same process was applied to pure virus solutions in different dilutions: 0.0 ng ml<sup>-1</sup> (control), 5.0, 7.0, 10.0, 13.0 and 20.0 ng ml<sup>-1</sup> and in the case of TRV the results were encouraging regarding the possibility of quantitative determination of the virus.

A short study was carried out as well, in order to evaluate the reaction of Vero cells, which were not “membrane engineered”, to the presence of TRV and CGMMV. The reaction was not specific, but it was obvious that the viruses’ presence triggered changes to the cell membrane potential.



The development of a BERA biosensor as an application for the detection of hepatitis viruses was based on the same method. Two applications took place: The first application was related to the insertion, by electroporation, of antibodies (anti-HBs, anti-HBe) on the membrane surface, for the detection of homologous antigens of HBV. The second application regarded the insertion of the antigen of the homologous virus (HBsAg) for the detection of the corresponding homologous antibody (anti-HBs). An alginate matrix was used as well for the immobilization of the “membrane engineered” cells.

The method was applied on clinical samples; whereas hepatitis C virus (HCV) was used as the heterologous virus. The results showed that, in a very short time period (approximately 45 seconds) it is possible to detect virus elements, as well as to obtain information regarding the patient’s infectivity stage.

The specificity of BERA biosensors based on “membrane engineered” cells depends from the specialisation of the antibodies or antigens, inserted on the surface of the cellular membrane. Consequently the described methodological approach incorporates similar disadvantages with the immunological methods. However it has other advantages such as sensitivity, short time response and reproducibility. Comparatively with the optical and electrochemical biosensors, the described in the present study system, has an additional advantage, which is the one step process.

It should be pointed out that the described method is a preliminary stage for the development of a biosensor system, based on “membrane-engineered” cells, incorporating a specialisation to the molecule, chemical compound or micro-organism that is going to be analyzed.

A short study was carried out also in this case, in order to evaluate the reaction of Vero cells, which were not “engineered”, to the presence of HBsAg and HCV. The reaction was not specific, but it was concluded that the cell membrane potential values were following a linear pattern, in both cases.

We examined the possibility to develop a biosensor for the detection of plant viruses, which would be more stable. For the construction of the sensor an automated system was developed and the biosensor itself was produced in the wells of an ELISA plate.

The method was applied for TRV, CMV and PVY. The samples were purified virus or infected plant tissues. Three different concentrations were used 1, 10 and 100ngml<sup>-1</sup>. The results were very encouraging and at the first stage it was made possible to detect a virus in single and in mixed infections and to define the lower detection limit, which was similar with ELISA method's respective limit (1ngml<sup>-1</sup>). It was shown also the possibility to quantify a virus in a sample.

In order to study the performance of BERA sensors, a comparative analysis took place and an amperometric sensor was developed, specialized in the detection of PVY. The amperometric sensor succeeded in differentiating positive from non-positive samples (non-homologous viruses or negative samples), but the detection limit was higher compared to the respective limit of BERA sensors. Consequently this sensor is not suitable for screening of plant tissue samples with low virus concentration, contrary to the BERA sensors developed in the present thesis.

**Keywords:** Cell biosensor, Bioelectric Recognition Assay, Hepatitis viruses, Vero cells, electroporation, TRV, CMV, PVY



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

BERA	Bioelectric Recognition Assay
BSA	Bovine Serum Albumin
CGMMV	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
FBS	Fetal Bovine Serum
PVP	Polyvinyl-pyrrolidone
HBV	Hepatitis B virus
HCV	Hepatitis C virus
PBS	Phosphate buffered saline
PVY	<i>Potato virus Y</i>
RNA	Ribonucleic acid
rt-PCR	real-time Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>



# **1. Βιοαισθητήρες**



## 1.1 Ορισμός κυτταρικών βιοαισθητήρων

Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες είναι εργαλεία ανάλυσης. Ένας βιοαισθητήρας είναι μια αναλυτική συσκευή που μετατρέπει μια βιολογική διαδικασία σε ένα (συνήθως) ηλεκτρικό ή οπτικό σήμα. Ο όρος «βιοαισθητήρας» περιλαμβάνει και συσκευές, που χρησιμοποιούνται προκειμένου να προσδιορίσουν τη συγκέντρωση χημικών ουσιών, αλλά και «στοιχεία» βιολογικού περιεχομένου, οι οποίες δεν χρησιμοποιούν απαραίτητα ή δεν περιλαμβάνουν κάποιο βιολογικό τμήμα.

Κύτταρα συνδέονται με ένα μετατροπέα σήματος και στη συνέχεια μέσω κάποιων μηχανισμών του ιδίου του κυττάρου, προκαλείται η παραγωγή ενός σήματος, συνήθως ηλεκτρικού, το οποίο μέσω του μετατροπέα μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα και με το κατάλληλο λογισμικό λαμβάνεται η μέτρηση.

Μια άλλη προσέγγιση θα ήταν να χαρακτηρίσουμε τους βιοαισθητήρες ως συσκευές, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μιας χημικής ένωσης και οι οποίες αποτελούνται ή συνδυάζουν ένα βιολογικό τμήμα με ένα φυσικοχημικό ανιχνευτή (Nagel et al., 1992).

Ο κυτταρικός βιοαισθητήρας περιλαμβάνει τρία βασικά τμήματα:

1. Το βιολογικό τμήμα όπως κύτταρα, οργανίδια κυττάρων, ένζυμα, αντισώματα κλπ
2. Τον μετατροπέα, ο οποίος όπως προαναφέρθηκε μετατρέπει το σήμα που παράγεται από την αντίδραση του βιολογικού τμήματος με το προς ανάλυση «συστατικό», σε ένα είδος σήματος που εύκολα μπορεί να αναγνωστεί, να μετρηθεί και κατά συνέπεια από αυτό να αντληθούν τα ανάλογα συμπεράσματα, συνήθως με τη βοήθεια κάποιου λογισμικού.
3. Το υπολογιστικό σύστημα με το εγκατεστημένο σε αυτό λογισμικό αποτελούν το τρίτο τμήμα του βιοαισθητήρα.



## 1.2 Τύποι κυτταρικών βιοαισθητήρων

Ουσιαστικά το τμήμα του βιοαισθητήρα που τον διαφοροποιεί σε κατηγορίες ή τύπους είναι το βιολογικό τμήμα, λαμβάνοντας υπόψη ότι διάφορα είδη κυττάρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν, όπως φυτικά ή ζωικά κύτταρα, ζύμες, βακτηριακά κύτταρα ακόμα και μύκητες ή καρποφορίες μυκήτων ή ακόμα και ολόκληροι ιστοί και όργανα (Macholan et al., 1984).

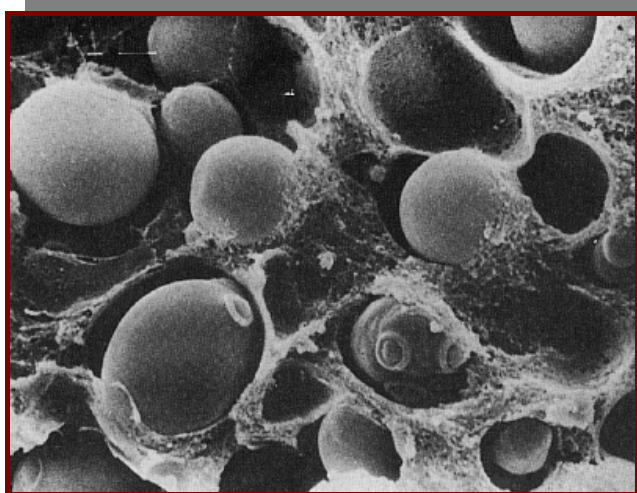
Σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει η δυνατότητα χρήσης διαφορετικών ειδών κυττάρων στον ίδιο αισθητήρα, όπου η αντίδραση του ενός είδους είναι συμπληρωματική ή ενισχυτική ως προς την αντίδραση του άλλου (Karube et al., 1981; Racek et al., 1990).

Γενικά τα είδη των κυτταρικών βιοαισθητήρων είναι δύο (2):

1. Οι μικροβιακοί βιοαισθητήρες, στους οποίους χρησιμοποιείται κυρίως ικανός αριθμός ζυμών ή βακτηρίων με κύριο χαρακτηριστικό την παραγωγή ενός ενζύμου. Απαραίτητο στοιχείο για την έναρξη παραγωγής του ενζύμου είναι η ύπαρξη και του κατάλληλου υποστρώματος. Τα μικροβιακά κύτταρα ακινητοποιούνται στην επιφάνεια ενός ευαίσθητου ηλεκτροδίου. Η ευαισθησία των εν λόγω κυττάρων αυξάνεται με την «βελτίωση» της περατότητας της μεμβράνης τους με διάφορα μέσα όπως το dimethylsulfoxide (DMSO).
2. Οι αισθητήρες κυτταρικών ιστών ή μεμονωμένων κυττάρων προερχόμενοι από ζώα ή φυτά. Θεωρητικά ακόμη και ένα κύτταρο μπορεί να παράγει ένα μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα.

Τα κύτταρα είτε μικροβιακά είτε κύτταρα προερχόμενα από φυτικούς ή ζωικούς ιστούς ακινητοποιούνται σε διάφορα υλικά, τα οποία δημιουργούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον (Φωτογραφία 1). Μερικά παραδείγματα τέτοιων υλικών είναι τα πήγματα Άγαρ (Matsunaga et al., 1978; Odata et al., 1993), πολυακρυλαμίδης (Wollenberger et al., 1980) και αλγινικού ασβεστίου (Kitagawa et al., 1987; Racek, J., 1991). Το

τελευταίο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως λόγω της «φιλικότητας» του κυτταρικού περιβάλλοντος που δημιουργεί και εντός του οποίου βρίσκονται εγκλωβισμένα τα κύτταρα του βιοαισθητήρα.



**Φωτογραφία 1.** Αποψη κυττάρων ζύμης εγκλωβισμένων σε μήτρα αλγινικού ασβεστίου με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Πηγή: Department of Chemical Engineering, University of Birmingham)

### 1.3 Βασικές Ιδιότητες των Κυτταρικών Βιοαισθητήρων

Η βασική ιδιότητα όλων των κυτταρικών βιοαισθητήρων είναι ότι χρησιμοποιούν ως υποδοχείς των σημάτων που καλούνται να ανιχνεύσουν ζωντανά κύτταρα, σε αντίθεση με άλλου τύπου βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν τμήματα κυττάρων ή βιολογικά μόρια όπως τα ένζυμα.

Η χρήση κυττάρων σε σύγκριση με τη χρήση τμημάτων αυτών ή βιολογικών μορίων προερχομένων από αυτά, έχει το πλεονέκτημα ότι η διεργασία αντίδρασης του βιοαισθητήρα με ένα προς ανάλυση μόριο λαμβάνει χώρα σε φυσικές βιολογικές συνθήκες, γεγονός το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη σταθερότητα του βιοαισθητήρα.

Οι βασικές παράμετροι λειτουργίας είναι κοινές μεταξύ των διαφόρων τύπων αισθητήρων και θα μπορούσαν να συνοψιστούν στις εξής (Racek, J., 1995):

- Η ευαισθησία του βιοαισθητήρα, η οποία ανάλογα με το είδος των χρησιμοποιούμενων κυττάρων, αλλά και του υπό εξέταση παράγοντα, είτε χημικού είτε βιολογικού, διαφέρει και κινείται σε ένα μεγάλο εύρος τιμών. Ειδικότερα ως προς την ευαισθησία των βιοαισθητήρων BERA (Bioelectric Recognition Assay) που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της εν λόγω διατριβής θα αναφερθούμε ειδικότερα στα επιμέρους κεφάλαια.
- Η αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων, εκφραζόμενη με την μορφή συντελεστή απόκλισης.
- Ο χρόνος ανταπόκρισης, σε σύγκριση πάντα με άλλες μεθόδους ανάλυσης. Στην παρουσίαση, που θα ακολουθήσει στα επόμενα κεφάλαια, του κυτταρικού αισθητήρα που αναπτύχθηκε, δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στο εν λόγω χαρακτηριστικό.

Όλα τα ανωτέρω χαρακτηριστικά προσδίδουν αξία στους βιοαισθητήρες ως μεθόδους ανάλυσης μόνο συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά άλλων αναλυτικών μεθόδων. Σε ορισμένες μάλιστα περιπτώσεις κρίνεται αναγκαίο να προηγηθεί η ανάλυση με την χρήση μεθόδου ρουτίνας, ώστε τα δεδομένα τα οποία θα προκύψουν να δώσουν την δυνατότητα σύγκρισης αλλά και επιβεβαίωσης των δυνατοτήτων του βιοαισθητήρα στον ερευνητή.

Κατά τη λειτουργία τους οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες μπορεί να παρουσιάσουν μια σειρά προβλημάτων τα οποία εντοπίζονται στα κάτωθι:

- Η διάρκεια ζωής των βιοαισθητήρων, η οποία καθορίζεται από τη διάρκεια ζωής των κυττάρων. Στις συνθήκες αποθήκευσης θα πρέπει να διασφαλίζεται ο συνεχής εφοδιασμός των κυττάρων με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία ώστε να επιτελούνται οι διεργασίες του μεταβολισμού τους.

- Η ακινητοποίηση των κυττάρων στην επιφάνεια του μετατροπέα του σήματος χωρίς να μειώνεται η ζωτικότητα τους και οι βιολογικές λειτουργίες τους.
- Η διατήρηση των κατάλληλων συνθηκών αποθήκευσης είναι μια ιδιαίτερα επίπονη διαδικασία, διότι τα εύρη θερμοκρασιών και pH ως προς την επιβίωση των κυττάρων είναι συγκεκριμένα.

Ο σχεδιασμός ενός βιοαισθητήρα δεν είναι απλή διαδικασία. Απαιτεί γνώσεις από πολλές επιστήμες, όπως η φυσική, η χημεία, πληροφορική, μικροηλεκτρονική κλπ. Την τελευταία δεκαετία η εξέλιξη τους είναι ραγδαία και αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικά εργαλεία στην ανίχνευση των βιολογικά ενεργών αναλυόμενων ουσιών, ιδιότητα που τους έχει καταστήσει σημαντικό εργαλείο αντιμετώπισης θεμάτων που σχετίζονται με την βιοτρομοκρατία (Kintzios et al., 2005).

Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες χαρακτηρίζονται από ευαισθησία, γρήγορη απόκριση, υψηλή επιλεκτικότητα και ευρύ πεδίο εφαρμογών. Το στοιχείο το οποίο καθορίζει την αποδοτικότητα του βιοαισθητήρα είναι τα ζωντανά κύτταρα του, τα οποία αποτελούν και το σημαντικότερο από τα τρία τμήματα, όπως προαναφέρθηκε.

Επίσης σημαντικό χαρακτηριστικό των κυτταρικών βιοαισθητήρων είναι το χαμηλό κόστος κατασκευής και λειτουργίας τους. Η χρήση ζωντανών κυττάρων αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα στην προσπάθεια του ερευνητή να αντλήσει πληροφορίες που σχετίζονται με τη λειτουργία των προς ανάλυση ουσιών.

Η παρουσία των εν λόγω ουσιών φαίνεται να προκαλεί την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των ανάλογων υποδοχέων και των καναλιών ιόντων στο κύτταρο, με αποτέλεσμα τη μεταφορά ιόντων από την μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη, δημιουργώντας μια διαφορά δυναμικού η οποία είναι μετρήσιμη από τις κατάλληλες μικροηλεκτρονικές συσκευές.

Σημαντικό στοιχείο στην απόδοση του βιοαισθητήρα και την λειτουργικότητα του διαδραματίζει η βιωσιμότητα των κυττάρων όταν

αυτά καλλιεργηθούν στη συσκευή του βιοαισθητήρα. Για παράδειγμα κύτταρα θα πρέπει να καλλιεργηθούν στην επιφάνεια ενός chip το οποίο είναι κατασκευασμένο από πυρίτιο ή άλλο μέταλλο.

Το πρόβλημα στις παραπάνω περιπτώσεις έγκειται στο γεγονός ότι το περιβάλλον στο οποίο καλούνται να επιβιώσουν τα κύτταρα δεν είναι το βέλτιστο, διότι τα υλικά αυτά δεν είναι κατάλληλα πάντα για τη διατήρηση μιας καλλιέργειας κυττάρων, συνεπώς δεν επιτυγχάνεται πάντα η μέγιστη δυνατή πρόσφυση τους στο υπόστρωμα. Δεν είναι εύκολο με άλλα λόγια η επιφάνεια πάνω στην οποία εδράζονται τα κύτταρα να προσομοιάσει με τις συνθήκες τις οποίες για παράδειγμα υπάρχουν σε μια κυτταρική καλλιέργεια σε τρυβλίο Petri.

Συνεπώς ένα από τα προβλήματα που καλείται ο ερευνητής να επιλύσει είναι να τροποποιήσει ανάλογα τα σχετικά πρωτόκολλα καλλιέργειας και να τα προσαρμόσει στις συνθήκες που επικρατούν κατά την αποθήκευση σε όχι απαραίτητα ιδανικές συνθήκες του βιοαισθητήρα, χωρίς αυτός να χάνει τη λειτουργικότητα του, όπως επίσης και να βελτιώσει τις ιδιότητες των μετατροπέων σήματος ώστε να καταστεί δυνατή η αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων στην επιφάνεια τους.

Τα κλασσικά υλικά πάνω στα οποία λαμβάνει χώρα η καλλιέργεια των κυττάρων είναι το γυαλί και το πυρίτιο. Γενικά όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τον εν λόγω σκοπό θα πρέπει να περάσουν τη δοκιμή βιοσυμβατότητας. Είναι ένα είδος δοκιμών που χρησιμοποιείται συχνά στην επιστήμη των υλικών, το οποίο όμως εμφανίζει υψηλά ποσοστά αβεβαιότητας λόγω των μέσων και μηχανισμών που χρησιμοποιεί. Υπάρχουν κάποιες βασικές ιδιότητες οι οποίες λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των υλικών όπως ότι, δεν θα πρέπει να εμφανίζουν τοξικότητα, δεν έχουν καρκινογόνους ενώσεις κλπ.

Τρία είδη παραγόντων επηρεάζουν την ανάπτυξη και διατήρηση των κυττάρων του βιοαισθητήρα σε μια επιφάνεια: (α) φυσικοί παράγοντες, (β) χημικοί παράγοντες και (γ) βιολογικοί παράγοντες (Wang, P. and Liu, Q., 2010).

Οι φυσικοί παράγοντες σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας και τη μικροδομή της και η οποία καθορίζει τον

προσανατολισμό και την διεύθυνση που θα ακολουθήσουν τα κύτταρα. Κατά κάποιο τρόπο τα κύτταρα εκείνα που έρχονται σε άμεση επαφή με το υλικό ανάπτυξης στην προσπάθειά τους να αποκτήσουν την μέγιστη δυνατή πρόσφυση δέχονται ένα είδος μηχανικού stress, το οποίο σχετίζεται με την αδυναμία τους να αναπτυχθούν σε λείες επιφάνειες.

Η μεμβράνη του κυττάρου από μόνη της δεν είναι λεία, διότι περιλαμβάνει διάφορα μόρια όπως οι υποδοχείς, διαμεμβρανικές πρωτεΐνες κλπ. Συνεπώς θα πρέπει να υπάρχει μια σχετική «συνάφεια» μεταξύ επιφάνειας ανάπτυξης του κυττάρου και της μεμβράνης, η οποία είναι καθοριστική στον σχεδιασμό του βιοαισθητήρα.

Αναφορικά με τους χημικούς παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επηρεάζουν την «συμβατότητα» των κυττάρων με την επιφάνεια ανάπτυξης τους, που μπορεί να είναι όπως προαναφέραμε ένα chip ή μια γυάλινη επιφάνεια πάνω στην οποία έχει κατασκευαστεί ένα ηλεκτρονικό κύκλωμα, ο σημαντικότερος ίσως θα μπορούσε να είναι το πόσο υδρόφιλο είναι το υλικό, χαρακτηριστικό το οποίο σχετίζεται με την πρόσφυση των κυττάρων στο εν λόγω υλικό.

Η βελτίωση των υλικών ως προς το ανωτέρω χαρακτηριστικό επιτυγχάνεται με τη χρήση διαφόρων χημικών ουσιών όπως η Diethylenetriamine (DETA). Με την εφαρμογή του υλικού πάνω στην επιφάνεια που μας ενδιαφέρει να «βελτιώσουμε» δημιουργείται ένα στρώμα κατάλληλο για την ανάπτυξη των κυττάρων (Stenger et al., 1993).

Επίσης σημαντικό στοιχείο είναι το ηλεκτρικό φορτίο των κυττάρων, διότι όπως προαναφέραμε και αναλύουμε στη συνέχεια η μεμβράνη των κυττάρων διαθέτει φορτίο η πυκνότητα του οποίου είναι παρόμοια με εκείνη του γυαλιού ή άλλων υλικών που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή των ηλεκτρονικών κυκλωμάτων.

Οι εφαρμογές τους σήμερα είναι διευρυμένες όπως προαναφέρθηκε, όμως ακόμα σε θεωρητικό επίπεδο είναι πολλά τα στοιχεία τα οποία δεν γνωρίζουμε διότι το κύτταρο είναι ένα αρκετά πολύπλοκο σύστημα με μεγάλο αριθμό βιολογικών μορίων και μεταβολικών μονοπατιών και δεν είναι εύκολο πάντα να απομονώσουμε εκείνα τα μόρια που μας

ενδιαφέρουν για την εκάστοτε μέτρηση που επιθυμούμε να επιτελέσει ο βιοαισθητήρας.

Στην παρούσα διατριβή ακριβώς την ανωτέρω αδυναμία επιλύσαμε χρησιμοποιώντας το κύτταρο ως φορέα μορίων με εξειδίκευση, τα οποία εισήχθησαν στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, ελαχιστοποιώντας κατ' αυτό τον τρόπο την συμμετοχή άλλων βιολογικών παραγόντων στην αντίδραση με την προς ανάλυση ουσία ή μικροβιολογικό παράγοντα.

# **2. Περιγραφή της Βιοηλεκτρικής Μεθόδου Αναγνώρισης (BERA)**





## 2.1 Βιοαισθητήρες 1<sup>ης</sup> γενιάς

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου BERA περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1999 και οι πρώτες εφαρμογές της δημοσιεύτηκαν το 2001. Αυτές αφορούσαν την ανίχνευση φυτικών και ηπατικών ιών αλλά και χημικών ενώσεων (glyphosate), οι οποίες χρησιμοποιούνται στη γεωργία (Kintzios et. al., 2001a; 2001b).

Η λειτουργία της μεθόδου βασίζεται στην ανταπόκριση του κυττάρου όταν αυτό έρθει σε επαφή με διάφορες χημικές ενώσεις ή μόρια (ιοί), η οποία εκφράζεται με μεταβολή του ηλεκτρικού δυναμικού της μεμβράνης.

Η διαμόρφωση του βιοαισθητήρα κατά την ανίχνευση ηπατικών ιών περιελάμβανε ένα βιολογικό τμήμα το οποίο αποτελούνταν από μια σειρά ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων καθώς και ηπατικών κυττάρων, τα οποία εμφανίζουν συγκεκριμένη αντίδραση στην παρουσία ηπατικών ιών και συγκεκριμένα του ιού C της ηπατίτιδας (Hepatitis virus C, HCV). Η ακινητοποίηση των κυττάρων έλαβε χώρα σε αгарόζη χαμηλού σημείου τήξης.

Αντίστοιχα για την ανίχνευση φυτικών ιών χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα καπνού των οποίων η αντίδραση, σύμφωνα με την περιγραφή των αποτελεσμάτων της μεθόδου ήταν διαφοροποιημένη ανάλογα με το είδος του ιού. Όπως θα δούμε και στα επόμενα κεφάλαια που σχετίζονται με το ερευνητικό τμήμα της παρούσης διατριβής, τα εν λόγω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με μια σειρά εργασιών.

Αναφορικά με την ανταπόκριση του βιοαισθητήρα σε συγκεκριμένες χημικές ενώσεις, η αντίδραση του βιοαισθητήρα BERA ήταν διαφοροποιημένη.

Οι διαμορφώσεις του βιοαισθητήρα κατά την πρώτη παρουσίαση του ήταν δύο:

### Διαμόρφωση A

Το ηλεκτρόδιο μέτρησης τοποθετήθηκε στην περιοχική εφαρμογής του δείγματος και το ηλεκτρόδιο αναφοράς στην αντίθετη πλευρά της μήτρας ακινητοποίησης (Σχήμα 1A). Στο εν λόγω μοντέλο κατά την εφαρμογή

του δείγματος και στη συνέχεια αντίδραση του με τα ακινητοποιημένα κύτταρα του αισθητήρα, προκαλείται αλλαγή του δυναμικού στην περιοχή όπου βρίσκεται το ηλεκτρόδιο μέτρησης.

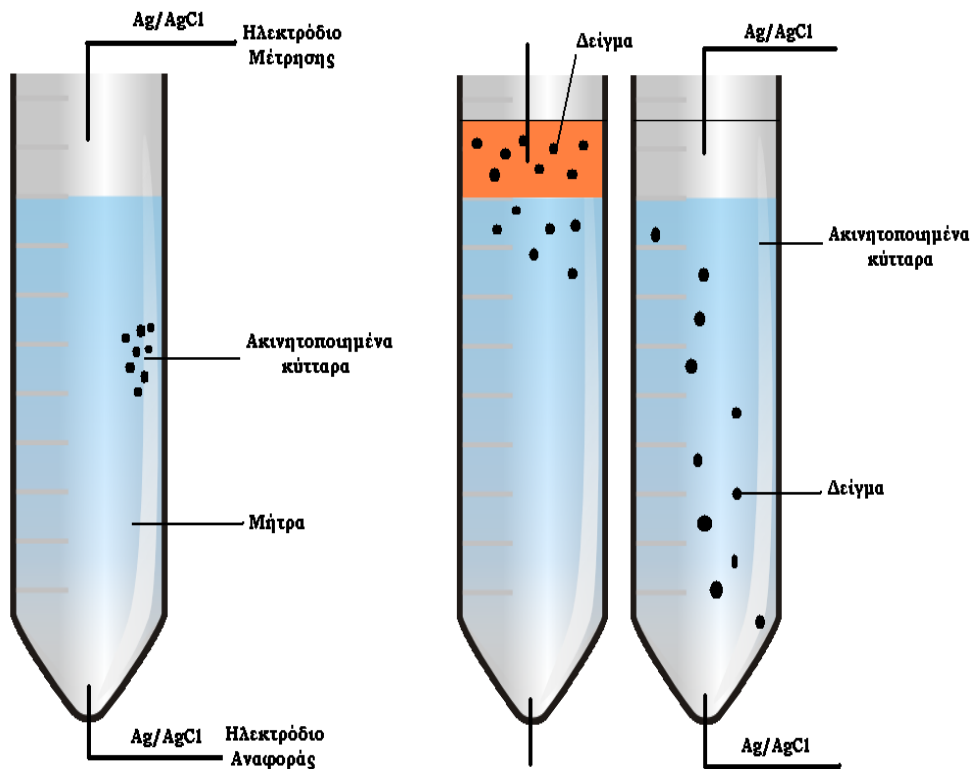
Αντίστοιχα στην περιοχή όπου βρίσκεται το ηλεκτρόδιο αναφοράς το δυναμικό διατηρεί την αρχική του τιμή (λόγω μη επαφής του δείγματος με τα κύτταρα). Κατά αυτό τον τρόπο δημιουργείται μια διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων.

Επειδή το δείγμα θα συνεχίσει να κινείται μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων και να αντιδρά με τα κύτταρα του αισθητήρα, σταδιακά θα προκληθεί μείωση της διαφοράς δυναμικού, έως ότου θεωρητικά μηδενιστεί. Στην πράξη θα σταθεροποιηθεί σε μια συγκεκριμένη τιμή.

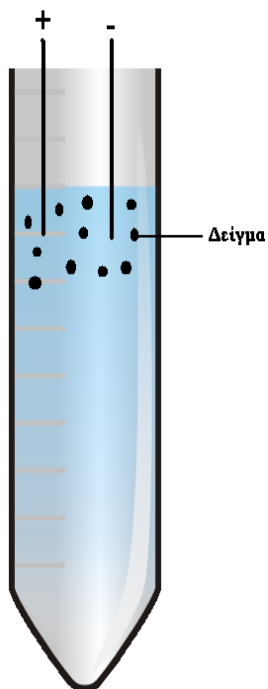
### **Διαμόρφωση Β**

Κατά τη 2<sup>η</sup> διαμόρφωση και τα δύο ηλεκτρόδια βυθίζονται στη μήτρα, όποτε ο βιοαισθητήρας συμπεριφέρεται σαν ένα γαλβανικό ζεύγος (Σχήμα 1B). Κατά την εφαρμογή του δείγματος διασκορπίζεται αυτό μέσα στη μήτρα, η οποία δεν είναι απόλυτα αγωγίμη έτσι ώστε να αποφευχθεί βραχυκύκλωση του συστήματος. Κατά την εν λόγω διαμόρφωση υπάρχει δυνατότητα συσχετισμού της προκαλούμενης διαφοράς δυναμικού και της συγκέντρωσης του δείγματος. Συνεπώς πέραν της ποιοτικής ανάλυσης υπάρχει η δυνατότητα και του ποσοτικού προσδιορισμού του δείγματος.

Ο ανωτέρω τύπος βιοαισθητήρων αφορά βιοαισθητήρες BERA πρώτης γενιάς. Από την πρώτη παρουσίαση το 2001 νέοι πιο βελτιωμένοι αισθητήρες χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες εφαρμογές. Όπως θα διαφανεί έχουν επέλθει σημαντικές βελτιώσεις σε τομείς όπως η επιλογή των υλικών, προετοιμασία των κυττάρων του βιοαισθητήρα, μέγεθος, κόστος κατασκευής, αλλά και σε σχέση με την ανάλυση των αποτελεσμάτων.



**Σχήμα 1Α.** Απεικόνιση της διαμόρφωσης “Α” των βιοαισθητήρων BERA πρώτης γενιάς. Διακρίνονται τα δύο ηλεκτρόδια μέτρησης και αναφοράς, καθώς και το πήγμα με τα κύτταρα του βιοαισθητήρα (a). Η εφαρμογή του δείγματος λαμβάνει χώρα στο ανώτερο τμήμα του πήγματος (b). Κίνηση του δείγματος δια μέσω του πήγματος στο οποίο βρίσκονται ακίνητοποιημένα τα κύτταρα του βιοαισθητήρα (C).



**Σχήμα 1Β.** Απεικόνιση της διαμόρφωσης “Β” των βιοαισθητήρων BERA πρώτης γενιάς. Τα ηλεκτρόδια μέτρησης και αναφοράς στην εν λόγω διαμόρφωση βρίσκονται βυθισμένα και τα δύο στο δείγμα

## 2.2 Βιοαισθητήρες BERA νεότερων γενιών

Κατά την πρώτη εκτεταμένη έρευνα αναφορικά με την μελέτη αντίδρασης του βιοαισθητήρα με ιούς, οι οποίοι προσβάλουν φυτικούς οργανισμούς, περαιτέρω βελτιώσεις ακολούθησαν ως προς τα χρησιμοποιούμενα υλικά και ειδικότερα σε κατασκευαστικό επίπεδο όπως το μέγεθος του αισθητήρα, το οποίο μειώθηκε αισθητά, καθώς και ο χρησιμοποιούμενος αριθμός κυττάρων, δίνοντας τη δυνατότητα αύξησης του αριθμού μετρήσεων ανά μονάδα χρόνου, με μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Επίσης μέσω των χρησιμοποιούμενων μετατροπών σήματος βελτιώθηκε η ανάκτηση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων (Kintzios et al., 2004).

Ως μέσο ακινητοποίησης των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε Bacto-Agar, ενώ το μέγεθος της μήτρας του βιοαισθητήρα μειώθηκε αισθητά στα 50μl. Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιήθηκαν και μη τροποποιημένα κύτταρα και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες Vero.

Επίσης κατέστη εφικτή η ανίχνευση της παρουσίας του προς εξέταση ιού όχι μόνο στην πλήρη μορφή του, αλλά και τμημάτων του ιού. Επιπρόσθετα έγινε κατανοητό ότι μπορούμε ακόμα και να προσδιορίσουμε ποσοτικά τη βιολογική δραστηριότητα ιών και όχι απλά επιβεβαίωση της παρουσίας τους.

Οι μελέτες μετά την πρώτη παρουσίαση της μεθόδου απέδειξαν ότι όντως η ανίχνευση ιών με τη μέθοδο BERA είναι αποτέλεσμα των μεταβολών του δυναμικού της μεμβράνης των ακινητοποιημένων κυττάρων του βιοαισθητήρα. Επίσης σημαντικό συμπέρασμα, το οποίο έκρινε και την μελλοντική μορφή των βιοαισθητήρων BERA, ήταν ότι η καλύτερη ανταπόκριση των βιοαισθητήρων υπό μορφή ακινητοποιημένων κυττάρων σε σχέση με εκείνους που είχαν τη μορφή καλλιέργειας σε εναιώρημα.

Επίσης έγινε κατανοητό ότι σε καμιά περίπτωση δεν απαιτείται διείσδυση του ιού στο κύτταρο, ώστε να προκληθεί αντίδραση του βιοαισθητήρα. Απόδειξη του εν λόγω συμπεράσματος αποτέλεσε το γεγονός ότι η αντίδραση των κυττάρων Vero ήταν διαφορετική σε δύο ιούς, οι οποίοι προσβάλουν τα συγκεκριμένα κύτταρα.

Η σύνδεση ομόλογων αντισωμάτων στον ένα υπό εξέταση ιό είχε σαν αποτέλεσμα τη μη αντίδραση του βιοαισθητήρα. Συνεπώς όπως θα αναφερθεί στα επόμενα κεφάλαια σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η σύνδεση του ιού στο κύτταρο (attachment) και όχι η μόλυνση του κυττάρου.

Επίσης, η εφαρμογή της ίδιας διαδικασίας σε άλλους ιούς οδήγησε στο συμπέρασμα ότι δεν είναι υπεύθυνοι για την αντίδραση των κυττάρων του βιοαισθητήρα BERA μόνο οι αντιγονικοί καθοριστές (antibody-binding epitopes), αλλά και άλλα στοιχεία του κυττάρου.

Στη συγκεκριμένη γενιά βιοαισθητήρων περιοριστικό παράγοντα αποτέλεσε το γεγονός ότι στην περίπτωση έλλειψης των κατάλληλων υποδοχέων η αντίδραση του ήταν μειωμένη έως μηδαμινή. Το μειονέκτημα αυτό των κυτταρικών βιοαισθητήρων έχει τονιστεί ιδιαίτερα σε προηγούμενες μελέτες (Whelan et al., 2003).

Στις επόμενες γενιές αισθητήρων BERA το συγκεκριμένο πρόβλημα ξεπεράστηκε με τη ενσωμάτωση στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των ανάλογων αντισωμάτων, προσδίδοντας κατά αυτό τον τρόπο μεγαλύτερη εξειδίκευση στους χρησιμοποιούμενους βιοαισθητήρες.

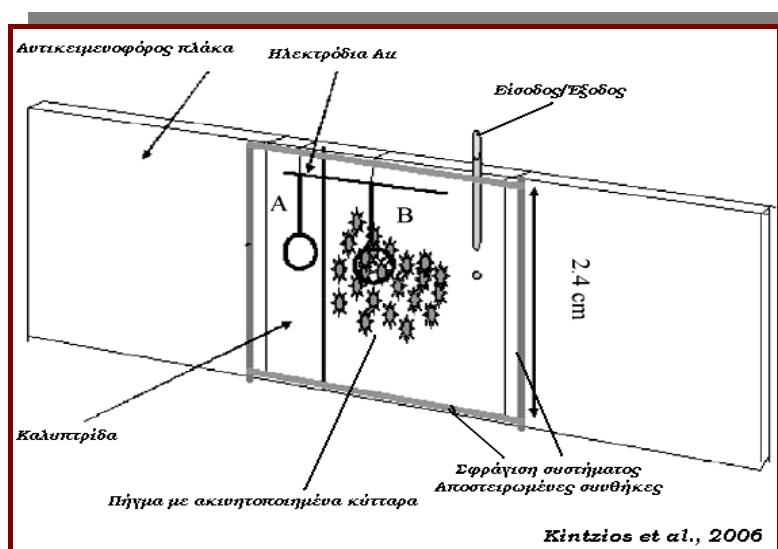
Πέραν των εφαρμογών της μεθόδου BERA στην ανίχνευση ιών, η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και ως προς την αξιολόγηση της διαίρεσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Kintzios et al., 2006). Στην εν λόγω μελέτη αναπτύχθηκε ένας κυτταρικός βιοαισθητήρας, ο οποίος συνδύαζε την ηλεκτροφυσική ανταπόκριση των ακινητοποιημένων κυττάρων με τεχνολογία ανίχνευσης υπεροξειδίου και τεχνικές μικροσκοπίας.

Σε αυτό τον τύπο βιοαισθητήρων χρησιμοποιήθηκε για την ακινητοποίηση των κυττάρων Vero αλγινικό ασβέστιο. Παρασκευάστηκε δηλαδή μία μήτρα πήγματος αλγινικού ασβεστίου η οποία περιείχε ικανό αριθμό κυττάρων και στη συνέχεια τοποθετήθηκε κατάλληλα σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα, η οποία χρησιμοποιείται για τις παρατηρήσεις στην μικροσκοπία. Η αντικειμενοφόρος πλάκα έφερε στην

επιφάνεια της ηλεκτρονικό κύκλωμα κατασκευασμένο από χρυσό. Λεπτομέρειες ως προς την κατασκευή της φαίνονται στο Σχήμα 2.

Η μελέτη περιλάμβανε την αξιολόγηση της ηλεκτροχημικής δραστηριότητας των κυττάρων σε συνδυασμό με παρατήρηση της διαδικασίας διαίρεσης των κυττάρων με τη βοήθεια του μικροσκοπίου.

Προσδιορίστηκε η μέγιστη τιμή του δυναμικού της μεμβράνης καθώς και η παραγωγή υπεροξειδίου, όπως και άλλων παραμέτρων που αφορούν κυτταρικές δραστηριότητες, με βιοαισθητήρες BERA. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν σε συνδυασμό με τη διαδικασία της διαίρεσης των κυττάρων και άλλων παραμέτρων της κυτταρικής δραστηριότητας με τη χρήση τεχνικών μικροσκοπίας φθορισμού.



**Σχήμα 2.** Βιοαισθητήρας BERA υπό μορφή αντικειμενοφόρου πλάκας, στην επιφάνεια της οποίας φέρεται ηλεκτρονικό κύκλωμα κατασκευασμένο από χρυσό, το οποίο είναι συνδεδεμένο με μήτρα πήγματος αλγινικού ασβεστίου που εμπεριέχει αριθμό κυττάρων (Kintzios et al., 2006)

Τα βασικά χαρακτηριστικά του αισθητήρα της εν λόγω γενιάς ήταν κυρίως η δυνατότητα συνεχούς μέτρησης σε πραγματικό χρόνο, μεγαλύτερη ακρίβεια, αλλά παράλληλα και λιγότερο χρονοβόρα σε σχέση με τις μεθόδους φθορισμού.

Παράλληλα οι πληροφορίες και τα δεδομένα που αντλούνται κατά τα πρώιμα στάδια του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, δίνουν τη

δυνατότητα πρόβλεψης του ρυθμού πολλαπλασιασμού ή θανάτου των κυττάρων, μέσω των μετρήσεων οι οποίες λαμβάνονται από τον βιοαισθητήρα.

Επίσης λόγω της κατανομής των κυττάρων στον συγκεκριμένο τύπο (γενιά) βιοαισθητήρα, είναι δυνατή η εξέταση των επιπτώσεων ενός ετερογενούς περιβάλλοντος, στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα, αναφορικά με ένα μεμονωμένο κύτταρο ή με μια ομάδα κυττάρων.

Τα κύτταρα στον συγκεκριμένο τύπο βιοαισθητήρα δεν είχαν αναπτυχθεί στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, συνεπώς η πρόσφυση με τα ηλεκτρόδια δεν ήταν υψηλή. *In vivo* η πρόσφυση των κυττάρων και η συνοχή μιας καλλιέργειας εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των κυττάρων και των κυττάρων με την εξωκυτταρική επιφάνεια. Υπάρχει η δυνατότητα παρεμβολής ενός μέσου μεταξύ του ηλεκτροδίου ή ενός chip και της καλλιέργειας, το οποίο θα δίνει τη δυνατότητα μεταφοράς ενός ηλεκτρικού παλμού από την κυτταρική μεμβράνη στην επιφάνεια του chip ή του ηλεκτροδίου.

Το πρόβλημα της καλλιέργειας κυττάρων σε chip έγκειται στο γεγονός ότι τα υλικά από τα οποία κατασκευάζονται αυτού του είδους οι συσκευές δεν είναι κατάλληλα από πλευράς τραχύτητας της επιφάνειάς τους, δεν είναι υδρόφιλα και δεν έχουν το κατάλληλο ιζώδες.





**3. Δομικά  
τμήματα του  
βιοαισθητήρα  
BERA**



### 3.1 Τα κύτταρα Vero

Τα κύτταρα Vero είναι γενιές κυττάρων τα οποία απομονώθηκαν από επιθηλιακά κύτταρα νεφρών του είδους *Cercopithecus aethiops* (αφρικανικός πράσινος πίθηκος). Η εν λόγω γενιά αναπτύχθηκε στην Ιαπωνία (Yasumura et al., 1963). Η αρχική γραμμή κυττάρων ονομάστηκε «Vero» μετά από μια σύντμηση των λέξεων «Verda Reno», οι οποίες σημαίνουν το «πράσινο νεφρό» στην εσπεράντο, ενώ αντίστοιχα ο όρος «vero» σημαίνει «την αλήθεια», επίσης στην γλώσσα εσπεράντο.

Τα κύτταρα Vero έχουν χρησιμοποιηθεί και χρησιμοποιούνται για πολλές εφαρμογές όπως ανίχνευση τοξινών όπως αυτή της διφθερίτιδας, του ιού της λύσσας, καθώς και διαφόρων παρασίτων.

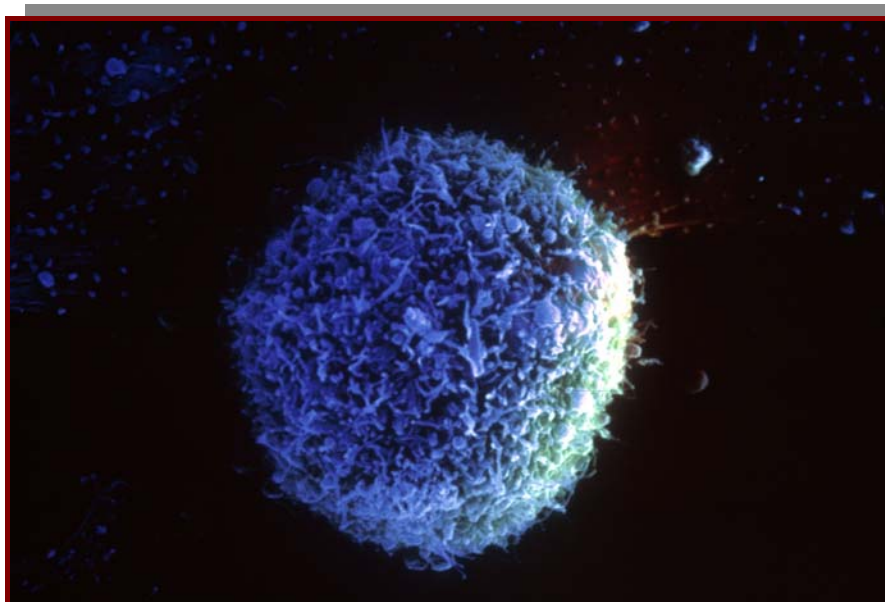
Η γενιά των κυττάρων Vero είναι συνεχής και ανευπλοειδής. Μια συνεχής γενιά κυττάρων μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέσω πολλών κύκλων διαίρεσης και να μην φτάσει στο στάδιο της γήρανσης. Στην Φωτογραφία 2 απεικονίζεται ένα κύτταρο Vero<sup>1</sup>.

Η ανίχνευση τοξινών και συγκριμένα της διφθερίτιδας, που προαναφέρθηκε παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι η επαφή της τοξίνης με κύτταρα Vero προκαλεί αύξηση της αγωγιμότητας της μεμβράνης, μεταβάλλοντας την κατανομή των ιόντων Cl<sup>-</sup> κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ παράλληλα η συγκέντρωση των ιόντων Ca<sup>2+</sup> του κυτοπλάσματος αυξάνεται ελάχιστα. Η μεταβολή της αγωγιμότητας οφείλεται στα μονοσθενή κατιόντα (Eriksen et al., 1994).

Επειδή αποτελούν το πιο συνηθισμένο είδος κυττάρων που χρησιμοποιείται στην έρευνα, ιδιαίτερα δε στις μελέτες της ιολογίας αλλά και σε άλλους τομείς της βιολογίας όπως στη μελέτη των επιπτώσεων της παρουσίας διαφόρων χημικών παραγόντων στα ζωικά κύτταρα ή του πολλαπλασιασμού διαφόρων μικροοργανισμών ενδοκυτταρικά, αλλά και για την παραγωγή ιών, αποτελούν το μοναδικό είδος κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

---

<sup>1</sup> Παραχωρήθηκε κατόπιν αδείας χρήσης, για τη συγγραφή και μόνο της παρούσας διατριβής, από τον Οργανισμό Επιστημονικής Έρευνας της Αυστραλίας CSIRO / Australian Animal Health Laboratory. <http://www.scienceimage.csiro.au/>



**Φωτογραφία 2.** Απεικόνιση κυττάρου Vero από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Μεγέθυνση x4500). Πηγή: Australian Animal Health Laboratory

Σε εργαστηριακό επίπεδο γενικά χρησιμοποιούνται διάφορες σειρές όπως: Vero, Vero 76, Vero E6, αλλά σε κάθε περίπτωση η πηγή των κυττάρων δεν αλλάζει, συνεπώς τα πρωτόκολλα που αναλύονται πιο κάτω δεν διαφοροποιούνται.

### **3.2 Το αλγινικό ασβέστιο στους αισθητήρες BERA**

Το αλγινικό ασβέστιο είναι ένα από τα υλικά που χρησιμοποιείται στην κατασκευή τους, λόγω του «φιλικού» προς τα κύτταρα περιβάλλοντος που δημιουργείται κατά τον εγκλεισμό τους σε αυτό.

Το αλγινικό ασβέστιο είναι διαλυτό σε νερό και έχει ζελατινώδη υφή. Παρασκευάζεται με την μίξη διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου σε διάλυμα αλγινικού νατρίου.

Στους αισθητήρες BERA το αλγινικό ασβέστιο χρησιμοποιείται σε όλους τους βιοαισθητήρες τελευταίας γενιάς, αφού πρώτα έχει αξιολογηθεί η επίδραση του στη φυσιολογία των κυττάρων του βιοαισθητήρα. Οι επιπτώσεις του πηγματος αλγινικού ασβεστίου δεν

ήταν αρνητικές, όταν μελετήθηκε η επίδραση του σε δύο διαφορετικούς τύπους κυττάρων, κύτταρα Vero και νευροβλάστη N2a, οι οποίοι είχαν εγκλειστεί σε αυτό και το οποίο όπως προαναφέρθηκε αποτελεί τη μήτρα του βιοαισθητήρα (Kintzios et al., 2007).

Μελετώντας παραμέτρους όπως την συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου στο κυτόπλασμα, τον ρυθμό σύνθεσης RNA κλπ., κατέστη σαφές ότι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων Vero επηρεάζεται από το σχήμα του πηγματος, σε αντίθεση με τα N2a που η διαμόρφωση του πηγματος δεν έχει καμία επίδραση. Τα ανωτέρω αποτελέσματα φαίνεται να σχετίζονται με τον ρυθμό μεταφοράς οξυγόνου και θρεπτικών στοιχείων προς τα κύτταρα (Racek, J., 1991).

Τα συμπεράσματα της εν λόγω έρευνας ήταν καθοριστικά για την επιλογή της διαμόρφωσης του βιοαισθητήρα για τις μετέπειτα εργασίες. Η εκτίμηση των διαφορών των δύο διαμορφώσεων, δηλαδή σφαιρικό σχήμα αισθητήρα ή σχήματος λεπτού στρώματος, έλαβε χώρα με βάση

τον τύπο:  $Bi_m = \frac{kL}{D_0}$ , ο οποίος αναφέρεται στον υπολογισμό του αριθμού Biot (Hoppe, G.K. and Hansford, G.S., 1984).

Στον ανωτέρω τύπο ο παράγοντας  $k$  είναι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας ( $\text{ms}^{-1}$ ),  $L$  το πάχος της μεμβράνης (mm), το οποίο υπολογίζεται διαιρώντας τον όγκο του σώματος με την επιφάνεια του σώματος και  $D_0$  είναι η ικανότητα διάχυσης της μάζας ενός υποστρώματος σε ένα πηγμα ελεύθερο από κύτταρα ( $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ) (Racek, J., 1991).

Επιπλέον, για την αξιολόγηση των δύο διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε και η διαφοροποίηση τους ως προς τον ρυθμό οξείδωσης της ξανθίνης σε θρεπτικό μέσο, με ακινητοποίηση της οξειδάσης της ξανθίνης (XOD) στην επιφάνεια της μήτρας του βιοαισθητήρα αλλά και στο εσωτερικό της. Από την οξείδωση της ξανθίνης παράγεται  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.3 Χρήση «τροποποιημένων» κυττάρων στους αισθητήρες BERA

Η χρήση τροποποιημένων σε επίπεδο μεμβράνης κυττάρων, έλαβε χώρα για πρώτη φορά σε βιοαισθητήρες BERA για την ανίχνευση υπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ). Στην μεμβράνη ινοβλαστών Vero με τη βοήθεια της μεθόδου της ηλεκτροπόρωσης, εισήχθησαν μόρια δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), τα οποία δρουν ως καταλύτες στην αντίδραση μετατροπής του  $O_2^{\bullet-}$  σε  $H_2O_2$ .

Η ανωτέρω αντίδραση προκαλεί μεταβολές στο δυναμικό της μεμβράνης, οι οποίες μπορούν να καταγραφούν με τη χρήση της μεθόδου BERA (Moschoroulou et al., 2005; 2006). Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση του δυναμικού των μεμβρανών των τροποποιημένων κυττάρων κατά την παρουσία  $O_2^{\bullet-}$ .

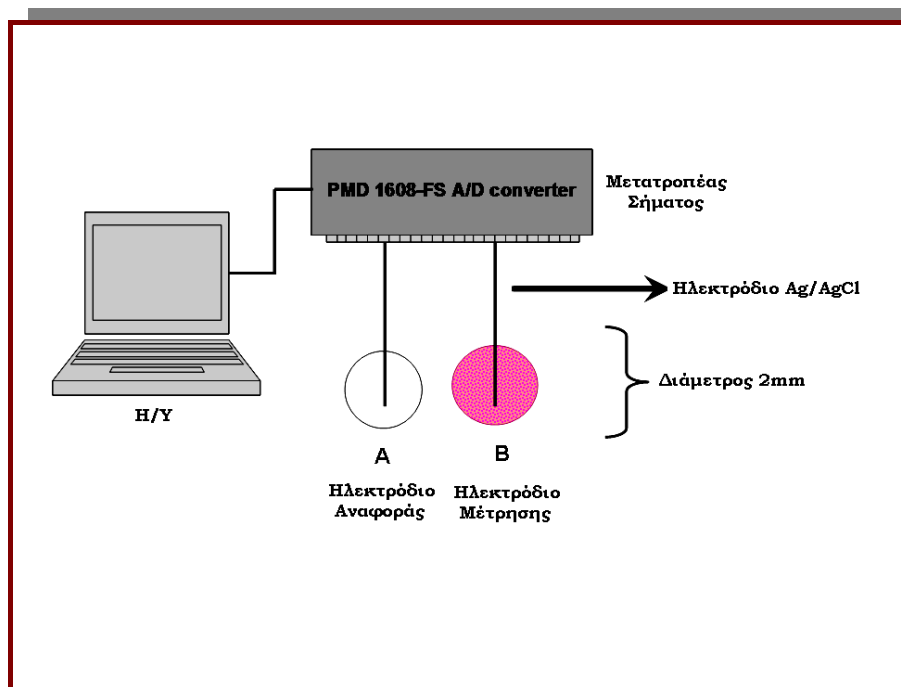
Η ανάπτυξη του εν λόγω βιοαισθητήρα αποτέλεσε την πρώτη εφαρμογή βιοαισθητήρων, όπου το κύτταρο χρησιμοποιήθηκε ως στοιχείο ανίχνευσης υπεροξειδίου. Επιπλέον το επίπεδο ανίχνευσης ήταν ιδιαίτερα χαμηλό (100pM) σε σχέση με τις υπάρχουσες μεθόδους ανίχνευσης (Matsunaga et al., 1978; Wollenberger et al., 1980).

Η τροποποίηση των μεμβρανών των κυττάρων έλαβε χώρα με ηλεκτρορροισαγωγή SOD στις μεμβράνες κυττάρων Vero, εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο 1800V για περιορισμένο χρονικό διάστημα. Τα τροποποιημένα κύτταρα στη συνέχεια ακινητοποιούνται σε πήγμα αλγινικού ασβεστίου, σχηματίζοντας μικρά σφαιρίδια διαμέτρου 2mm. Τα σφαιρίδια (αισθητήρες) συνδέονται με ηλεκτρόδια Ag/AgCl σύμφωνα με την διάταξη του Σχήματος 3.

Η διάταξη αποτελείται από τους αισθητήρες (πήγμα αλγινικού ασβεστίου με τροποποιημένα κύτταρα), τα συνδεδεμένα με αυτούς ηλεκτρόδια μέτρησης και αναφοράς, τον μετατροπέα σήματος, ο οποίος μετατρέπει το ηλεκτρικό σήμα που παράγεται από τα κύτταρα σε ψηφιακό σήμα και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος περιέχει το κατάλληλο λογισμικό για την επεξεργασία του ψηφιακού σήματος.

Οι συνδεδεμένοι αισθητήρες με τα ηλεκτρόδια αναφοράς και μέτρησης βυθίζονται και οι δύο στο δείγμα χωρίς να έρχονται σε επαφή με αυτό τα

ηλεκτρόδια. Η ανταπόκριση του βιοαισθητήρα αντιστοιχεί στην μεταβολή του δυναμικού του μετά την εφαρμογή του δείγματος και μέχρι την στιγμή σταθεροποίησης της ανταπόκρισης του.



**Σχήμα 3.** Σχηματική διάταξη συστήματος βιοαισθητήρα BERA, στην οποία απεικονίζεται η σειρά συνδεσμολογίας των επιμέρους στοιχείων του βιοαισθητήρα

Σε άλλες εφαρμογές όπως για παράδειγμα στην ανίχνευση ιών και τις οποίες θα αναφέρουμε στα επόμενα κεφάλαια, ως ανταπόκριση λαμβάνεται η μέγιστη μεταβολή του δυναμικού του βιοαισθητήρα. Η προαναφερθείσα διάταξη χρησιμοποιείται σε όλες τις εφαρμογές με τελευταίας γενιάς βιοαισθητήρες BERA, καθώς και η διαδικασία κατασκευής των αισθητήρων BERA.





# **4. Ηλεκτρικές ιδιότητες των κυττάρων**



## 4.1 Δυναμικό της Μembrάνης

Όλα τα κύτταρα διαθέτουν κυτταρική μεμβράνη. Για λόγους απλούστευσης θα θεωρήσουμε το κύτταρο σαν ένα μικρό κουτί το οποίο περιέχει ή καλύτερα αποτελείται από μια σειρά ηλεκτρικών κυκλωμάτων, τη δομή των οποίων θα μελετήσουμε στη συνέχεια. Συγκεκριμένα θεωρούμε τα κύτταρα ως απλές μορφές RC κυκλωμάτων.

Το κύτταρο έχει μια αντίσταση  $R$ , μια χωρητικότητα φορτίου, όπως ένας πυκνωτής  $C$ , ενώ το ρόλο του διακόπτη στο κύκλωμα παίζουν τα κανάλια ιόντων, τα οποία συνοπτικά αναφέρονται στα επόμενα κεφάλαια. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων που εκπονήθηκαν για τους σκοπούς της παρούσης διατριβής, διαπιστώθηκε σε πολλές περιπτώσεις ότι όντως η αντίδραση των βιοαισθητήρων μας οδηγούν προς την θεωρία ότι το κύτταρο θα μπορούσε να θεωρηθεί στην απλούστερη του μορφή ως ένα κύκλωμα RC.

Το δυναμικό στο εσωτερικό των κυττάρων ποικίλει από  $-10\text{mV}$  έως  $-100\text{mV}$  (De Felice, L.J., 1997). Μελετώντας τις ηλεκτρικές ιδιότητες της μεμβράνης των κυττάρων, θεωρούμε το κύτταρο ως ένα σύστημα τριών στοιχείων. Το κυτταρόπλασμα, την κυτταρική μεμβράνη και το εξωτερικό διάλυμα.

Η συγκέντρωση ιόντων  $K^+$  είναι υψηλότερη στο εσωτερικό του κυττάρου, ενώ κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης είναι διαβαθμισμένη, με αποτέλεσμα την τυχαία και συχνή επαφή των ιόντων με την μεμβράνη. Ένα δυναμικό διάχυσης που αναπτύσσεται ωθεί τα ιόντα στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου.

Η περίσσεια των θετικών ιόντων  $K^+$  δημιουργεί ένα δυναμικό κατά μήκος της μεμβράνης και ωθεί τα θετικά ιόντα στο εσωτερικό του κυττάρου, δημιουργώντας μια ροή αντίθετη προς τη ροή που προέρχεται από τη δύναμη διάχυσης.

Όταν οι δύο δυνάμεις που προέρχονται από τη διάχυση και το ηλεκτρικό δυναμικό κατά μήκος της μεμβράνης εξισωθούν, τότε επέρχεται ισορροπία. Σε αυτή τη περίπτωση το δυναμικό της μεμβράνης

τείνει προς το δυναμικό ισορροπίας για ένα συγκεκριμένο ιόν, όπως το  $\text{Na}^+$  για παράδειγμα (Cardozo, D.L., 2005).

Η διαδικασία με την οποία επιδρά ένα συγκεκριμένο ιόν το δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να μελετηθεί χρησιμοποιώντας ως μοντέλο ένα απλό ηλεκτρικό κύκλωμα που περιέχει ένα συσσωρευτή και μία αντίσταση, όπου το δυναμικό ισορροπίας για ένα ιόν, όπως για παράδειγμα το  $\text{Na}^{2+}$  λειτουργεί ως συσσωρευτής ο οποίος παράγει ένα ρεύμα  $I$  κατά μήκος της μεμβράνης μέσω μιας αγωγιμότητας  $G$ .

Στην προκειμένη περίπτωση  $\mathbf{I} = \mathbf{V} \mathbf{G}$ . Αν αντικαταστήσουμε το

$$G = \frac{1}{R}, \text{ τότε } \mathbf{V} = \mathbf{I} \mathbf{R}.$$

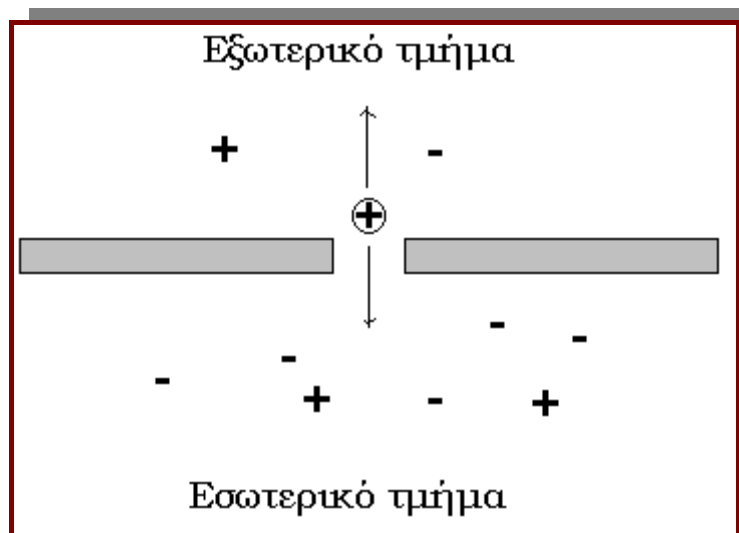
Αν θεωρήσουμε τώρα ότι ένα ιόν προσπαθεί να περάσει μέσα από μια οπή της μεμβράνης ενός κυτάρου με διάχυση, θα χρειαστεί μια ποσότητα ενέργειας. Θεωρούμε επίσης ότι  $N_a$  είναι ο αριθμός των ιόντων στην μία πλευρά της μεμβράνης και  $N_b$  στην άλλη πλευρά. Τότε η δυναμική ενέργεια  $\Delta E$  που θα απαιτηθεί είναι  $\Delta E = kT \ln N$ , όπου  $k$  είναι η σταθερά του Boltzmann. Αν επίσης υποθέσουμε ότι ο αριθμός ιόντων  $N_a > N_b$ , τότε

$$\Delta E = kT \ln N_a - kT \ln N_b = kT (\ln N_a - \ln N_b) = kT \ln \frac{N_a}{N_b}$$

Αν λοιπόν ακολουθήσουμε την πορεία ενός κατιόντος το οποίο προσπαθεί να μεταφερθεί στον εξωτερικό χώρο της κυτταρικής μεμβράνης θα δεχτεί μία δύναμη προς τα έξω, αυτή της διάχυσης και μία προς τα μέσα, ηλεκτρικής φύσεως από τα ανιόντα, με την προϋπόθεση ότι αυτά είναι περισσότερα. Ως προς τη δύναμη της διάχυσης ισχύουν οι εξισώσεις που προαναφέρθηκαν. Ως προς την δύναμη που προέρχεται από τα αρνητικά ιόντα, αν  $q$  είναι το φορτίο του ανιόντος και  $V$  η τάση μεταξύ τους, τότε η ενέργεια που παράγεται είναι ίση με  $qV$ . Σχηματικά η εν λόγω κατάσταση απεικονίζεται στο Σχήμα 4.

Όταν θα υπάρξει εξισορρόπηση των δύο δυνάμεων τότε η τάση θα

ισούται με: 
$$V = -\frac{kT}{q} \ln\left(\frac{N_a}{N_b}\right).$$



**Σχήμα 4.** Απεικόνιση των δυνάμεων που ασκούνται σε ένα ιόν κατά την διαδικασία εισόδου / εξόδου του δια μέσω της κυτταρικής μεμβράνης

Συνεπώς το δυναμικό της μεμβράνης είναι αποτέλεσμα δύο φαινομένων, της διάχυσης και των αναπτυσσόμενων ηλεκτρικών δυνάμεων.

## 4.2 Χωρητικότητα C του κυττάρου

Κάθε κύτταρο έχει ένα συγκεκριμένο δυναμικό, καθώς και μια συγκεκριμένη δυνατότητα αποθήκευσης φορτίων. Τα φορτία αποθηκεύονται κάτω από τη μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα το οποίο λειτουργεί ως αγωγός. Αν λοιπόν θεωρήσουμε ότι το κύτταρο έχει μια

χωρητικότητα C, τότε όπως περιγράψαμε και πιο πάνω  $C = \frac{Q}{V}$ . Αν

ακόμη αντικαταστήσουμε το φορτίο q στην προηγούμενη εξίσωση με το φορτίο ενός ηλεκτρονίου το  $e$  δηλαδή και υποθέσουμε ότι N είναι ο αριθμός των ανιόντων τότε το  $Q$  στον τύπο γίνεται  $Ne$ . Συνεπώς:

$C = \frac{Ne}{V}$ . Κατά την εξισορρόπηση των δύο δυνάμεων διάχυσης και

ηλεκτρικής δύναμης, όπως αναφέραμε πιο πάνω, θα ισχύσει

$\frac{Ne}{C} = -\frac{kT}{e} \ln\left(\frac{N_a}{N_b}\right)$ . Επιλύοντας την εξίσωση ως προς  $N$  βρίσκουμε τον

αριθμό των ανιόντων που μπορούν να αποθηκευτούν σε ένα πυκνωτή

χωρητικότητας  $C$ , ήτοι  $N = -\frac{kTC}{e^2} \ln\left(\frac{N_a}{N_b}\right)$ . Η χωρητικότητα μπορεί να

υπολογιστεί γνωρίζοντας τις διαστάσεις του κυττάρου, όπως διάμετρος, πάχος μεμβράνης κλπ.

### 4.3 Κανάλια Ιόντων

Είναι πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν εισόδους / εξόδους με χαμηλή αντίσταση, λαμβάνει χώρα μέσω των οποίων μεταφορά ιόντων. Υπάρχουν στις μεμβράνες όλων των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι διαμεμβρανικές, ενώ κάθε κανάλι αποτελείται από ένα αριθμό τέτοιων πρωτεϊνών. Τα κανάλια διαθέτουν ένα πόρο μέσα από το οποίο μπορεί να διέλθουν συγκεκριμένα ιόντα.

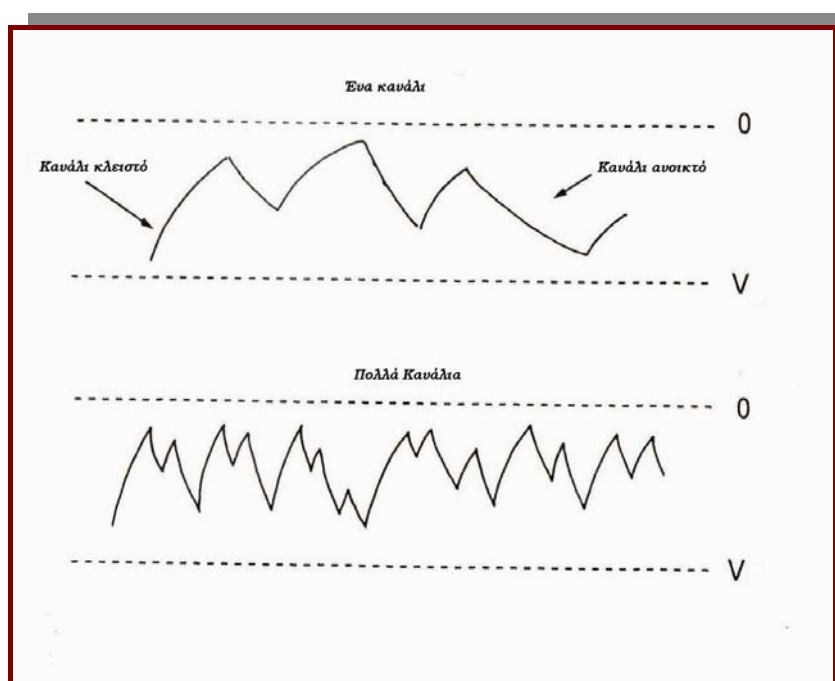
Ορισμένοι τύποι καναλιών μπορούν να «αντιληφθούν» την μεταβολή του ηλεκτρικού δυναμικού της μεμβράνης του κυττάρου και ανάλογα να ανοίξουν ή να κλείσουν τον πόρο τους, μεταβάλλοντας κατ' αυτό τον τρόπο της περατότητα της (Purves et al., 2001).

Σε άλλους τύπους καναλιών, εξωκυτταρικά ή ενδοκυτταρικά χημικά σήματα (νευροδιαβιβαστές), ρυθμίζουν την είσοδο των πόρων. Υπάρχουν επίσης άλλου τύπου διαβιβαστές οι οποίοι επίσης επιτελούν την ίδια διεργασία και επηρεάζεται από «μηχανικού» τύπου ερεθίσματα ή μεταβολές θερμοκρασίας.

Ανάλογα με το  $\text{I}^+$  υπάρχει και το αντίστοιχο κανάλι, εκτός από την περίπτωση όπου η είσοδος ή μη από ένα συγκεκριμένο κανάλι εξαρτάται όχι από το  $\text{I}^+$  κάθε αυτό (π.χ.  $\text{Na}^+$  ή  $\text{K}^+$ ), αλλά από το φορτίο του, είτε θετικό είτε αρνητικό. Η είσοδος από τον πόρο του καναλιού είναι ελεύθερη για το ανάλογο  $\text{I}^+$ , εκτός από την περίπτωση που προαναφέραμε όπου οι «πύλες» ρυθμίζουν την είσοδο αυτή.

Τα κανάλια έχουν ένα ιδιαίτερο ρόλο στα κύτταρα, παίζοντας ουσιώδη ρόλο σε βιολογικές διεργασίες, ενώ αποτελούν βασικό δομικό στοιχείο του νευρικού συστήματος.

Τα κανάλια προσομοιάζουν τον διακόπτη σε ένα κύκλωμα RC. Στην περίπτωση που το κύκλωμα μας περιλαμβάνει περισσότερους από έναν διακόπτες τότε η μορφή του διαγράμματος γίνεται πιο σύνθετη και θα έχει τη μορφή που απεικονίζεται στο Διάγραμμα 1.



**Διάγραμμα 1.** Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας μεταβολής του δυναμικού κατά μήκος του πυκνωτή σε κύκλωμα RC που περιλαμβάνει περισσότερους του ενός διακόπτες. Την ίδια μορφή εμφανίζει και η καμπύλη που περιγράφει τη μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού όταν τα κανάλια ιόντων ανοίγουν και κλείνουν (De Felice, L.J. 1997)

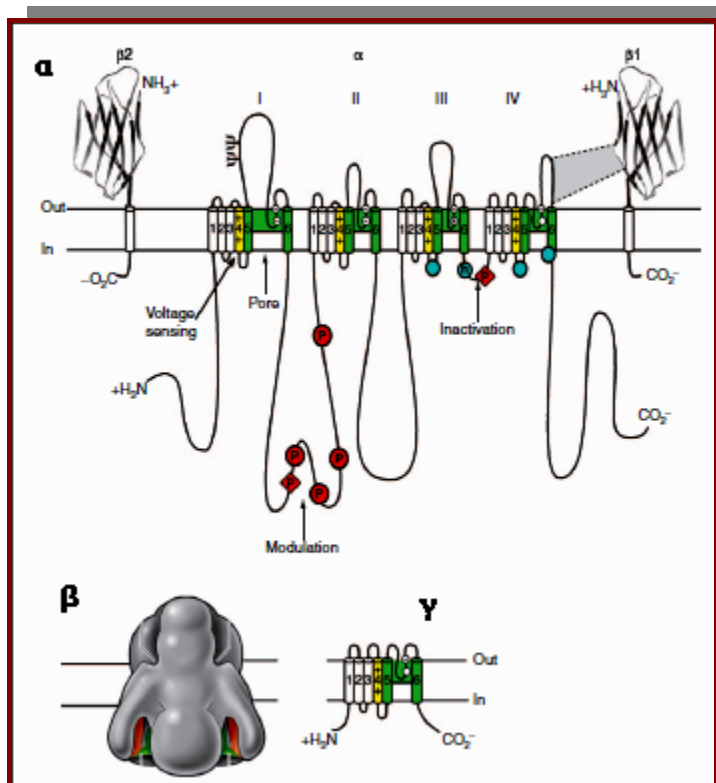
## 4.4 Είδη Καναλιών Ιόντων

### 4.4.1 Κανάλια Νατρίου

Τα κανάλια νατρίου είναι τα πρώτα που ανακαλύφθηκαν, όμως εξελικτικά προέρχονται από τα κανάλια  $Ca^{2+}$  τα οποία περιλαμβάνουν 4 ομόλογες περιοχές (Yu et al., 2003).



Οι πρωτεΐνες των καναλιών νατρίου ειδικότερα στον εγκέφαλο των ζώων αποτελούνται από μικρότερες πρωτεΐνες (υπομονάδες) μεγέθους 260 kDa. Σχηματικά η δομή των καναλιών απεικονίζεται στο Σχήμα 5.



**Σχήμα 5.** Απεικόνιση της δομής ενός καναλιού νατρίου. Το σχεδιάγραμμα (α) απεικονίζει τις υπομονάδες ενός καναλιού  $\text{Na}^+$ . Το σχήμα (β) αποτελεί μια τρισδιάστατη δομή μιας  $\alpha$ -υπομονάδας σε ανάλυση  $20 \text{ \AA}$ , ύστερα από σύνθεση μιας σειράς ηλεκτρονικών μικρογραφημάτων. Το (γ) σχήμα απεικονίζει ένα κανάλι  $\text{Na}^+$  βακτηριακού κυττάρου (Catterall, W.A., 2000)

Συνολικά έχουν προσδιοριστεί εννέα λειτουργικές  $\alpha$ -υπομονάδες, οι οποίες αναφέρονται ως  $N_v1.1$  έως  $N_v1.9$ . Η πρωτοταγής δομή κάθε  $\alpha$ -υπομονάδας υποδηλώνει ότι θα πρέπει να σχηματίζονται τέσσερις πτυχές (τέσσερις περιοχές), οι οποίες είναι παρόμοιες μεταξύ τους και περιλαμβάνουν έξι ενδομεμβρανικά τμήματα δομής  $\alpha$ -έλικας. Σε κάθε περιοχή ο αισθητήρας τάσης εντοπίζεται στο τέταρτο τμήμα, το οποίο περιλαμβάνει θετικά φορτισμένα αμινοξέα σε κάθε τρίτη θέση.

Πιθανόν ο κεντρικός πόρος του καναλιού να μην συνδέει απ' ευθείας τον εξωκυτταρικό χώρο με τον ενδοκυτταρικό, αλλά να έχει τέσσερις

διακλαδώσεις, όπως επίσης και οι τέσσερις περιφερειακοί πόροι, πιθανόν να παίζουν το ρόλο του αισθητήρα κίνησης ηλεκτρικών φορτίων (Purves et al., 2001).

Εκτός από τις α-υπομονάδες, στα δομικά στοιχεία των καναλιών νατρίου συγκαταλέγονται και β-υπομονάδες με τις οποίες συσχετίζονται οι πρώτες. Όπως προαναφέραμε οι α-υπομονάδες σχηματίζουν τον πυρήνα του καναλιού και είναι λειτουργικές ως πρωτεΐνες ακόμα και όταν οι β-υπομονάδες δεν εκφράζονται από το κύτταρο.

Οι β-υπομονάδες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες με ένα N-άκρο εξωκυτταρικό και ένα C-άκρο ενδοκυτταρικό. Ο βασικός τους ρόλος είναι το άνοιγμα και το κλείσιμο της εισόδου του καναλιού, αλλά και ο σχηματισμός ενδοκυτταρικών συνδέσεων με τον κυτταρικό σκελετό. Είναι 4 και συμβολίζονται ως N<sub>v</sub>β.1 έως N<sub>v</sub>β.4.

Τα κανάλια νατρίου παίζουν έχουν ιδιαίτερο ρόλο στη λειτουργία που αποκαλούμε νευρική διέγερση. Αν σε μια περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης έχουμε πολλά κανάλια του είδους, τότε όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός τους τόσο πιο άμεση είναι η παραγωγή νευρικής διέγερσης ή δυναμικού δράσης (action potential) όπως αλλιώς ονομάζεται.

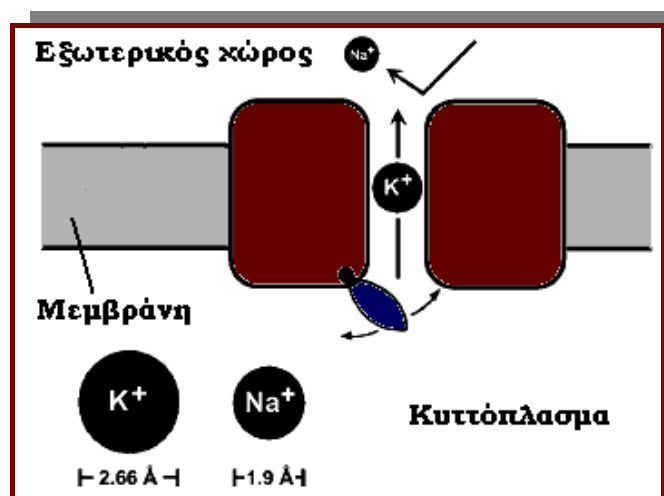
#### **4.4.2 Κανάλια Καλίου**

Τα κανάλια καλίου ανήκουν και αυτά στην ίδια οικογένεια όπως και τα κανάλια νατρίου που περιγράψαμε, αλλά και εκείνα του ασβεστίου που θα περιγραφούν στη συνέχεια. Τα κανάλια καλίου είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα σε πολλούς οργανισμούς και στα ευκαρυωτικά κύτταρα λειτουργούν σε συνδυασμό με άλλα κανάλια ρυθμίζοντας το ηλεκτρικό δυναμικό της μεμβράνης των κυττάρων, το οποίο όπως αναφέρθηκε παίζει σημαντικό ρόλο στον οργανισμό, όπως για παράδειγμα στους νευρώνες επαναφέρουν το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης στην αρνητική του τιμή (Purves et al., 2001).

Η ιστορία της μελέτης τους άρχισε από τους Hodgkin και Huxley το 1952, όταν δημοσίευσαν για πρώτη φορά τις εργασίες τους. Βασικό

σημείο της θεωρίας ήταν ότι η μεμβράνη του νευρίτη μεταβάλλεται σε σχέση με την περατότητα της ως προς τα ιόντα νατρίου και καλίου, χωρίς όμως να περιγράφουν το μηχανισμό. Στη συνέχεια προσπάθησαν να διερευνήσουν το μηχανισμό χρησιμοποιώντας ισότοπα καλίου και μελετώντας τη διεύθυνση της ροής των ιόντων κατά μήκος της μεμβράνης (Hodgkin et al. 1952a; 1952b; 1952c; 1952d).

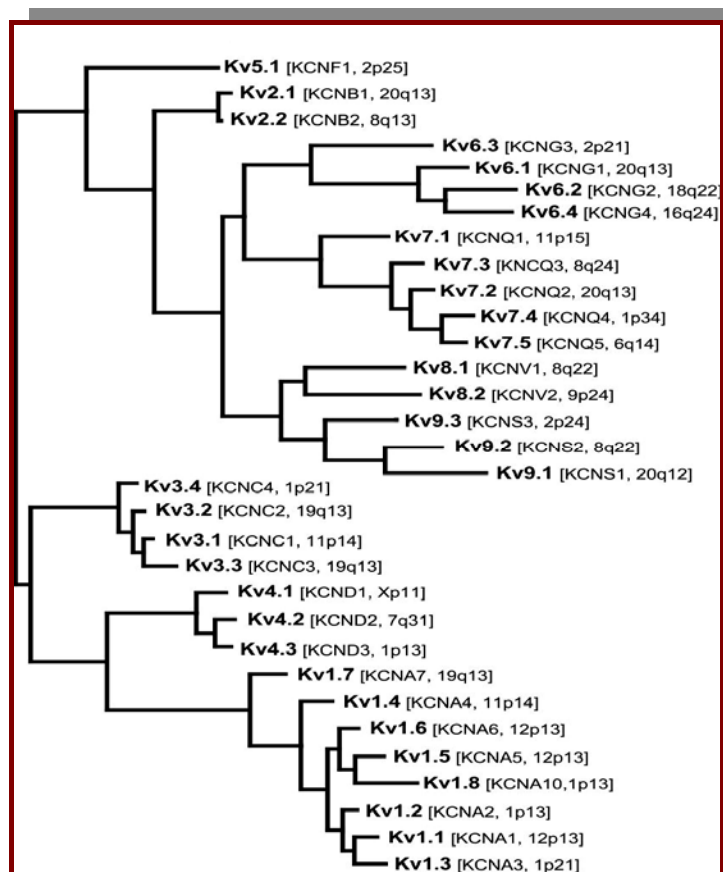
Οι πλειοψηφία των μελετών αναφορικά με τη δομή των καναλιών καλίου προέρχονται από μελέτες σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, αλλά και μελέτες της *Drosophila melanogaster*. Τα κανάλια ιόντων του είδους που περιγράφουμε, όπως στο ανωτέρω σχήμα, θα πρέπει καταρχήν να επιτρέπουν τη διέλευση των ιόντων με υψηλούς ρυθμούς ( $10^7$ - $10^8$   $K^+$ /sec), να είναι ασφαλώς επιλεκτικά, να αποκλείουν δηλαδή άλλα ιόντα και να ανοίγουν ή να κλείνουν ανάλογα με τα εξωτερικά ερεθίσματα που δέχονται. Το Σχήμα 6 περιγράφει τη βασική μορφή ενός καναλιού νατρίου ή καλίου.



**Σχήμα 6.** Γενική άποψη της δομής των καναλιών ιόντων νατρίου και καλίου, όπου απεικονίζονται οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στην είσοδο του καναλιού, η υπεύθυνη πρωτεΐνη για το άνοιγμα και κλείσιμο του πόρου, τα όρια της κυτταρικής μεμβράνης και ο περιβάλλοντας χώρος (MacKinnon, R., 2004; Yellen, G., 1998)

Ως προς τη δομή τους τα κανάλια καλίου είναι τετραμερή, αποτελούνται δηλαδή από τέσσερις υπομονάδες, οι οποίες διατάσσονται στο χώρο σαν δακτύλιοι και όλες μαζί συνιστούν τον διαμεμβρανικό

πόρο του καναλιού. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από έξι υδρόφοβες α-έλικες. Τα εν λόγω κανάλια περιλαμβάνουν δώδεκα κλάσεις α-υπομονάδων, οι οποίες συμβολίζονται ως  $K_v\alpha 1$ - $\alpha 12$  όπως φαίνεται και στο Σχήμα 7.



**Σχήμα 7.** Απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου εννέα  $K_v\alpha 1$ - $\alpha 9$  οικογενειών / κλάσεων α-υπομονάδων (Gutman et al., 2005)

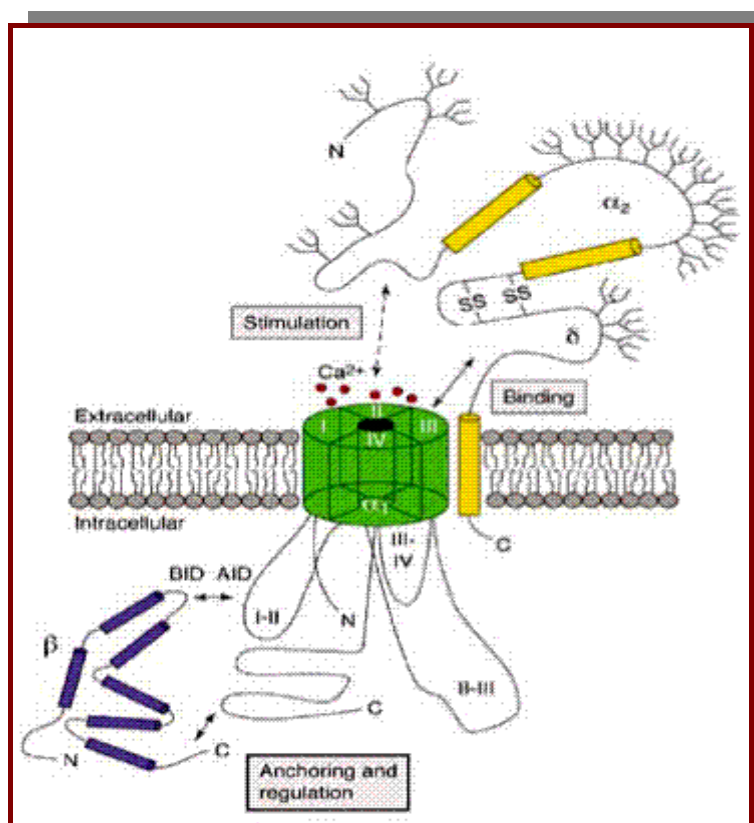
Οι προαναφερθείσες πρωτεΐνες σχετίζονται μεταξύ τους μέσω άλλων πρωτεϊνών τις αποκαλούμενες β-υπομονάδες, οι οποίες δεν είναι αγωγοί οι ίδιες, αλλά παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργία των καναλιών.

#### 4.4.3 Κανάλια Ασβεστίου

Τα κανάλια ασβεστίου αποτελούνται από πολλές υπομονάδες οι οποίες χωρίζονται σε πολλές κατηγορίες και συμβολίζονται ως  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2\delta$ ,

$\beta_{1-4}$  και  $\gamma$ . Εκτός από την  $\alpha_1$  οι υπόλοιπες ρυθμίζουν την λειτουργία του πόρου του καναλιού. Οι  $\alpha_1$  αντίστοιχα αποτελούν το δομικό στοιχείο του πόρου (Dolphin, A.C., 2006).

Γενικά τα κανάλια ασβεστίου είναι μεγάλες ετερομερείς πρωτεΐνες. Εργαστηριακές αναλύσεις έδειξαν ότι οι  $\alpha_1$  υπομονάδες αποτελούνται από εικοσιτέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα, τα οποία είναι οργανωμένα σε τέσσερις περιοχές (Σχήμα 8).



**Σχήμα 8.** Απεικόνιση ενός ετερομερούς συμπλέγματος καναλιού ασβεστίου (Walker et al., 1998)

Τα τέσσερα μέλη της οικογένειας  $Ca_v1$  είναι όλα L τύποι καναλιών. Από αυτά το  $Ca_v2$  βρίσκεται στον καρδιακό μυ, ενώ τα  $Ca_v3$  και  $Ca_v4$  ενεργοποιούνται σε χαμηλές τάσεις ρεύματος (Mori et al., 1991).

Η πύλη του πόρου δεν γνωρίζουμε που ακριβώς βρίσκεται, αλλά πιθανόν να υπάρχουν εσωτερικές και εξωτερικές πύλες στα κανάλια ασβεστίου. Η μοριακή βάση για την απενεργοποίηση των εν λόγω

καναλιών είναι επίσης άγνωστη και μάλλον διαφέρει πολύ από την αντίστοιχη των καναλιών νατρίου και καλίου (Jones, S.W., 2003).

Οι β-υπομονάδες έχουν κλωνοποιηθεί και είναι τέσσερεις όπως προαναφέραμε και συμβολίζονται ως  $\beta_{1-4}$ . Συναντώνται σε διάφορα όργανα όπως τους μύες, ειδικότερα στον καρδιακό μυ όπως η  $\beta_2$  και η  $\beta_4$  στον εγκέφαλο (Dolphin, A.C., 2003).

Τα κανάλια ασβεστίου παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην μεταφορά των νευρικών σημάτων και εντοπίζονται κυρίως στις απολήξεις των νεύρων. Μεταβολές στα εν λόγω κανάλια είναι αποτέλεσμα διαφόρων παθολογικών αιτιών, όπως η επιληψία ή δυσλειτουργία της καρδιάς.

#### **4.5 Υπολογισμός δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης**

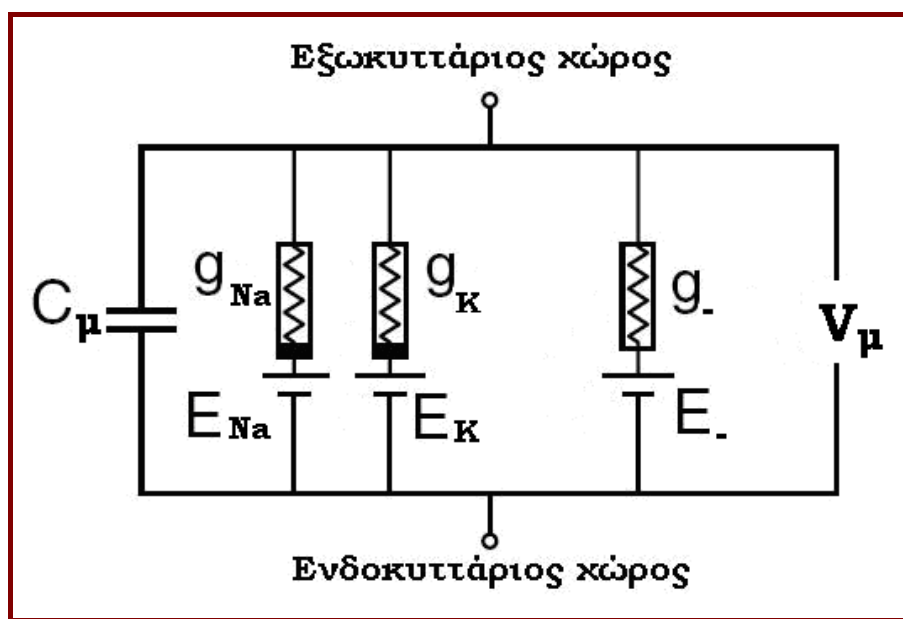
Η επιστήμη η οποία μελετά τα ηλεκτρικά φαινόμενα που προκαλούνται από τα κύτταρα ή στο εσωτερικό των κυττάρων ονομάζεται ηλεκτροφυσιολογία. Η μελέτη της ηλεκτρικής δραστηριότητας μας δίνει πολύτιμες πληροφορίες για την ενδοκυτταρική λειτουργία.

Επειδή η παρακολούθηση και καταγραφή των ανωτέρω φαινομένων αποτελεί μια ιδιαίτερα επίπονη διαδικασία, χρησιμοποιούνται διάφορα μέσα και τεχνικές για την παρακολούθηση των εν λόγω φαινομένων καθώς και των δεδομένων που αντλούνται από αυτά. Στην παρούσα διατριβή όπως θα αναφέρουμε πιο κάτω χρησιμοποιήθηκαν για ορισμένες τουλάχιστον εφαρμογές τα νευρωνικά δίκτυα.

Όπως προαναφέραμε ιδιαίτερο ρόλο στη διαμόρφωση του δυναμικού της μεμβράνης έχουν τα κανάλια ιόντων. Η μοντελοποίηση του τρόπου με τον οποίο επιδρά η μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού στις ιδιότητες της μεμβράνης αποτελεί κομβικό σημείο στην κατανόηση των ηλεκτρικών ιδιοτήτων των κυττάρων και κατ' επέκταση στον σχεδιασμό των κυτταρικών βιοαισθητήρων. Ένα από τα κλασσικά μοντέλα που χρησιμοποιείται για την προσομοίωση του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης, του τρόπου παραγωγής του και των ιδιοτήτων του είναι και το μοντέλο Hodgkin-Huxley, που περιγράφεται στη συνέχεια (Hodgkin, A. and Huxley, A., 1952).

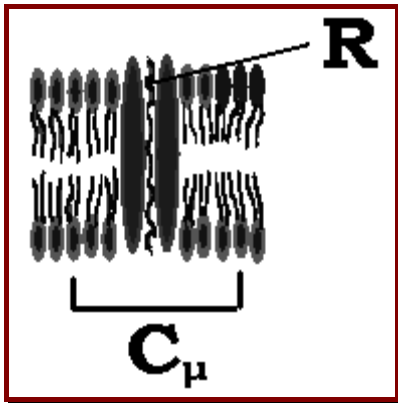
### 4.5.1 Το μοντέλο Hodgkin-Huxley

Το μοντέλο Hodgkin-Huxley θεωρεί ότι η συμπεριφορά της κυτταρικής μεμβράνης ως προς τις ηλεκτρικές της ιδιότητες, μπορεί να περιγραφεί από ένα ηλεκτρικό κύκλωμα που αποτελείται από μικρότερα παράλληλα κυκλώματα, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 9Α.



**Σχήμα 9Α.** Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου Hodgkin-Huxley όπου προσομοιάζει την εμφάνιση και παραγωγή ηλεκτρικών δυναμικών στην μεμβράνη των νευρώνων με τη μορφή ηλεκτρικού κυκλώματος, όπου  $V_{\mu}$  είναι το δυναμικό της μεμβράνης και  $E_i$  είναι το δυναμικό ισορροπίας της μεμβράνης αντίστοιχα για τα κατιόντα (Na, K) και άλλα ιόντα (π.χ. Cl), ενώ  $g_{Na}$  και  $g_K$  είναι αντίστοιχα οι αγωγιμότητες του Na και K.  $C_{\mu}$  είναι η χωρητικότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Πηγή αρχικού σχεδίου: [http://en.wikipedia.org/wiki/Hodgkin%E2%80%93Huxley\\_model](http://en.wikipedia.org/wiki/Hodgkin%E2%80%93Huxley_model)

Η μεμβράνη όπως προαναφέρθηκε διαθέτει μια χωρητικότητα φορτίου. Αν αυτή η χωρητικότητα μεταβληθεί τότε η ένταση του ρεύματος θα μεταβληθεί ανάλογα. Επίσης η κίνηση φορτίου δια μέσω των αντιστάσεων του κυκλώματος, όπως αυτό απεικονίζεται στο ανωτέρω σχήμα μπορεί να μεταβάλει την ένταση του ρεύματος. Τα ανωτέρω μπορούμε να τα συνοψίσουμε στο Σχήμα 9B, το οποίο απεικονίζει μια απλουστευμένη μορφή της κυτταρικής μεμβράνης ως κύκλωμα RC.



**Σχήμα 9B.** Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου Hodgkin-Huxley υπό τη μορφή κυτταρικής μεμβράνης, όπου φαίνεται ένα κανάλι με την σχετική αντίσταση  $R$  και τμήμα της μεμβράνης με την αντίστοιχη χωρητικότητα  $C_{\mu}$ .

Το ρεύμα το οποίο αναγράφεται στο Σχήμα 9<sup>A</sup> προκαλείται από τα κατιόντα νάτριο και κάλιο και σε πολύ μικρότερο βαθμό από άλλα ιόντα όπως το χλώριο. Η μετακίνηση του φορτίου στους πυκνωτές εκφράζεται ως:  $I = C \frac{dV}{dt}$ . Αν θεωρήσουμε ότι η χωρητικότητα της μεμβράνης

είναι  $C_{\mu}$  τότε το ρεύμα  $I_{\mu}$  της μεμβράνης θα ισούται με:

$$I_{\mu} = C_{\mu} \frac{dV}{dt} + I_{+} + I_{-}, \text{ όπου } I_{+} \text{ και } I_{-} \text{ τα ρεύματα που προκαλούνται από}$$

τα κατιόντα και άλλα ιόντα αντίστοιχα. Επιμέρους το  $I_{+}$  ισούται με  $I_{Na} +$

$$I_K, \text{ συνεπώς η παραπάνω εξίσωση γίνεται: } I_{\mu} = C_{\mu} \frac{dV}{dt} + I_{Na} + I_K + I_{-}$$

Αν  $g_{Na}$  και  $g_K$  είναι αντίστοιχα οι αγωγιμότητες του Na και του K τότε οι αντίστοιχες εντάσεις ρεύματος της ανωτέρω εξίσωσης γίνονται:

$$I_{Na} = g_{Na}(V_{\mu} - E_{Na}), \quad I_K = g_K(V_{\mu} - E_K) \quad \text{και} \quad I_{-} = g_{-}(V_{\mu} - E_{-}),$$

όπου  $V_{\mu}$  είναι το δυναμικό της μεμβράνης και  $E_i$  είναι το δυναμικό ισορροπίας της μεμβράνης αντίστοιχα για κάθε ιόν. Συνεπώς η πλήρης εξίσωση που περιγράφει το μοντέλο Hodgkin-Huxley έχει ως εξής:

$$I_{\mu} = C_{\mu} \frac{dV}{dt} + g_{Na}(V_{\mu} - E_{Na}) + g_K(V_{\mu} - E_K) + g_{-}(V_{\mu} - E_{-})$$

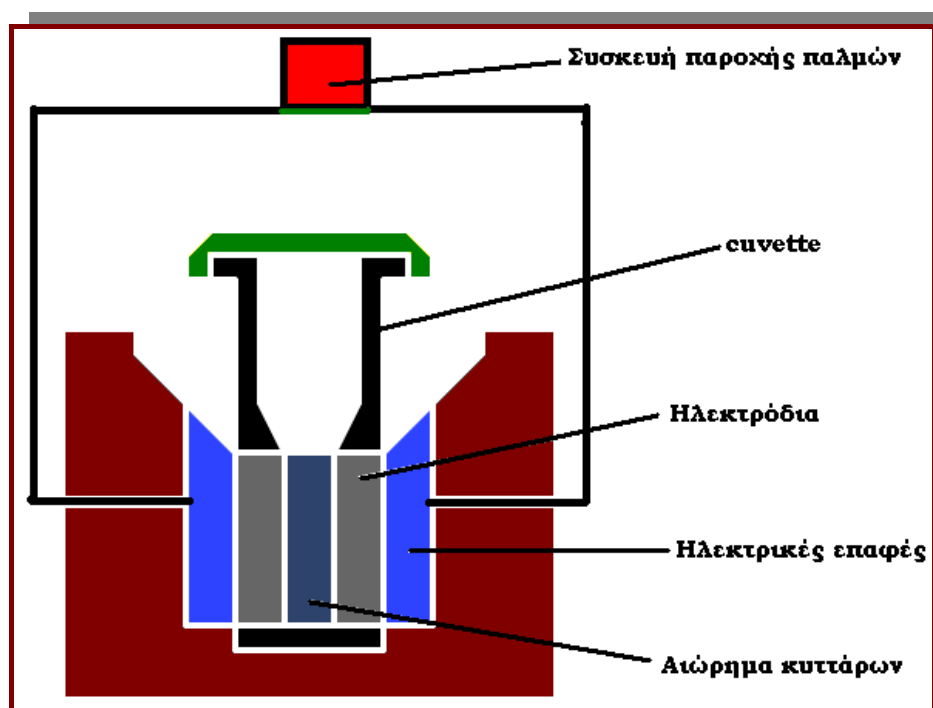


Θα πρέπει να επισημάνουμε ότι στο μοντέλο που περιγράψαμε η κυτταρική μεμβράνη θεωρείται ένα ιδεατό κύκλωμα. Επίσης λάβαμε υπόψη δύο ιόντα το νάτριο και το κάλιο για να απλοποιηθεί περαιτέρω το μοντέλο μας. Ένα ακόμη σημαντικό στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι έχουμε μεταφορά ιόντων μέσω αντλιών, πυλών, πόρων και άλλων μέσων, για το λόγο αυτό αναφέρουμε στην τελική εξίσωση το ρεύμα που προκαλείται από την κίνηση άλλων ιόντων.

# **5. Η διαδικασία της ηλεκτροπόρωσης**



Η ηλεκτροπόρωση είναι μια διαδικασία, κατά την οποία προκαλείται αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας και της περατότητας της μεμβράνης των κυττάρων, με εφαρμογή του κατάλληλου ηλεκτρικού πεδίου. Έχει διάφορες εφαρμογές και η πιο συνήθης είναι η εισαγωγή ενός μορίου σε ένα κύτταρο, όπως για παράδειγμα η εισαγωγή ενός μορίου DNA ή αντισωμάτων στην επιφάνεια της μεμβράνης (Neumann et al., 1982). Στο Σχήμα 10 απεικονίζεται η γενικά άποψη μιας συσκευής ηλεκτροπόρωσης.



**Σχήμα 10.** Σχηματική απεικόνιση της δομής συσκευής ηλεκτροπόρωσης, όπου διακρίνονται το σύστημα παραγωγής παλμών, τα ηλεκτρόδια και ο χώρος τοποθέτησης του δείγματος αιωρήματος των κυττάρων. Πηγή αρχικού σχεδίου: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Electroporation\\_Diagram.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Electroporation_Diagram.png)

Στο αιώρημα των κυττάρων που βρίσκεται μέσα στην κυβέτα εφαρμόζεται ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο. Η κυβέτα έχει στις δύο πλευρές της, όπως φαίνεται και από το σχήμα, ηλεκτρόδια αλουμινίου.

Η διαδικασία περιλαμβάνει πολλά στάδια, όπου ως πρώτο βήμα εφαρμόζεται ένας ηλεκτρικός παλμός έντασης από 300 V/cm έως 1800

V/cm, ανάλογα με το αντίσωμα του ιού που θα εισαχθεί (Perdikaris et al., 2009; Yasumura, Y. and Kawakita, M., 1963).

Κατά την διαδικασία της τροποποίησης της μεμβράνης των κυττάρων μέσω της «μεμβρανικής μηχανικής» (μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή των βιοαισθητήρων που θα περιγράψουμε πιο κάτω), τα κύτταρα βρισκόταν μέσα σε διάλυμα σε μεγάλους αριθμούς με αποτέλεσμα ένα μέρος μόνο του εφαρμοζόμενου πεδίου να έχει επίδραση στην μεμβράνη τους.

Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται είναι στην πραγματικότητα πολύ μεγαλύτερη από εκείνη του πεδίου που δέχεται η μεμβράνη του μεμονωμένου κυττάρου. Οι επιπτώσεις του εφαρμοζόμενου μεμβρανικού δυναμικού στα κύτταρα, σχετίζονται με τη θέση τους σε μια ομάδα κυττάρων (cluster), όπως αυτή διατάσσεται στις τρεις διαστάσεις.

Επίσης σημαντικό ρόλο έχει ο όγκος της ομάδας των κυττάρων, η πυκνότητα της και η διάταξη της, ενώ έχει αποδειχθεί ότι οι όποιες επιπτώσεις ως προς την βιωσιμότητα του κυττάρου μετά το πέρας της διαδικασίας της ηλεκτροπόρωσης δεν σχετίζεται με την απόσταση του κυττάρου από την εξωτερική επιφάνεια της σφαίρας που σχηματίζει η ομάδα των κυττάρων. Το στοιχείο αυτό είναι σημαντικό διότι στην πραγματικότητα τα κύτταρα μπορούν να δεχθούν πολύ μικρότερες καταπονήσεις (Pavlin et al., 2005).

Κατά τη διάρκεια των επομένων βημάτων της εν λόγω διαδικασίας η μεμβράνη του κυττάρου συμπεριφέρεται σαν πυκνωτής, συνεπώς το φορτίο της αυξάνεται, λόγω της μεταφοράς φορτίου από το περιβάλλον που το περιβάλλει. Σε αυτή διαδικασία μεταφοράς ιόντων υπάρχει ένα όριο πέρα από το οποίο λαμβάνει χώρα αναδιάταξη της μορφολογίας της στοιβάδας των λιπιδίων.

Η μεμβράνη των κυττάρων δεν συμπεριφέρεται πάντα κατά τον ίδιο τρόπο σε συνθήκες ηλεκτρικού stress. Η μεταβολή της στοιβάδας των λιπιδίων μπορεί να είναι αντιστρέψιμη ή μη αντιστρέψιμη.

Στην πρώτη περίπτωση παραιτείται μια απότομη αύξηση της αγωγιμότητας της μεμβράνης, η οποία οδηγεί στη ρήξη της (Abidor et

al., 1979; Genco et al., 1993). Η δεύτερη περίπτωση συναντάται συνήθως όταν υπάρχει συγκεκριμένη σύσταση του διπλού στρώματος, όπως στην περίπτωση της οξειδωμένης χοληστερόλης, με εφαρμογή μικρής χρονικής διάρκειας παλμού υψηλής έντασης (Glaser et al., 1983).

Για την μελέτη των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα κατά την εφαρμογή ενός ηλεκτρομαγνητικού πεδίου σε μια ομάδα κυττάρων, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τρόποι, όπως αυτός της εξομοίωσης της μοριακής δυναμικής (Mounir et al., 2005). Ουσιαστικά επιτυγχάνεται εξομοίωση και μελέτη, μέσω διαφόρων τεχνικών, των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα κατά την εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στη διάρκεια του χρόνου στη διπλή στοιβάδα των λιπιδίων της μεμβράνης.

Με τον τρόπο αυτό καταγράφονται οι μεταβολές των στοιβάδας ανά nanosecond, η δε ένταση του πεδίου είναι της τάξεως  $0,5 \text{ V nm}^{-1}$  ή και μεγαλύτερη. Σε αυτή την ένταση και για το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα εφαρμογής (nanosecond), μπορούν να δημιουργηθούν πόροι μεγέθους 10nm στη μεμβράνη του κυττάρου (Tieleman et al., 2003).

Το συμπέρασμα των ανωτέρω ερευνών ήταν ότι η διαδικασία της ηλεκτροπόρωσης λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια:

1. Κατά το πρώτο στάδιο μόρια νερού τα οποία σχηματίζουν μια ενιαία δομή που μοιάζει με ένα σύρμα, διαπερνούν τον υδρόφοβο πυρήνα της διπλής στοιβάδας.
2. Στο επόμενο στάδιο το σύρμα μεγαλώνει σε μήκος, διαστέλλεται σε πόρους οι οποίοι καλύπτονται από νερό. Στη συνέχεια αυτοί οι πόροι σταθεροποιούνται από λιπίδια τα οποία φεύγουν από την ενδιάμεση φάση μεμβράνης - νερού προς το μέσο της διπλής στοιβάδας.

Η διαδικασία που περιγράψαμε χρονικά διαρκεί ελάχιστα και μάλιστα όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του πεδίου τόσο πιο λίγο διαρκεί. Η δε διαμόρφωση των πόρων δεν διακρίνεται από ομοιομορφία

δεδομένου ότι οι υδρόφοβες με τις υδρόφιλες περιοχές (τοιχώματα πόρων) έχουν ακανόνιστη θέση.

Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων της παρούσης διατριβής ως προς την χρήση της μεθόδου για την εισαγωγή αντισωμάτων στην επιφάνεια της μεμβράνης, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην διατήρηση της ζωτικότητας των κυττάρων μετά την εφαρμογή του πεδίου. Οι τιμές επιλέχθηκαν μετά από σειρά δοκιμών μελετώντας όχι μόνο το βαθμό επιβίωσης των κυττάρων αλλά και την απόδοση των βιοαισθητήρων σε γνωστά δείγματα, ώστε να επιβεβαιωθεί η λειτουργικότητα τους.

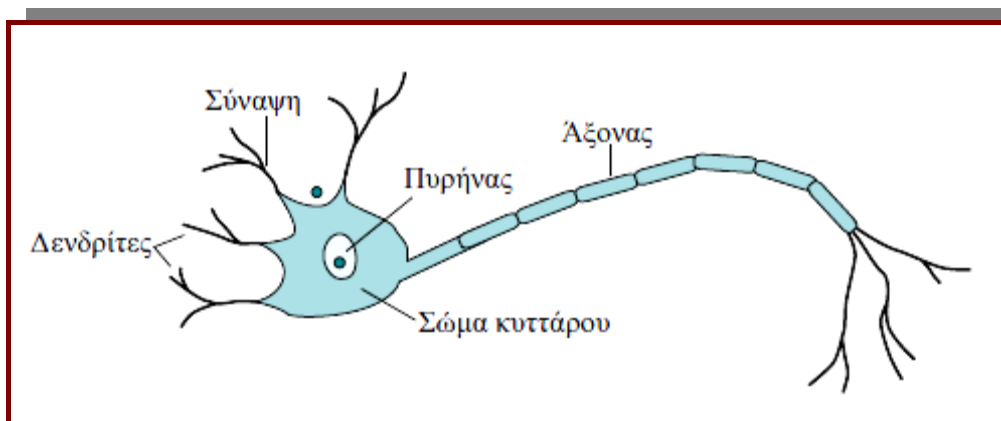
# **6. Νευρωνικά δίκτυα**





## 6.1 Τι είναι τα νευρωνικά δίκτυα;

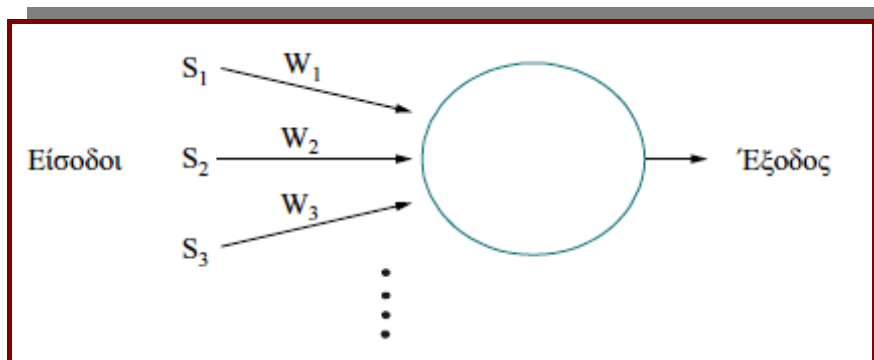
Το νευρικό σύστημα των ζώντων οργανισμών αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό νευρωνικών δικτύων. Κεντρική μονάδα του νευρικού συστήματος είναι ο εγκέφαλος. Ο εγκέφαλος επίσης αποτελείται από πολλά νευρωνικά δίκτυα. Τα νευρωνικά δίκτυα έχουν ως δομική τους μονάδα τους νευρώνες, οι οποίοι σε συνεχή βάση επεξεργάζονται πληροφορίες, ενώ μπορούν να δέχονται και να στέλνουν δεδομένα. Στο Σχήμα 11 απεικονίζεται ένας νευρώνας.



**Σχήμα 11.** Γενική άποψη ενός νευρώνα με τα επιμέρους τμήματα του, το σώμα, τον πυρήνα, τον άξονα, τις συνάψεις και τους δενδρίτες (Αργυράκης, Π., 2001)

Τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα των οποίων η έμπνευση προέρχεται από τα βιολογικά νευρωνικά δίκτυα, προσπαθούν να συνδυάσουν τον ανθρώπινο τρόπο σκέψης με τον αφηρημένο μαθηματικό τρόπο σκέψης. Τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα είναι μοντέλα του ανθρώπινου νευρωνικού συστήματος, ενσωματώνουν όλα τα μέχρι σήμερα γνωστά χαρακτηριστικά και επιτελούν με τον ίδιο τρόπο μια σειρά εργασιών.

Το νευρωνικό δίκτυο όπως αναφέρθηκε αποτελείται από τους νευρώνες. Σε κάθε νευρώνα έχουμε εισερχόμενα και εξερχόμενα σήματα, τα οποία εισέρχονται από ένα αριθμό εισόδων, αλλά τα εξερχόμενα σήματα εξέρχονται μόνο από μία έξοδο. Σχηματικά θα μπορούσαμε να αναπαραστήσουμε ένα νευρώνα όπως στο Σχήμα 12.



**Σχήμα 12.** Σχηματική αναπαράσταση νευρώνα με τις εισόδους του και την έξοδο του, η οποία είναι μοναδική σε αντίθεση με τις εισόδους (Αργυράκης, Π., 2001)

Η παράμετρος  $w$  που αναφέρεται στο σχήμα είναι η τιμή βάρους και συνδέεται με ένα σήμα που μεταδίδεται από ένα νευρώνα σε ένα άλλο. Ουσιαστικά η τιμή βάρους υποδηλώνει το βαθμό συνεισφοράς του συγκεκριμένου σήματος στην διαμόρφωση της δομής του δικτύου για τους δύο νευρώνες τους οποίους συνδέει. Αναλογικά μεγάλη τιμή βάρους συνεπάγεται μεγάλη συνεισφορά του σήματος. Είναι τόσο μεγάλη η σημασία της εν λόγω παραμέτρου όσο και ένας χημικός δεσμός μεταξύ δύο ατόμων.

Η μετάδοση του σήματος γίνεται με δύο τρόπους. Στην πρώτη περίπτωση όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα ο νευρώνας δέχεται διάφορα σήματα, υπολογίζει μια τιμή  $x$  με βάση τα δεδομένα που έχει και συγκρίνει την τιμή του  $x$  με μια τιμή κατωφλίου  $\theta$ , η οποία έχει οριστεί εξ' αρχής και είναι χαρακτηριστική για τον συγκεκριμένο νευρώνα.

Η ενεργοποίηση του νευρώνα λαμβάνει χώρα μόνο όταν η τιμή  $x$  είναι μεγαλύτερη της τιμής του  $\theta$ . Τότε ο νευρώνας μεταδίδει σήμα στο υπόλοιπο δίκτυο διαφορετικά δεν ενεργοποιείται και δεν στέλνει κανένα δίκτυο. Αν θεωρήσουμε ότι ο νευρώνας δρα ως δυαδικό στοιχείο στην πρώτη περίπτωση το  $x$  ισούται με ένα και στη δεύτερη με μηδέν.

Ο δεύτερος τρόπος μετάδοσης δεν περιλαμβάνει τιμή κατωφλίου, συνεπώς η τιμή του  $x$  δεν είναι σε αυτή την περίπτωση ένα ή μηδέν, αλλά προσδιορίζεται με μια συνάρτηση που έχει ειδική μορφή, η καμπύλη της οποίας μπορεί να είναι σιγμοειδής. Οι συναρτήσεις αυτές

ανεξάρτητα με τον τρόπο μετάδοσης δεν είναι ποτέ γραμμικές, διότι η έξοδος θα ήταν ανάλογη με την είσοδο, το οποίο είναι αδύνατο να συμβεί στα νευρωνικά δίκτυα.

Τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα χρειάζονται εκπαίδευση για να λειτουργήσουν και αυτό είναι και το βασικό τους χαρακτηριστικό, ότι δηλαδή με την εκπαίδευση μαθαίνουν, δηλαδή δέχονται ορισμένες εισόδους, σήματα που έχουν αριθμητικές τιμές και δίνουν κάποιες εξόδους οι οποίες επίσης έχουν αριθμητικές τιμές.

Οι αριθμητικές τιμές της εισόδου αποτελούν πρότυπα, στο καθένα από τα οποία αντιστοιχεί μια σωστή τιμή, η οποία και αποτελεί το σήμα που πρέπει να πάρουμε στην έξοδο. Δίνοντας στο νευρωνικό δίκτυο τέτοια πρότυπα, για τα οποία ξέρουμε εκ των πρότερων ποια είναι η έξοδος, το εκπαιδεύουμε. Τα πρότυπα αυτά πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικά με αυτά που επιθυμούμε να μάθει το δίκτυο μας.

Οι βασικοί τρόποι εκπαίδευσης ενός δικτύου είναι δύο: (α) ο εποπτευόμενος τρόπος και (β) ο μη εποπτευόμενος τρόπος. Στην πρώτη περίπτωση εισάγονται στο δίκτυο οι τιμές των εισόδων αλλά και των εξόδων που πρέπει να μάθει το δίκτυο. Τελικός σκοπός είναι η ελαχιστοποίηση της διαφοράς μεταξύ της τιμής της εξόδου και της επιθυμητής τιμής της εξόδου.

Στη δεύτερη περίπτωση ο χρήστης δίνει την πληροφορία στο δίκτυο αλλά όχι την επιθυμητή τιμή της εξόδου. Το δίκτυο σε αυτή την περίπτωση ψάχνει να βρει κάποιες τάσεις στα σήματα εισόδου και προσπαθεί να υπάρχει συνάφεια ως προς τα χαρακτηριστικά της εισόδου και της εξόδου. Ο πρώτος τρόπος εκπαίδευσης χρησιμοποιείται συχνότερα, αλλά ο μη εποπτευόμενος τρόπος χρησιμοποιείται συχνότερα σε προβλήματα για τα οποία δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα.

Τα νευρωνικά δίκτυα λειτουργούν με βάση ένα παράλληλο τρόπο λειτουργίας και όχι σειριακά. Το πρόβλημα που θα πρέπει να επιλυθεί επιμερίζεται σε διάφορους νευρώνες, αυξάνοντας έτσι την ταχύτητα λόγω επιμερισμού της σχετικής με το πρόβλημα εργασίας. Συγκριτικά με τους ηλεκτρονικούς υπολογιστές τα νευρωνικά δίκτυα επιτελούν απλές διεργασίες και τα επιμέρους τμήματα τους οι νευρώνες δηλαδή

λειτουργούν ανεξάρτητα μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να είναι πιο ανεκτικά στα σφάλματα.

Ως προς τα σφάλματα ένα επίσης σημαντικό χαρακτηριστικό των νευρωνικών δικτύων είναι ότι μια πιθανή βλάβη σε ένα τμήμα του δικτύου δεν επηρεάζει τη συνέχεια της λειτουργίας του, απλά προκαλείται ένα μικρό σφάλμα, ενώ αντίθετα ένα υπολογιστικό πρόγραμμα δεν θα μπορούσε να λειτουργήσει και θα σταματούσε η λειτουργία του.

## **6.2 Συνδυασμός νευρωνικών δικτύων και βιοαισθητήρων BERA**

Στην παρούσα διατριβή γίνεται μια ιδιαίτερη αναφορά, διότι πιστεύουμε ότι αποτελούν ένα πεδίο με ιδιαίτερα θετικές προοπτικές αναλογιζόμενοι την ολοένα και ευρύτερη εφαρμογή τους σε διάφορους τομείς. Συνδυαστικά με την τεχνολογία των κυτταρικών βιοαισθητήρων μπορούν να αποτελέσουν ένα ιδιαίτερο χρήσιμο εργαλείο στο χώρο του διαγνωστικού ελέγχου.

Τα νευρωνικά δίκτυα χρησιμοποιούνται εδώ και αρκετά χρόνια σε κλημικές αναλύσεις, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις κατά τις οποίες πρέπει να ληφθούν γρήγορες αποφάσεις και ο χρόνος είναι ιδιαίτερα περιορισμένος.

Στην παρούσα διατριβή η τεχνολογία των νευρωνικών δικτύων χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη ενός συστήματος ανίχνευσης φυτοπαθογόνων ιών, με τη χρήση βιοαισθητήρων BERA και Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων. Σύμφωνα με τη διαδικασία που θα περιγράψουμε, μετρώντας την μεταβολή της διαφοράς δυναμικού, μετά την εισαγωγή του βιοαισθητήρα στο δείγμα, παράγεται μια σειρά τιμών μεταβολής του δυναμικού της μεμβράνης των κύτταρων που περιλαμβάνονται στον αισθητήρα, σε συνάρτηση με το χρόνο, οι οποίες συνιστούν την απόκριση του αισθητήρα.

Υστερα από πολλές εκατοντάδες μετρήσεων έλαβε χώρα η εκπαίδευση των Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων. Δοκιμάστηκαν πολλές

αρχιτεκτονικές Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων και τεχνικές χειρισμού των τιμών που ελήφθησαν σε συνάρτηση με το χρόνο. Το σύστημα που αναπτύχθηκε χρησιμοποιεί Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα και βιοαισθητήρες BERA με εκλεκτικότητα σε συγκεκριμένους ιούς, ενώ για την τελική απόφαση/ταυτοποίηση χρησιμοποιείται συνδυασμός της πληροφορίας που παράγεται από κάθε βιοαισθητήρα (Frossyniotis et al, 2006a ; 2006b).

Σε επόμενο στάδιο αυξήθηκε η σταθερότητα και η ικανότητα γενίκευσης του προτύπου ταξινόμησης, με την εφαρμογή νέων τεχνικών. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε μια προηγμένη ενεργειακή λειτουργία για την εκπαίδευση του νευρωνικού δικτύου με σκοπό την μείωση της πολυπλοκότητας του προτύπου (Frossyniotis et al., 2008).

Για τις προαναφερθείσες εφαρμογές των τεχνητών νευρωνικών δικτύων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα φυτικών ιστών τα οποία είχαν προσβληθεί από τους ιούς *Tobacco rattle virus* (TRV) και *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), σε συνδυασμό με τους βιοαισθητήρες BERA. Το σύστημα που δημιουργήθηκε περιγράφεται ως σύστημα «σύντηξης πολλαπλών αισθητήρων» και το οποίο ουσιαστικά αποτελεί ένα συνδυασμό πολλαπλών αισθητήρων οι οποίοι αποτελούν μια τυποποιημένη διάταξη / μορφή. Βασικό πλεονέκτημα του εν λόγω συστήματος είναι η ταχεία απόκριση με το μικρότερο δυνατό κόστος, σε σχέση με τα συστήματα που περιλαμβάνουν ένα αισθητήρα.

Οι μετρήσεις στις προαναφερθείσες εφαρμογές λαμβάνονται από το σύστημα ανά συγκεκριμένες χρονικές στιγμές. Κάθε μέτρηση συνοδεύεται και από «θόρυβο», ο οποίος διαφοροποιεί ανάλογα τις λαμβανόμενες μετρήσεις μεταξύ τους. Με τη χρήση τεχνικών «ομαλοποίησης» ο θόρυβος εξαλείφεται, χωρίς να χάνεται παράλληλα κάποια πληροφορία.

Για την ανάπτυξη ενός μοντέλου ανίχνευσης των ιών που προαναφέραμε, χρησιμοποιήθηκαν 100 παραδείγματα (δείγματα καθαρού ιού) για κάθε ιό, ενώ κάθε δείγμα εξετάστηκε με τρεις διαφορετικούς βιοαισθητήρες, δηλαδή αισθητήρες εξειδικευμένους στην ανίχνευση του TRV, αισθητήρες εξειδικευμένους για τον CGMMV και

αισθητήρες που περιείχαν κύτταρα Vero χωρίς καμία «επεξεργασία». Συνεπώς για κάθε ιό λαμβάνονται 300 πρότυπα (3x100).

Για την ταξινόμηση των εν λόγω προτύπων, χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη ταξινομητών. Ο ένας ήταν ένας απλός ταξινομητής, ο οποίος εκπαιδεύεται χρησιμοποιώντας και τα 600 πρότυπα, ενώ ο δεύτερος αποτελείται από τρεις ταξινομητές, καθένας από τους οποίους είναι εξειδικευμένος για έναν από τους τρεις βιοαισθητήρες BERA.

Το ανωτέρω περιγραφέν σύστημα μπορούσε να ανιχνεύει την παρουσία των δύο ιών με ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά επιτυχίας (~90%), ενώ παράλληλα απάλλαξε τον χειριστή από την πολύπλοκη επεξεργασία των αποτελεσμάτων, καθιστώντας την αρχικά χρονοβόρα διαδικασία άντλησης των αποτελεσμάτων ιδιαίτερα απλή (Περδικάρης et al., 2006).

Τεχνητά νευρωνικά δίκτυα σε συνδυασμό με βιοαισθητήρες BERA χρησιμοποιήθηκαν και για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων αλλά και διαφόρων παθογόνων με ιδιαίτερη οικονομική σημασία στο χώρο της γεωργίας ( Kintzios et al., 2007).

# 7. Ioi





## 7.1 Διάγνωση Ιών

Η γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση των ιών αποτελεί πρόκληση για τους ερευνητές που εμπλέκονται στην ανάπτυξη διαγνωστικών συστημάτων τα οποία βασίζονται σε κυτταρικούς βιοαισθητήρες. Βασικό πλεονέκτημα των εν λόγω βιοαισθητήρων είναι ο μικρός χρόνος παρασκευής τους, αλλά και άντλησης ενός αξιόπιστου αποτελέσματος.

Σε προηγούμενο κεφάλαιο κατά την αναφορά στην μέθοδο BERA αναφέρθηκε ότι τα κύτταρα του βιοαισθητήρα αποκρίνονται στην παρουσία των ιών με μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης τους. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κατά τη διαδικασία της ανίχνευσης του ιού δεν λαμβάνει χώρα διείσδυση του ιού στο κύτταρο, αλλά μόνο η επαφή του ιού με το κύτταρο και η πρόσδεση του ιού σε αυτή.

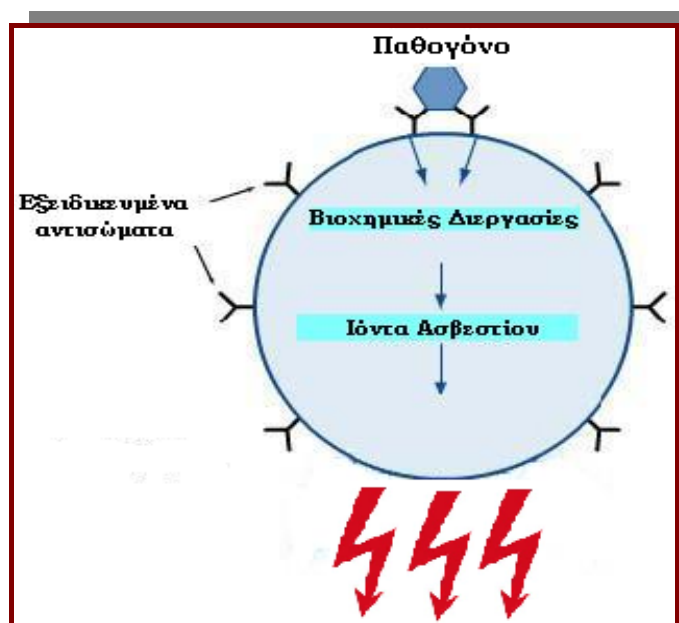
Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες συγκαταλέγονται στα ιδιαίτερα ευαίσθητα διαγνωστικά συστήματα, τα οποία πιθανόν να έχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης και ενός μοναδικού μορίου του υπό εξέταση παράγοντα (Kintzios, S., 2007). Βασικό μειονέκτημα όμως όλων των κυτταρικών αισθητήρων είναι ακριβώς η ιδιότητα τους να αντιδρούν με μεγάλο αριθμό μορίων, συνεπώς η εξειδίκευση τους είναι χαμηλή (Riska et al., 1999; Van der Lelie et al., 1997).

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται ο τρόπος με τον οποίο βελτιώθηκε η εξειδίκευση των βιοαισθητήρων BERA με την εισαγωγή των κατάλληλων αντισωμάτων στην επιφάνεια της μεμβράνης των κυττάρων του βιοαισθητήρα, καθιστώντας το νέο «τροποποιημένο» κύτταρο ιδιαίτερα ευαίσθητο στην παρουσία του ομόλογου φυτικού ιού (Moschopoulou et al., 2008).

Για την εισαγωγή των αντισωμάτων των ιών χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροπόρωσης σε υψηλή πυκνότητα στην επιφάνεια της μεμβράνης των κυττάρων, έχοντας σαν αποτέλεσμα ένα κύτταρο το οποίο παρουσιάζει εξειδικευμένη απόκριση στην παρουσία ομόλογων ιών σε σχέση με τα αντισώματα τα οποία φέρονται στην μεμβράνη του.

Η βασική υπόθεση σε όλες τις εφαρμογές που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή είναι ότι, κατά η πρόσδεση των ιών στα ομόλογα αντισώματα της μεμβράνης των τροποποιημένων κυττάρων προκαλείται

συγκεκριμένη μεταβολή στην δομή της, η οποία μεταβολή μεταφράζεται σε αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης (Σχήμα 13).



**Σχήμα 13.** Σχηματική αναπαράσταση ενός «τροποποιημένου» κυτάρου Vero, στην επιφάνεια της μεμβράνης του οποίου βρίσκονται τα εξειδικευμένα αντισώματα. Η επαφή και πρόσδεση του ιού με αυτά προκαλεί μέσα από μια σειρά βιοχημικών διεργασιών μεταβολή του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης

## 7.2 Ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς

Ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (*Cucumber Mosaic Virus, CMV*) προσβάλλει μεγάλο αριθμό φυτών. Ανήκει στο γένος *Cucumovirus* της οικογένειας *Bromoviridae*. Είναι ευρέως διαδεδομένος ιός και με μεγάλο αριθμό ξενιστών, περισσότερους από 1000, οι οποίοι ανήκουν σε περίπου 85 οικογένειες φυτικών ειδών. Πιθανόν δε από τους μέχρι σήμερα γνωστούς ιούς που προσβάλλουν φυτικά είδη, ο CMV να δύναται να προσβάλλει τα περισσότερα είδη.

Σε σχέση με τους υπόλοιπους ιούς του γένους στο οποίο ανήκει έχει το μεγαλύτερο εύρος ξενιστών, μεταξύ των οποίων και πολλά ζιζάνια. Ως προς τον τρόπο μετάδοσης του ιού, μεταδίδεται μηχανικά στο εργαστήριο, ενώ στη φύση με τη βοήθεια αφίδων, καθώς και με το σπόρο ορισμένων ξενιστών. Οι απομονώσεις του CMV χωρίζονται σε δύο

υποομάδες (subgroup I και II) ανάλογα με τις ορολογικές ιδιότητες και την ταυτότητα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Οι Φωτογραφίες 3 και 4 μας δείχνουν μια άποψη της μορφής των συμπτωμάτων του ιού ύστερα από μόλυνση φυτών τομάτας.



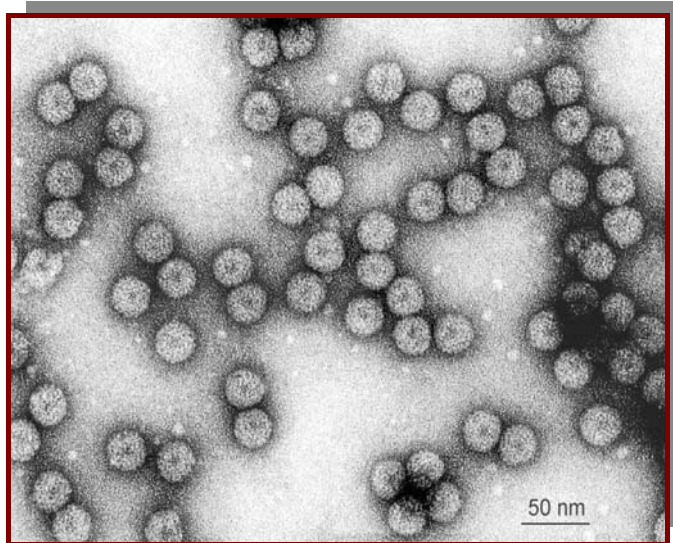
**Φωτογραφία 3.** Προσβολή φυτών τομάτας από τον CMV. Στο πάνω μέρος το προσβεβλημένο φύλλο είναι εμφανώς καταπονημένο από τη δράση του ιού, ενώ στο κάτω μέρος βλέπουμε συγκριτικά την κατάσταση ενός υγιούς φύλλου.  
Πηγή: Μπενάκειο  
Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο,  
Εργαστήριο Ιολογίας



**Φωτογραφία 4.** Προσβολή φυτών τομάτας από τον CMV. Συμπτώματα της προσβολής από τον CMV σε καρπούς τομάτας. Στο δεξιό μέρος καρπός από προσβεβλημένο φυτό, ενώ στο αριστερό μέρος βλέπουμε συγκριτικά τον καρπό ενός υγιούς φυτού.  
Πηγή: Μπενάκειο  
Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο,  
Εργαστήριο Ιολογίας

Ο CMV είναι ένας ιός μονής αλυσίδας RNA . Το συνολικό γονιδίωμα του έχει μέγεθος 8.621 kb και χωρίζεται σε τρία τμήματα, ήτοι ένα 3.389 kb, το δεύτερο 3,035 kb και το μικρότερο 2.197 kb. Το πρωτεϊνικό καψίδιο του ιού, το οποίο περιβάλλει το RNA έχει ως δομικό στοιχείο μία

και μόνη πρωτεΐνη, η οποία επαναλαμβάνεται (ICTVdB Management., 2006).



**Φωτογραφία 5.** Άποψη των σωματιδίων του CMV με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

Πηγή:

<http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/Images/Milne/cucumsv.htm>

### 7.3 Ο ιός του κροταλισμού του καπνού

Ο ιός του κροταλισμού του καπνού (*Tobacco rattle virus*, TRV) ανήκει στην οικογένεια *Tobravirus* και έχει ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον (MacFarlane, S.A., 1999). Είναι ένας είναι ένας διμερής ιός, ευρέως διαδεδομένος, ικανός να μολύνει πάνω από 100 είδη φυτών στη φύση και περισσότερα από 400 είδη υπό εργαστηριακές συνθήκες. Πολλοί ορότυποι του TRV είναι γνωστοί. Διαφέρουν στον τύπο και τη ένταση των συμπτωμάτων που προκαλούν (Visser et al., 1999).

Ο TRV χρειάζεται δύο σωματίδια για την παραγωγή νέων ιοσωματίων. Και τα δύο μοιάζουν με κυλινδρικές ράβδους, που διαφέρουν μόνο στο μήκος, όπως φαίνεται και από την Φωτογραφία 6. Τα μικρότερα σωματίδια αποτελούνται από την ίδια πρωτεϊνική δομική μονάδα. Το μήκος του μολυσματικού σωματιδίου είναι 191nm και η διάμετρος του 25,6nm. Το βήμα της έλικας έχει μήκος 2,55nm με 76 πρωτεϊνικές υπομονάδες σε τρεις στροφές.

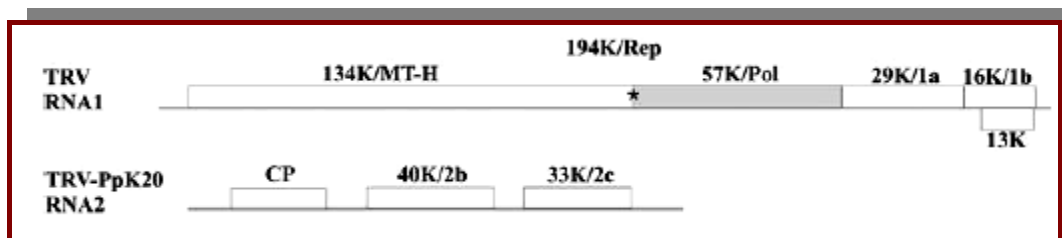


**Φωτογραφία 6.** Άποψη των σωματιδίων του TRV με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

Πηγή: ICTVdB Management (2006).  
00.072.0.01.004. Tobacco rattle virus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4.

Ο TRV αρχικά συναντάται σε μικροοργανισμούς όπως κάποια είδη νηματώδων, αλλά είναι δυνατή η μετάδοση του ιού με σπόρους σε κάποια φυτικά είδη (π.χ. τομάτα) (Sudarshama, M.R. and Berger, P.H., 1998).

Το γονιδίωμα του ιού αποτελείται από δύο τμήματα μονής αλυσίδας RNA (ssRNA), RNA1 και RNA2 (Σχήμα 14). Γενετική παραλλακτικότητα εμφανίζει το RNA2, ενώ το RNA1 διατηρείται σε διάφορες απομονώσεις του ιού. Το RNA2 κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη (CP), καθώς και ένα από τα τρία γονίδια που σχετίζονται με την μετάδοση του ιού με νηματώδεις (Vassilakos et al., 2001).



**Σχήμα 14.** Οργάνωση του γονιδιώματος του TRV (RNA1 και TRV-PpK20 RNA2). (Vassilakos et al., 2008)

Τα συμπτώματα από τη μόλυνση του ιού είναι χαρακτηριστικά, εικόνα των οποίων φαίνεται στις Φωτογραφίες 7<sup>A</sup> και 7<sup>B</sup>.



**Φωτογραφία 7.** Συμπτώματα του TRV σε φύλλα φυτού καπνού (αριστερή εικόνα, 7A) και άνθους πετούνιας (δεξιά εικόνα, 7B). Στο φυτό καπνού παρατηρούνται εκτεταμένες νεκρώσεις και καρούλιασμα στα φύλλα, συρρίκνωση της κορυφής και τέλος μειωμένη ανάπτυξη. Αντίστοιχα το άνθος της πετούνιας εμφανίζει ποικιλόχρωση στα πέταλα. Πηγή: Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Εργαστήριο Ιολογίας

Στους φυτικούς οργανισμούς ο TRV εισέρχεται από τη ρίζα μέσω των φορέων νηματώδων που προαναφέραμε, οι οποίοι (φορείς) τρέφονται αρχικά με επιδερμικά κύτταρα της ρίζας. Οι νηματώδεις οι οποίοι αποτελούν τους φορείς του ιού είναι του γένους *Trichodorus* και *Paratrachodorus*. Η διαδικασία μετάδοσης του ιού χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό εξειδίκευσης σε σχέση με το είδος του νηματώδους και του ιού ή απομονώσεων του ιού (Ploeg et al., 1992; Vassilakos et al., 2001).

Αντισώματα του TRV είναι διαθέσιμα στο εμπόριο, συνεπώς ο TRV μπορεί να ανιχνευθεί με τη χρήση της μεθόδου ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Ως πιο ευαίσθητη μέθοδος χρησιμοποιείται η μέθοδος της αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR), η οποία αναπτύχθηκε αρχικά το 1992, με τη δυνατότητα να ανιχνευθεί το RNA του ιού σε δείγμα 10 ng ιστού προερχομένου από μολυσμένο φυτό (Robinson, D.J., 1992).

Σε έρευνες μεγάλης κλίμακας σήμερα χρησιμοποιείται μία ταχύτερη, RT-PCR μέθοδος για την ανίχνευση TRV σε βολβούς και φύλλα γεωμήλων (Roberts et al., 2000). Πιο πρόσφατα, RT-PCR

χρησιμοποιήθηκε για τη συνδυασμένη ανίχνευση τριχοειδών νηματωδών και RNA του TRV (Holeva et al., 2006).

Από μία πρακτικότερη σκοπιά, αυτό που επιδιώκεται συχνά στην έρευνα είναι η διάθεση μιας κατάλληλης ταχείας μεθόδου, για την ανίχνευση ενός μορίου στόχου που είναι «γνωστός ή υποτίθεται πως υπάρχει», παρά να προσπαθεί να διευκρινίσει τη δομή ενός απολύτως άγνωστου παθογόνου παράγοντα (Bos, L., 1999).

#### **7.4 Ο ιός Y της πατάτας**

Ο ιός Y της πατάτας (*Potyvirus*, PVY) μολύνει είδη της οικογένειας *Solanaceae*, συμπεριλαμβανομένης της πατάτας, του καπνού, πιπεριά, ντομάτα και τα ζιζάνια της οικογένειας των σολανιδών. Έχει εντοπιστεί σε όλο τον κόσμο και αποτελεί το πιο επιζήμιο παθογόνο μεταξύ των ιών που προσβάλλουν την πατάτα (Valkonen et al, 2007). Είναι επίσης διαδεδομένος σε καλλιέργειες τομάτας και προκαλεί σοβαρές απώλειες στην παραγωγή (Aramburu et al, 2006; Rosner et al, 2000).

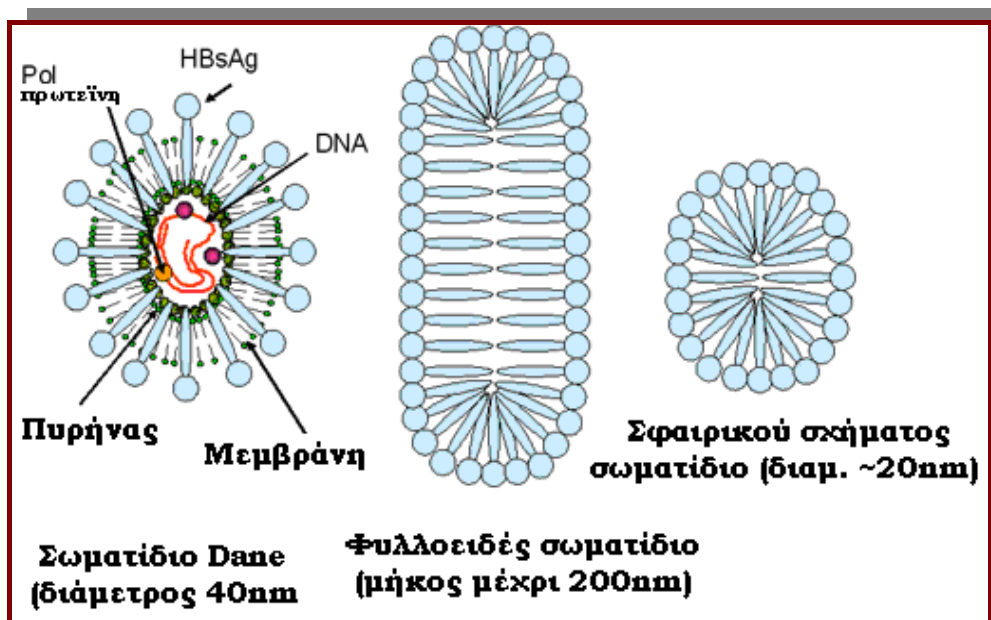
#### **7.5 Ο ιός B της Ηπατίτιδας**

Ο ιός B ηπατίτιδας (HBV) είναι ένας από τους πιο διαδεδομένους ιούς, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες και αποτελεί σημαντική αιτία πρόκλησης οξείας και χρόνιας μόλυνσης στο συκώτι. Το αποτέλεσμα της μόλυνσης με τον ιό είναι ένα ευρύ φάσμα ηπατικών παθήσεων και συγκεκριμένα από υποκλινικές προσβολές έως οξεία και θανατηφόρο ηπατίτιδα (Κουτής, X., 1998). Αποτελεί τον πιο μικρό γνωστό DNA ιό (μέγεθος 42nm). Η μορφή των ιοσωματίων του HBV απεικονίζεται στο Σχήμα 15 και στη Φωτογραφία 8.

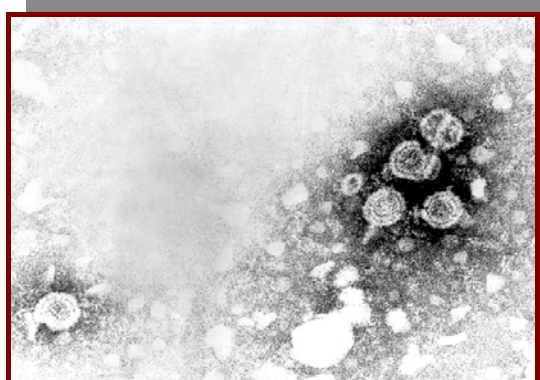
Κατά την είσοδο του ιού στον οργανισμό ο ξενιστής ανταποκρίνεται με δύο τύπους ανοσίας, ήτοι με την μη ειδική ή εγγενή ανοσία, η οποία περιλαμβάνει έκκριση κυττοκινών, ενεργοποίηση κυττάρων φονέων, Τ-λεμφοκυττάρων, δενδριτικών κυττάρων, μακροφάγων και ενδοηπατικών



ανοσιακών κυττάρων και την ειδική ή επίκτητη ανοσία με την οποία επιτυγχάνεται ο έλεγχος του αναδιπλασιασμού του ιού και η αποφυγή επιμόλυνσης (Χατζηγιάννης, Σ., 2006).



**Σχήμα 15.** Σχηματική απεικόνιση σωματιδίων Dane και μη ολοκληρωμένων σωματιδία του HBV, τα οποία συναντώνται σε ορό ασθενούς (Beck et al., 2007; Heermann et al., 1987; Hunt, D.M., 2007)<sup>2</sup>



**Φωτογραφία 8.** Απεικόνιση των ισοσωματιών του ιού, γνωστά και ως σωματίδια Dane, με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Hunt, D.M., 2007).<sup>1</sup>

Προσπάθειες χειρισμού χρόνιων μολύνσεων δεν έχουν ιδιαίτερη επιτυχία. Η θεραπεία με Α ιντερφερόνη έχει κάποια θετικά αποτελέσματα μειώνοντας το φορτίο του ιού.

<sup>2</sup> Για την αναπαραγωγή των εικόνων δόθηκε γραπτή άδεια από τον συγγραφέα Hunt, D.M., University of South Carolina, School of Medicine

Στην πορεία ταυτοποίησης του HBV πρώτο σταθμό αποτέλεσε η ανακάλυψη ενός αντισώματος, το οποίο μπορούσε να αντιδρά με ένα αντιγόνο, το οποίο ονομάστηκε αυστραλιανό αντιγόνο.

Από έρευνες που ακολούθησαν στη συνέχεια έγινε κατανοητό ότι το αυστραλιανό αντιγόνο ήταν ένας ιός ο οποίος προκαλούσε ηπατίτιδα, χωρίς να μπορεί να γίνει διαχωρισμός αν πρόκειται για ηπατίτιδα Α (HAV) ή Β.

Μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις κατά την πορεία των ερευνών ήταν ότι ο HBV που προσβάλλει τον άνθρωπο, είναι το πρωτότυπο τυπικό μέλος μιας οικογένειας ιών, η οποία αναφέρεται ως *Hepadnaviridae*. Συγγενικοί ιοί ως προς τη δομή του γονιδιώματος, αλλά όχι ως προς την αλληλουχία, συναντώνται στις πάπιες και τις χήνες (Mason et al., 1980; Sprengel et al., 1988). Ο ιός Β της ηπατίτιδας των χηνών (DHBV) χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως μοντέλο για την μελέτη του τρόπου αναδιπλασιασμού των ηπατικών ιών.

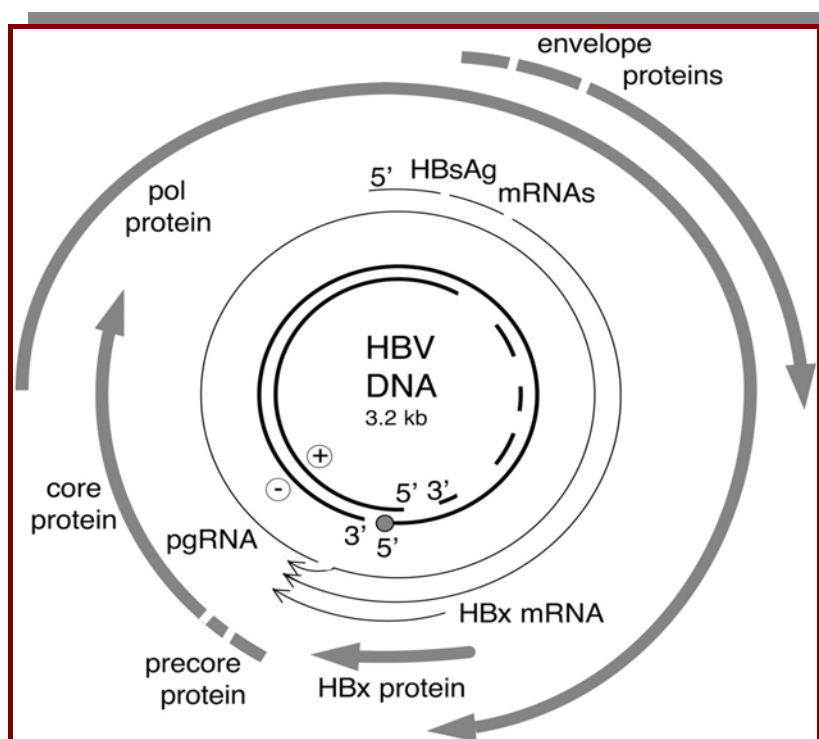
Τον κύριο στόχο του HBV αποτελούν τα ηπατοκύτταρα, τα οποία αποτελούν την πλειοψηφία των κυττάρων στο συκώτι. Μέχρι σήμερα γνωρίζουμε ότι αποτελούν το μοναδικό είδος κυττάρων στα οποία λαμβάνει χώρα ο αναδιπλασιασμός του ιού.

### **7.5.1 Δομή του γονιδιώματος του HBV**

Το γονιδίωμα του HBV αποτελείται από κυκλικό DNA, αλλά όχι απόλυτα διπλής έλικας, δηλαδή η έλικα είναι διπλή μόνο σε ένα τμήμα του μήκους του, σημείο διαφοροποίησης του σε σχέση με άλλους καρκινογόνους ρετροϊούς που αποτελούνται από RNA. Στο ένα άκρο του συνδέεται με την DNA πολυμεράση. Το μέγεθος του γονιδιώματος είναι ~3200 νουκλεοτίδια, μικρό συγκριτικά με άλλους παρασιτικούς ιούς ζώων. Η μικρότερη από τις δύο αλυσίδες DNA έχει μήκος μικρότερο ~1700 νουκλεοτίδια (Kay et al., 2007).

Τέσσερα είναι τα γονίδια που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του HBV, τα C, X, P και S (Σχήμα 16). Επειδή η αλληλουχία του DNA αντιγράφεται σε δύο μόρια RNA, το ένα μόριο αρχίζει τη σύνθεση των

πρωτεϊνών που αντιστοιχούν στα τρία πρώτα γονίδια, ενώ το άλλο μόριο RNA την σύνθεση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο S.



**Σχήμα 16.** Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης του γονιδιώματος του HBV. Ο εσωτερικός κύκλος αναπαριστά το γονιδιωματικό, το οποίο βρίσκεται σε ισοβάτια στο κυτόπλασμα μολυσμένων κυττάρων. Η διακεκομμένη γραμμή συμβολίζει την περιοχή του γονιδιώματος της οποίας δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμη η σύνθεση. Οι λεπτές γραμμές που καταλήγουν σε βέλη αναπαριστούν τμήματα όπως επιφανειακά αντιγόνα, πολυμεράση και πρωτεΐνες HBx. Οι λεπτές γραμμές αναπαριστούν RNAs του ιού (Bouchard et al., 2004)

Το γονίδιο C κωδικοποιεί το πυρηνικό αντιγόνο HBcAg, το γονίδιο P την DNA πολυμεράση, η οποία επιτρέπει στον ιό να κάνει νέα αντίγραφα του γενετικού του υλικού, το γονίδιο X κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στα ηπατικά κύτταρα αλλά δεν γνωρίζουμε την λειτουργία της, και το γονίδιο S το επιφανειακό αντιγόνο του ιού HBsAg, το οποίο αποτελεί δείκτη της ιογενούς λοίμωξης.

Ως προς το γονίδιο S, αυτό διαιρείται σε τρία τμήματα (κωδικόνια) pre-S1, pre-S2, and S. Οι πρωτεΐνες οι οποίες κωδικοποιούνται από τα

τρία αυτά γονίδια αποτελούν στοιχεία του πρωτεϊνικού περιβλήματος του ιού.

Η πρωτεΐνη S από μόνη της ή σε συνδυασμό με τις άλλες δύο μπορεί να σχηματίζει κατασκευές είτε φυλλοειδείς είτε σφαιρικές «επιφανειακού αντιγόνου» σε αριθμούς πολύ μεγαλύτερους από αυτούς των ιοσωματίων (virions) (Beck, J. and Nassal, M., 2007; Heermann et al., 1987).

Αναφορικά με την πρωτεΐνη HBx που κωδικοποιείται από το γονίδιο X, ο βασικότερος ρόλος της πιθανόν να είναι η ρύθμιση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου, στο κυτταρόπλασμα, η οποία φαίνεται ότι είναι σημαντική για την διαδικασία της μόλυνσης (McClain et al., 2007). Πιθανόν η παρουσία της αποτελεί έναυσμα για την έναρξη των διαδικασιών που σχετίζονται με το ρόλο του ασβεστίου αλλά και κάποιων ενζύμων που εμπλέκονται στην εν λόγω διαδικασία. Η πρωτεΐνη HBx δεν εκφράζεται στους ηπατικούς ιούς που προσβάλλουν τα πτηνά (Bouchard et al., 2003).

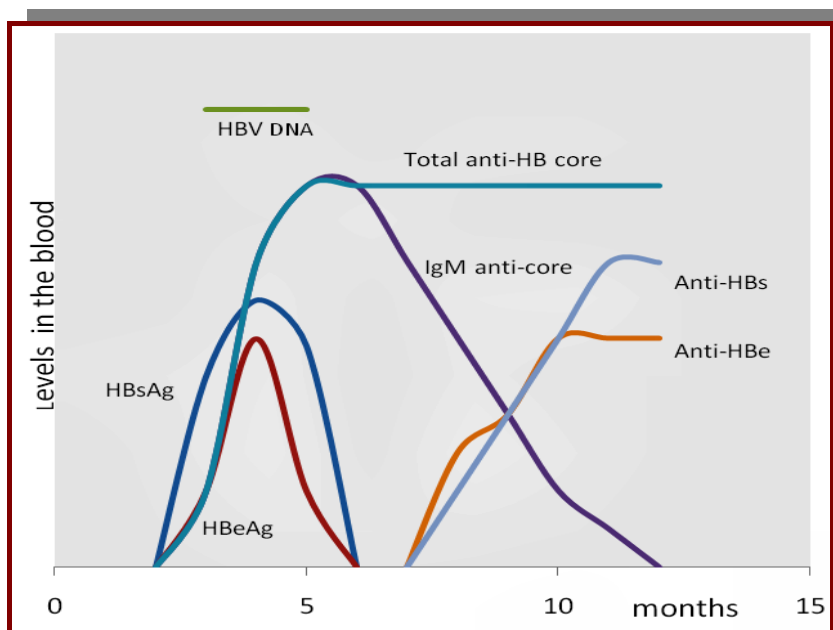
### **7.5.2 Πορεία Ορολογικών Φαινομένων κατά την Οξεία Λοίμωξη από HBV**

Η περίοδος επώασης του HBV ποικίλλει από 1 έως 6 μήνες. Οι βασικοί δείκτες της παραγωγής αντιγράφων του ιού στον ορό, περιλαμβάνουν τις S1 πρωτεΐνες του αντιγόνου επιφάνειας (HBsAg) και ενός διαλυτού αντιγόνου, του αντιγόνου e της ηπατίτιδας B (HBeAg), το οποίο εκκρίνεται από τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα (Zuckerman, A.J. (1996).

Το HBsAg εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και χρησιμοποιείται κυρίως για την επιβεβαίωση της.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων φάσεων της μόλυνσης το HBsAg δεν είναι πάντα «παρόν» ή δεν είναι ανιχνεύσιμο στα επόμενα στάδια, δεδομένου ότι σε πολλές περιπτώσεις εάν ο φορέας είναι σε θέση να καθαρίσει τη μόλυνση, το HBsAg δεν θα είναι ανιχνεύσιμο. Σε αυτήν την φάση τα αντισώματα anti-HBs και anti-HBc θα είναι ακόμα παρόντα (Διάγραμμα 2).

Λόγω της πολυπλοκότητας της διαδικασίας μόλυνσης η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του ελέγχου, δεν είναι πάντα εύκολη διαδικασία. Παραδείγματος χάριν, ένα άτομο αρνητικό για HBsAg και θετικό για anti-HBs μπορεί να είχε καθαρίσει μια προηγούμενη μόλυνση ή να έχει πραγματοποιηθεί ένας εμβολιασμός (Bonino et al., 1987).

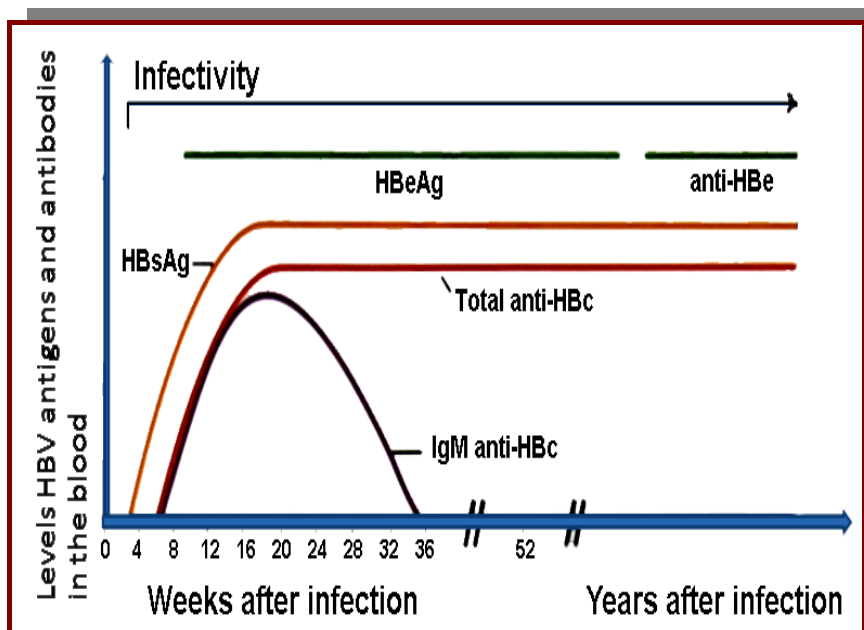


**Διάγραμμα 2.** Απεικόνιση της πορείας των ορολογικών φαινομένων κατά τη διάρκεια οξείας μόλυνσης, με πρώιμη κάθαρση του HBsAg (Collier et al., 1998; Κουτής, Χ. (1998)<sup>3</sup>

Στο Διάγραμμα 3 απεικονίζεται η πορεία των ορολογικών φαινομένων, κατά τη διάρκεια χρόνιας μόλυνσης από τον HBV, με πιθανή μείωση του HBsAg και μετατροπή σε anti-HBe.

---

<sup>3</sup> Η εν λόγω διαγραμματική απεικόνιση έχει τη συγκεκριμένη μορφή στο σύνολο των σχετικών επιστημονικών εργασιών. Η αναγραφή των όρων είναι στα αγγλικά διότι δεν προβλέπεται από την άδεια χρήσης της εικόνας καμία μετατροπή. Την ίδια απεικόνιση χρησιμοποιεί και ο Κουτής, Χ. (1998) στο βιβλίο «Ηπατίτιδα Β και Πρωτοπαθής Καρκίνος του Ήπατος», Εκδόσεις “ΕΛΛΗΝ”, ISBN 960-286-321-8, σελ. 17-32 ([http://en.wikipedia.org/wiki/File:HBV\\_serum\\_markers.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:HBV_serum_markers.png))



**Διάγραμμα 3.** Απεικόνιση της πορείας των ορολογικών φαινομένων, κατά τη διάρκεια χρόνιας μόλυνσης από τον HBV, με πιθανή εξαφάνιση του HBsAg και μετατροπή σε anti-HBe (Bonino et al., 1987; Collier et al., 1998; Κουτής, Χ., 1998)<sup>4</sup>

Όπως θα αναφέρουμε στη συνέχεια μέσω των πληροφοριών που αντλούμε από τη χρήση των βιοαισθητήρων BERA, μπορούμε να σχηματίσουμε μια εικόνα για το βαθμό μολυσματικότητας του υπό εξέταση ατόμου, βασιζόμενοι στην παρουσία ή μη των ορολογικών δεικτών όπως αυτοί εμφανίζονται κατά τις αναλύσεις στα δείγματα των ασθενών. Οι συνδυασμοί τους μας δείχνουν μια σαφή εικόνα της κατάστασης του ασθενούς, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1.

Το επιφανειακό αντιγόνο (HBsAg) του ιού της ηπατίτιδας Β στον ορό των ασθενών, αποτελεί πολύ καλό δείκτη της ιογενούς λοίμωξης, αλλά και του ποσοστού χρόνιων φορέων στον πληθυσμό. Ακόμη η μελέτη των

<sup>4</sup> Η εν λόγω διαγραμματική απεικόνιση έχει τη συγκεκριμένη μορφή στο σύνολο των σχετικών επιστημονικών εργασιών. Η αναγραφή των όρων είναι στα αγγλικά διότι δεν προβλέπεται από την άδεια χρήσης της εικόνας καμία μετατροπή. Την ίδια απεικόνιση χρησιμοποιεί και ο Κουτής, Χ. (1998) στο βιβλίο «Ηπατίτιδα Β και Πρωτοπαθής Καρκίνος του Ήπατος», Εκδόσεις “ΕΛΛΗΝ”, ISBN 960-286-321-8, σελ. 17-32 ([http://en.wikipedia.org/wiki/File:Chronic\\_HBV\\_v2.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Chronic_HBV_v2.png))

ποικιλιών (υπότυποι) του εν λόγω αντιγόνου, μας δίνει στοιχεία για την μετανάστευση των πληθυσμών.

HBsAg	HBeAg	anti-HBe	anti-HBc	anti-HBs	Κατάσταση	Μολυσματικό- τητα Αίματος
+	+	-	-	-	Περίοδος επώασης ή οξεία Ηπατίτιδα σε αρχική φάση	Υψηλή
+	+	-	+	-	Οξεία Ηπατίτιδα Β ή κατάσταση φορέα	Υψηλή
+	-	+	+	-	Οξεία Ηπατίτιδα σε μεταγενέστερη φάση ή χρόνια κατάσταση	Χαμηλή Υψηλή
-	-	+	+	+	Ανάρρωση από οξεία Ηπατίτιδα Β	Όχι
-	-	-	+	+	Πλήρης ανάρρωση από προηγούμενη λοίμωξη οξείας Ηπατίτιδας Β	Όχι
-	-	-	-	+	Ανοσοποίηση χωρίς λοίμωξη επαναληπτική έκθεση στον HBV ή πλήρης ανάρρωση από προηγούμενη λοίμωξη	Όχι
-	-	-	+	-	Πλήρης ή μερική ανάρρωση, λοίμωξη	;

**Πίνακας 1.** Απεικόνιση της συνολικής παρουσίας των ορολογικών δεικτών σε διάφορους συνδυασμούς σε υπό εξέταση δείγματα, καθώς και του επιπέδου μολυσματικότητας του αίματος του ασθενούς (Κουτής, X., 1998)

Αντίστοιχα το αντιγόνο HBeAg αποτελεί δείκτη της μολυσματικότητας του φορέα. Έχει υψηλό επιπολασμό σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα ή κίρρωση και συνδέεται απόλυτα με αυξημένο βαθμό διαρκούς λοίμωξης με τον ιό HBV.

Επίσης η ανίχνευση του πυρηνικού αντισώματος anti-HBc αποτελεί ένδειξη ότι το άτομο βρίσκεται σε διαδικασία αναρρώσεως από χρόνια ασυμπτωματική κατάσταση φορέα, ενώ αποτελεί και δείκτη αναδιπλασιασμού του HBV.

Η γρήγορη ανίχνευση των ιών της ηπατίτιδας είναι ακόμα ένα θέμα το οποίο εμπεριέχει πρόκληση για τους ερευνητές που ασχολούνται με την

ανάπτυξη των διαγνωστικών συστημάτων. Οι προκλήσεις εντοπίζονται σε θέματα όπως: η αυξανόμενη ζήτηση, δυσκολίες στη στρατολόγηση ενός κατάλληλα ειδικευμένων εργαστηριακού δυναμικού, καθώς και προβλημάτων βελτίωσης των χρόνων που απαιτούνται για την ολοκλήρωση των διαδικασιών ανίχνευσης.

Πιο συγκεκριμένα, τα αυτοματοποιημένα ανοσοχημικά συστήματα χαρακτηρίζονται από υψηλούς ρυθμούς απόδοσης καθώς και επιλεκτικότητα, με το μειονέκτημα όμως ότι συχνά απαιτείται η ανάγκη για μεγαλύτερη ευαισθησία, να συμβιβαστεί με μικρότερες ταχύτητες, με αποτέλεσμα ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η διαδικασία ελέγχου να κυμαίνεται από 2 έως 26 ημέρες (Kwon et al., 2006).

Οι τεχνολογίες νουκλεϊνικού οξέος είναι αρκετά συγκεκριμένες και ευαίσθητες, αλλά απαιτούν χρόνο και επένδυση στην εργαστηριακή υποδομή αλλά και στην κατάρτιση προσωπικού (Candotti et al., 2004). Τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει μια γρήγορη αύξηση στον αριθμό διαγνωστικών εφαρμογών για HBV βασισμένων στους βιοαισθητήρες.

Διάφορες τεχνολογίες έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτόν το λόγο. Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες ανιχνεύουν την τάση σε ακολουθίες DNA σχετικές με τον HBV (Erdem et al., 2005; Mandog et al., 2007; Meric et al., 2002; Ye et al., 2003), ενώ η ανίχνευση εντοπισμένης ακολουθίας DNA έχει επιτευχθεί με την χρήση πιεζοηλεκτρικών αισθητήρων (Li et al., 2007; Ly et al., 2009; Yao et al., 2008; Zhou et al., 2002) και τη φασματοσκοπία εμπέδησης (Hessen et al., 2008). Η ανίχνευση των αντισωμάτων HBV στον ορό έχει διευκολυνθεί με τη χρήση της μεθόδου Surface Plasmon Resonance (SPR) (Chung et al., 2005) και ορολογικές μεθόδους φθορισμού (Zhang et al., 2007).

Αντιπροσωπεύοντας την πιο προηγμένη και πολύπλοκη τεχνολογία βιοαισθητήρων, οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν την αντίδραση ολόκληρων κυττάρων, όταν αυτά έρθουν σε επαφή με τις υπό εξέταση ενώσεις, όπως η κατανάλωση οξυγόνου, το χημικό ή ηλεκτρικό δυναμικό επιφάνειας, η κινητικότητα ή η γονιδιακή έκφραση (Kintzios et al., 2007).



## 7.6 Ο ιός C της ηπατίτιδας

Ο ιός C της ηπατίτιδας (HCV) έχει μολύνει μέχρι σήμερα περισσότερους από 350 εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο (στοιχεία 2003) (Giannini et al., 2003). Η πλειοψηφία των πασχόντων από οξεία ηπατίτιδα C αναπτύσσει χρόνια μόλυνση από τον HCV. Τελικά καταλήγει σε κίρρωση και δυσλειτουργία του ήπατος ή εκδήλωση καρκίνου στο ήπαρ και τέλος θάνατο του ασθενούς.

Ο HCV ανακαλύφθηκε πριν από 20 χρόνια και συγκεκριμένα το 1989. Εν τούτοις η γνώση μας είναι περιορισμένη, ως προς την βιολογία του ιού, λόγω δυσκολιών μελέτης του σε καλλιέργειες κυττάρων, αλλά και διότι η μελέτη της διαδικασίας μόλυνσης των οργανισμών από τον ιό, πραγματοποιήθηκε με βάση κάποια μοντέλα που στηρίζονται σε πειραματόζωα (Choo et al., 1989).

Κατά το παρελθόν έλαβαν χώρα αρκετές ερευνητικές προσπάθειες με στόχο τον προσδιορισμό της εξέλιξης του ιού μετά την μόλυνση. Στην πλειοψηφία τους οι μελέτες αυτές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι με την πάροδο του χρόνου η ασθένεια εξελίσσεται σε κίρρωση του ήπατος και ηπατικό καρκίνωμα και τέλος θάνατο του ασθενούς.

Επίσης σημαντικό χαρακτηριστικό αναφορικά με την διαδικασία της μόλυνσης από τον ιό, αποτελεί και το γεγονός ότι έχει συσχετιστεί και με μολύνσεις από τον ιό B της ηπατίτιδας ή τον *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). Το αποτέλεσμα αυτών των ευρημάτων δεν βοήθησε ιδιαίτερα στον ακριβή προσδιορισμό και αξιολόγηση των επιπτώσεων της μόλυνσης από τον HCV στον οργανισμό.

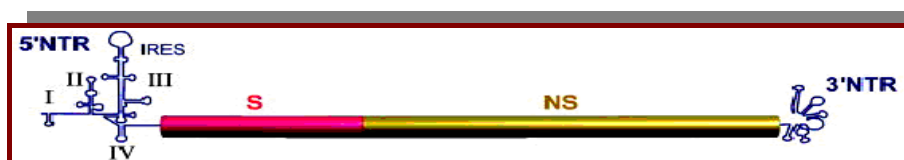
Σε άλλες περιπτώσεις έχει λεχθεί ότι το αποτέλεσμα της εξέλιξης της νόσου ποικίλει και δεν οφείλεται σε αυτή ο θάνατος του ατόμου που νοσεί, αλλά η πλειοψηφία των ατόμων που πεθαίνουν, είναι αποτέλεσμα των συνθηκών που ζει το άτομο ή η έλλειψη ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης. Οι όποιες διαφωνίες για τις επιπτώσεις της ασθένειας στον άνθρωπο προέρχονται περισσότερο από την έλλειψη δεδομένων, αλλά και τη χρονική διάρκεια των σχετικών ερευνών (Di Bisceglie et al., 1991; Seeff et al., 2002).

Η χρονική διάρκεια αποτελεί σημαντικό στοιχείο για την μελέτη της συγκεκριμένης ασθένειας, αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι η εκδήλωση των συμπτωμάτων κίρρωσης του ήπατος συχνά λαμβάνει χώρα δύο δεκαετίες μετά την μόλυνση από τον ιό. Συνεπώς θα πρέπει η μελέτη της πορείας της ασθένειας να διαρκεί περισσότερο από 20 χρόνια και να περιλαμβάνει διαφορετικές ομάδες πληθυσμού ((Di Bisceglie et al., 1991; Mattson et al., 1993).

Η μετάβαση από την οξεία σε χρόνια ηπατίτιδα χαρακτηρίζεται από έντονη παρουσία αμινοτρανσφερασών στον οργανισμό. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων αποτυγχάνεται η κάθαρση από την αντιγοναιμία. Η εν λόγω συμπεριφορά του ιού σε συνδυασμό με τα προαναφερθέντα ως προς τη χρονική διάρκεια της έρευνας επηρεάζουν και το αποτέλεσμα των μελετών ((Di Bisceglie et al., 1991; Koretz et al., 1993; Mattson et al., 1993; Tremolada et al., 1992).

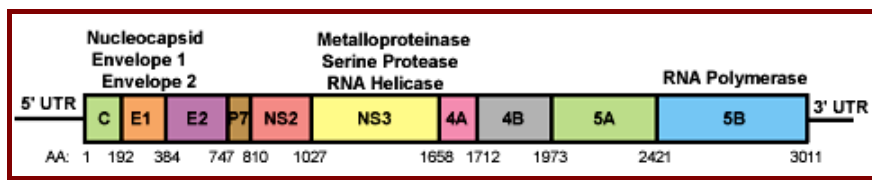
Η ανακάλυψη αρχικά, η μελέτη, η διάγνωση και οι επιλεκθέντες τρόποι χειρισμού της νόσου, στηρίχθηκαν στο μοντέλο του χιμπαζήδων το οποίο χρησιμοποιούνταν την δεκαετία του 1980 για την καλλιέργεια και εντοπισμό του μολυσματικού αιτίου στην περίπτωση των RNA ιών (Choo et al., 1989). Τα μεγάλα άλματα στην έρευνα της βιολογίας του ιού επήλθαν με την ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας, τα οποία έδωσαν μεγαλύτερη ώθηση σε σχέση με τις κλασσικού τύπου καλλιέργειες κυττάρων και των κλασσικών μεθόδων ιολογίας.

Η δυνατότητα μέσω της RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) πολλαπλασιασμού τμήματος του γονιδιώματος του ιού (Σχήμα 17), κατέταξε τον HCV στο γένος των *Pestivirus*, γεγονός το οποίο οδήγησε και στην παρασκευή του πρώτου διαγνωστικού τεστ.



**Σχήμα 17.** Σχηματική απεικόνιση της δομής του γονιδιώματος του HCV (Penin et al. (2004).

Μια απλούστερη απεικόνιση έκδοση ήταν εκείνη που πρωτοπαρουσιάστηκε το 1989 (Σχήμα 18).



**Σχήμα 18.** Απλουστευμένη απεικόνιση της δομής του γονιδιώματος του HCV όπως πρωτοπαρουσιάστηκε το 1989 (Choo et al., 1989)

Όπως προαναφέρθηκε βασικό χαρακτηριστικό της ηπατίτιδας C είναι το γεγονός ότι, αποτελεί μια σιωπηρή ασθένεια και μόνο ύστερα από τη δημιουργία του πρώτου τεστ, έγινε δυνατή η έγκαιρη διάγνωση της.

Ουσιαστικά όπως αναφέρεται συχνά στη βιβλιογραφία η διάγνωση της ασθένειας βασίζεται περισσότερο στην υπόθεση ότι κάποιος έχει μολυνθεί από τον ιό, συνυπολογίζοντας το δυναμικό έκθεσης του στον ιό, παρά σε κάποια εργαστηριακά δεδομένα. Η μετάβαση δε από την οξεία στη χρόνια ηπατίτιδα C σχεδόν ποτέ δεν συνοδεύεται από συμπτώματα. Δυστυχώς πολλές από τις περιπτώσεις των ασθενών ανήκαν στην κατηγορία εκείνη που συχνά ήταν απαραίτητη η μετάγγιση αίματος.

Μέχρι την εφαρμογή του πρώτου διαθέσιμου διαγνωστικού τεστ για την παρουσία του HCV, ο έλεγχος αφορούσε κυρίως τη διάγνωση της παρουσίας των ιών A και B της ηπατίτιδας (HAV και HBV), με αποτέλεσμα συχνά να μολύνεται μεγάλος αριθμός ατόμων με τον HCV. Σημαντικό επίσης ρόλο στην εξάπλωση του ιού έπαιξε και η αύξηση των χρηστών ναρκωτικών ουσιών. Τα προβλήματα περιορίστηκαν μετά την κλωνοποίηση τμήματος του RNA του ιού οπότε το πρώτο διαγνωστικό κιτ παρασκευάστηκε.

Είναι λοιπόν κατανοητό ότι ένα ευρείας κλίμακας διαγνωστικό τεστ μπορεί να συμβάλλει ουσιαστικά στην ανίχνευση της νόσου και να μας δώσει τη δυνατότητα χειρισμού της ασθένειας στα πρώιμα στάδια.

# **8. Σκοπός της Εργασίας**



Κύριος στόχος της παρούσης διατριβής ήταν η ανάπτυξη ενός καινοτόμου συστήματος βιοαισθητήρα, βασισμένου στην τεχνολογία της Βιοηλεκτρικής Μεθόδου Αναγνώρισης (BERA), με σκοπό την δημιουργία μιας επιστημονικής βάσης για την ανάπτυξη ενός συστήματος διάγνωσης ιών σε κλίμακα πρακτικής εφαρμογής.

Παράλληλα, μελετήθηκαν οι βιοηλεκτρικές ιδιότητες των κυττάρων και ο τρόπος με τον οποίο μεταβάλλεται το ηλεκτρικό δυναμικό της μεμβράνης των κυττάρων στην παρουσία παραγόντων που σχετίζονται με συγκεκριμένους ιούς.

Σε μεγάλο βαθμό τα αποτελέσματα της απόκρισης των βιοαισθητήρων στους προαναφερθέντες βιολογικούς παράγοντες, μας έδωσαν τη δυνατότητα δημιουργίας ενός εργαλείου μελέτης της φυσιολογίας των κυττάρων και επιβεβαίωσης σε ορισμένες περιπτώσεις θεωριών που ήδη γνωρίζουμε, ιδιαίτερα όσον αφορά την αλληλεπίδραση ιών με ανοσολογικούς υποδοχείς και τη χρήση, ως βιοανιχνευτών, των κυττάρων που φέρουν τους υποδοχείς αυτούς, καθώς και τους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος.



# 9. Πειραματικό μέρος





## **9.1 Εφαρμογή της μεθόδου BERA στην ανίχνευση του ιού του Μωσαϊκού της Αγγουριάς (*Cucumber mosaic virus, CMV*) και του ιού του Κροταλισμού του Καπνού (*Tobacco rattle virus, TRV*)**

### **9.1.1 Υλικά και Μέθοδοι**

Οι αρχικές καλλιέργειες κυττάρων Vero προήλθαν από την LGC Promochem (Teddington, UK). Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των βιοαισθητήρων προήλθαν από αναπαραγωγή των αρχικών καλλιεργειών στο Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθηνών. Στη συνέχεια με προσθήκη trypsin/EDTA για 10 λεπτά στους 37 °C τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το δοχείο καλλιέργειας και στη συνέχεια ακολούθησε συγκέντρωση τους σε πυκνότητα  $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ , με τη χρήση φυγόκεντρου για 6 λεπτά στις 1200rpm σε θερμοκρασία 25 °C.

Τα αντιδραστήρια αλβουμίνη ορού βοός (BSA), ι-γλουταμίνη propidium iodide και fluo-3 προήλθαν από την Invitrogen (Carlsbad, CA), ενώ τα υπόλοιπα αντιδραστήρια από την Fluka (Buchs, Switzerland). Οι απομονώσεις των ιών, τα μολυσμένα με ιούς φυτά, καθώς και τα ομόλογα πολυκλωνικά αντισώματα προήλθαν από το Εργαστήριο Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου

### **9.1.2 Παρασκευή βιοαισθητήρων για την ανίχνευση του CMV**

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την εισαγωγή των αντισωμάτων ήταν περίπου το ίδιο σε όλες τις εφαρμογές, με παραλλαγές μόνο ως προς την ένταση των ηλεκτρικών παλμών, ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες της εκάστοτε εφαρμογής.

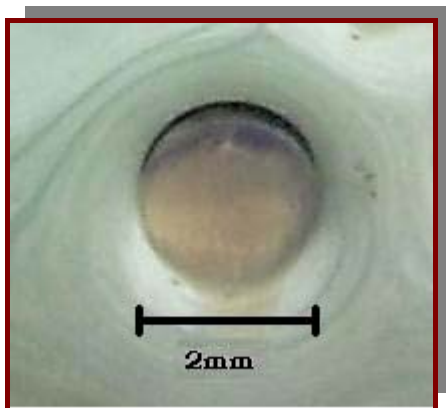
Η διαδικασία ηλεκτροεισαγωγής αντισωμάτων στην κυτταρική μεμβράνη περιλαμβάνει τα κάτωθι στάδια:

- Τα κύτταρα Vero συγκεντρώθηκαν με τη χρήση φυγόκεντρου στα 100xg για 6 λεπτά και στη συνέχεια αναμίχθηκαν εκ νέου με μέσο Dulbecco το οποίο περιείχε 20% (v/v) FCS (fetal calf serum).
- Στη συνέχεια έλαβε χώρα επώαση των κυττάρων με τα πολυκλωνικά αντισώματα του CMV ( $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) για 20 λεπτά σε πάγο.
- Το μίγμα κυττάρων αντισωμάτων μεταφέρθηκε σε κιουβέτες (cuvettes) του κατάλληλου electroporator (Thermo EC100, Waltham, MA). Η διαδικασία της ηλεκτροπόρωσης ολοκληρώθηκε με την εφαρμογή δύο ηλεκτρικών παλμών στα  $1800\text{V/cm}$ .
- Με την ανωτέρω διαδικασία τα κύτταρα επώαστηκαν για μία ώρα στους  $37^\circ\text{C}$ .
- Ακολούθησε συγκέντρωση των κυττάρων με τη χρήση φυγόκεντρου στα 100 xg για 6 λεπτά και προσθήκη εκ νέου μέσου Dulbecco με 20% FCS.

### 9.1.3 Προετοιμασία των βιοαισθητήρων

Τροποποιημένα κύτταρα καθώς και μη τροποποιημένα (διάλυμα 1ml) αναμίχθηκαν με 3ml αλγινικού νατρίου 2% (w/v) και στη συνέχεια με τη βοήθεια μιας σύριγγας 22G προστέθηκαν σε διάλυμα  $\text{CaCl}_2$  συγκέντρωσης 0,8M.

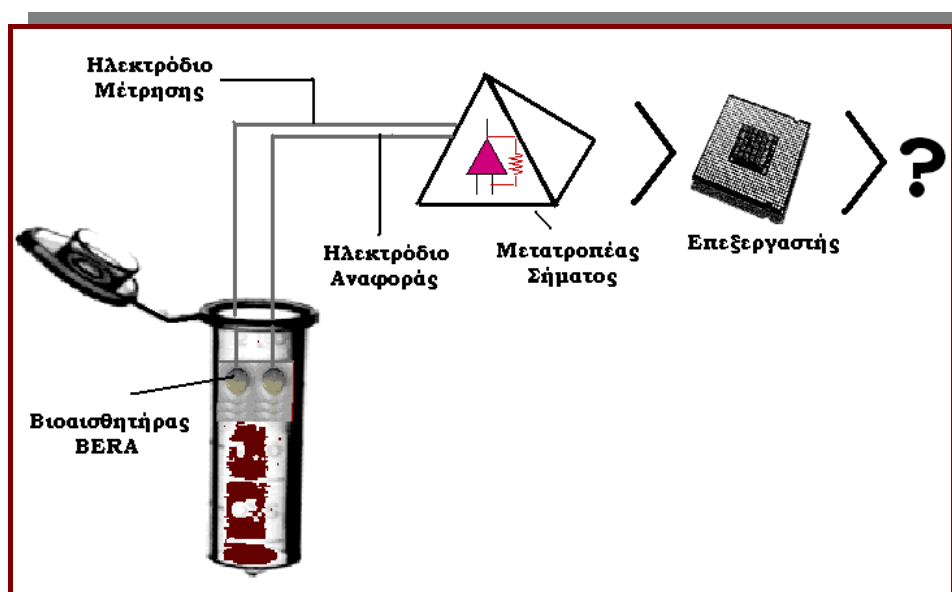
Το αποτέλεσμα της εν λόγω ανάμειξης ήταν η δημιουργία σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου διαμέτρου περίπου 2mm, το κάθε ένα από το οποίο περιείχε  $75 \times 10^3$  κύτταρα (Φωτογραφία 9). Για την καταμέτρηση τους χρησιμοποιήθηκε αιματοκυττόμετρο. Κάθε σφαιρίδιο αποτελούσε έναν αναλώσιμο βιοαισθητήρα BERA εξειδικευμένο στο να αντιδρά στην παρουσία του CMV.



**Φωτογραφία 9.** Απεικόνιση βιοαισθητήρα BERA, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του CMV. Ίδιας μορφής ήταν και οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιήθηκαν και στα υπόλοιπα πειράματα

### 9.1.4 Καταγραφή και επεξεργασία δεδομένων

Κάθε βιοαισθητήρας συνδέθηκε με ένα ηλεκτρόδιο από καθαρό ασήμι ηλεκτροχημικά επικαλυμμένο με ένα στρώμα Ag/AgCl και με διάμετρο 0,75mm σύμφωνα με το Σχήμα 19.



**Σχήμα 19.** Αναπαράσταση συνδεσμολογίας των επιμέρους στοιχείων ενός συστήματος βιοαισθητήρα BERA, όπως χρησιμοποιήθηκε κατά τις επιμέρους αναλύσεις (Moschopoulou et al., 2008)

Στη σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού βιοαισθητήρα BERA, το ηλεκτρόδιο αναφοράς συνδέεται με σφαιρίδιο πήγματος αλγινικού ασβεστίου χωρίς κύτταρα, ενώ το ηλεκτρόδιο μέτρησης συνδέεται με

σφαιρίδιο πήγματος αλγινικού ασβεστίου με κύτταρα. Κανένα ηλεκτρόδιο δεν έρχεται σε απευθείας επαφή με το δείγμα (δηλ. μόνο τα σφαιρίδια βυθίζονται στο δείγμα).

Η κατά προσέγγιση διάμετρος των σφαιριδίων είναι 2mm. Τα ηλεκτρόδια μέτρησης και αναφοράς συνδέονται με τον μετατροπέα σήματος PMD 1608-FS.

Τα δύο ηλεκτρόδια αναφοράς και μέτρησης συνδέθηκαν με ένα κυτταρικό βιοαισθητήρα. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόδια συνδέθηκαν με μια κάρτα PMD 1608FS A/D (Measurement Computing, Middleboro, MA), όπως εμφανίζεται στην εικόνα που ακολουθεί. Η καταγραφή των μετρήσεων και η επεξεργασία έγινε με το λογισμικό InstaCal® (Measurement Computing).

Σε κάθε δοκιμή, το σύστημα βιοαισθητήρων βυθίζεται σε δείγμα όγκου 200  $\mu\text{L}$ . Η απόκριση κάθε αισθητήρα υπολογίστηκε με την καταγραφή της μέγιστης τιμής του δυναμικού του για χρονική περίοδο 330 sec μετά από την εφαρμογή του δείγματος.

### 9.1.5 Μέθοδος ανίχνευσης του CMV

Σωματίδια του ιού από καθαρό παρασκεύασμα, διαλύθηκαν σε φυσιολογικό ορό 0,5% (w/v) σύμφωνα με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 0.0  $\text{ng ml}^{-1}$  (control), 1.0, 5.0, 10.0 και 15.0  $\text{ng ml}^{-1}$ . Επίσης βιοαισθητήρες BERA χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δειγμάτων καθαρού ιού της πράσινης ποικιλοχλώρωσης μετά μωσαϊκού της αγγουριάς (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) (watermelon isolate PL104), ως ετερόλογου ιού, ο οποίος βρισκόταν σε διάλυμα PBS σε συγκεντρώσεις: 0.0  $\text{ng ml}^{-1}$  (control), 1.0, 5.0, 10.0, και 15.0  $\text{ng ml}^{-1}$ .

Δείγματα από φυτικούς ιστούς τα οποία προήλθαν από φυτά αγγουριού τα οποία είχαν προηγουμένως μολυνθεί από CMV με ομογενοποίηση φύλλων, βάρους 1g σε 10ml φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffer) με pH 7.2, το οποίο περιείχε 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone 40. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 5.000rpm για 5 λεπτά.

Η παρουσία CMV στους ιστούς είχε πιστοποιηθεί με τη χρήση ορολογικής μεθόδων (ELISA), από το εργαστήριο Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Clark et al., 1977).

### **9.1.6 Αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης κυττάρου και ιού**

Παρατηρήθηκαν μεταβολές του δυναμικού της μεμβράνης των κυττάρων πριν και μετά την προσθήκη του ιού. Συγκεκριμένα αξιολογήθηκαν οι μεταβολές της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα των τροποποιημένων κυττάρων, παρατηρώντας την πρόσληψη του ακετομεθυλεστέρα του Fluo3 (Whelan et al., 2003).

Μετά από την εφαρμογή 5μl χρωστικής, καταγράφηκε ο φθορισμός των δειγμάτων για 5 λεπτά σε διαστήματα των 10s. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τα κεχρωσμένα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ένα μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss AxioLab εξοπλισμένο με ένα φίλτρο διέγερσης BP-546 και έναν χρωματικό διαθλαστή ακτινών FT-580.

Στο μικροσκόπιο είχε προσαρμοστεί μια ψηφιακή φωτογραφική μηχανή SONY S75 με τον ανάλογο εξοπλισμό. Καμία σημαντική αλλαγή της έντασης του φθορισμού δεν παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της παρατήρησης των δειγμάτων σαν αποτέλεσμα του αυξανόμενου χρόνου παρατήρησης.

### **9.1.7 Πειραματικός σχεδιασμός**

Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα για κάθε μία από τις πέντε συγκεντρώσεις κάθε ιού. Αντίστοιχα για κάθε δείγμα προερχόμενου από μολυσμένους με τον ιό ιστούς και ανά ιό, έλαβαν χώρα 15 επαναλήψεις.

Στις δοκιμές μικροσκοπίας φθορισμού, μετρήθηκε ο αριθμός κυττάρων (φθοριζόντων ή μη). Για κάθε παρατήρηση με το μικροσκόπιο, ο μέσος αριθμός κυττάρων και δοκιμών φθορισμού υπολογίστηκαν από 10 διαφορετικά  $7 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  οπτικά πεδία.

### **9.1.8 Παρασκευή βιοαισθητήρων για την ανίχνευση του TRV**

Όπως και στην προηγούμενα πειράματα (CMV) το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την εισαγωγή των αντισωμάτων ήταν περίπου το ίδιο με μικρές παραλλαγές. Οι βασικές διαφοροποιήσεις αφορούσαν την επώαση στην εν λόγω περίπτωση των κυττάρων με πολυκλωνικά αντισώματα του ιού TRV, ώστε να επιτευχθεί εκλεκτικότητα των βιοαισθητήρων BERA στον εν θέματι ιό. Τα αντισώματα του TRV που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από το Εργαστήριο Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Για την παρασκευή των βιοαισθητήρων χρησιμοποιήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στην περίπτωση που προαναφέρθηκε (CMV). Κάθε σφαιρίδιο που παρασκευάστηκε αποτελούσε έναν αναλώσιμο βιοαισθητήρα BERA εξειδικευμένο στο να αντιδρά στην παρουσία του TRV.

### **9.1.9 Καταγραφή και επεξεργασία δεδομένων**

Ακολουθήθηκε η διάταξη που ήδη περιγράψαμε με μόνη διαφοροποίηση ότι, η απόκριση κάθε αισθητήρα υπολογίστηκε με την καταγραφή της μέγιστης τιμής του δυναμικού του για μια χρονική περίοδο 530 sec μετά από την εφαρμογή του δείγματος.

### **9.1.10 Μέθοδος ανίχνευσης του TRV**

Σωμάτια του ιού διαλύθηκαν σε φυσιολογικό ορό 0.5% (w/v) σύμφωνα με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 0.0 ngml<sup>-1</sup> (control), 5.0, 7.0, 10.0, 13.0 και 20.0 ngml<sup>-1</sup>. Επίσης οι βιοαισθητήρες BERA χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δειγμάτων καθαρού CGMMV (watermelon isolate PL104) και *Potato Y virus* (PVY), οι οποίοι βρισκόταν σε διάλυμα PBS σε συγκεντρώσεις: 0.0 ngml<sup>-1</sup> (control), 5.0

7.0 10.0 13.0 και 20.0 ngml<sup>-1</sup>. Όλες οι απομονώσεις προήλθαν από το Εργαστήριο Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Παρασκευάστηκαν τρεις κατηγορίες δειγμάτων από φυτικούς ιστούς τα οποία προήλθαν από ιστούς φυτών τα οποία είχαν προηγουμένως μολυνθεί από TRV, CGMMV ή PVY αντίστοιχα, σύμφωνα με την προαναφερθείσα διαδικασία. Η παρουσία των ιών στους ιστούς είχε πιστοποιηθεί με τη χρήση ορολογικών μεθόδων (ELISA) από το εργαστήριο Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Clark et al., 1977).

### **9.1.11 Αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης κυττάρου και ιού**

Παρατηρήθηκαν οι μεταβολές του δυναμικού της μεμβράνης των κυττάρων πριν και μετά την προσθήκη του ιού. Συγκεκριμένα αξιολογήθηκαν οι μεταβολές της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου στο κυτόπλασμα των τροποποιημένων κυττάρων, παρατηρώντας την πρόσληψη του ακετομεθυλεστέρα του Fluo3 (Whelan et al., 2003).

Μετά από την εφαρμογή 5μl χρωστικής, καταγράφηκε ο φθορισμός των δειγμάτων για 5 λεπτά σε διαστήματα των 10s. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τα κεχρωσμένα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ένα μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss AxioLab που εξοπλίστηκε με ένα φίλτρο διέγερσης BP-546 και έναν χρωματικό διαθλαστή ακτινών FT-580.

### **9.1.12 Πειραματικός σχεδιασμός**

Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Για κάθε ιό χρησιμοποιήθηκαν 120 συνδυασμοί δειγμάτων (μάρτυρας + πέντε συγκεντρώσεις ιού). Αντίστοιχα για κάθε δείγμα προερχόμενου από μολυσμένους με ιό ιστούς, έλαβαν χώρα 15 επαναλήψεις.

Στις δοκιμές μικροσκοπίας φθορισμού, μετρήθηκε ο αριθμός κυττάρων (φθοριζόντων ή μη).



Για κάθε παρατήρηση με το μικροσκόπιο, ο μέσος αριθμός κυττάρων και δοκιμών φθορισμού υπολογίστηκαν από 10 διαφορετικά  $7 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  οπτικά πεδία.

### **9.1.13 Μελέτη της επίδρασης των TRV και CGMMV στο δυναμικό μη τροποποιημένων κυττάρων Vero**

Η επίδραση της παρουσίας των TRV και CGMMV μελετήθηκε ως προς την μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης κυττάρων Vero, τα οποία είχαν ακινητοποιηθεί σε πήγμα αλγινικού ασβεστίου, σύμφωνα με τη διαδικασία παρασκευής των βιοαισθητήρων BERA που περιγράψαμε πιο πάνω. Για τους σκοπούς του πειράματος χρησιμοποιήθηκε αραιώση καθαρού ιού συγκέντρωσης  $5.0 \text{ ng ml}^{-1}$  σε διάλυμα PBS, ενώ ως μάρτυρας διάλυμα φυσιολογικού ορού 0.5% (w/v).

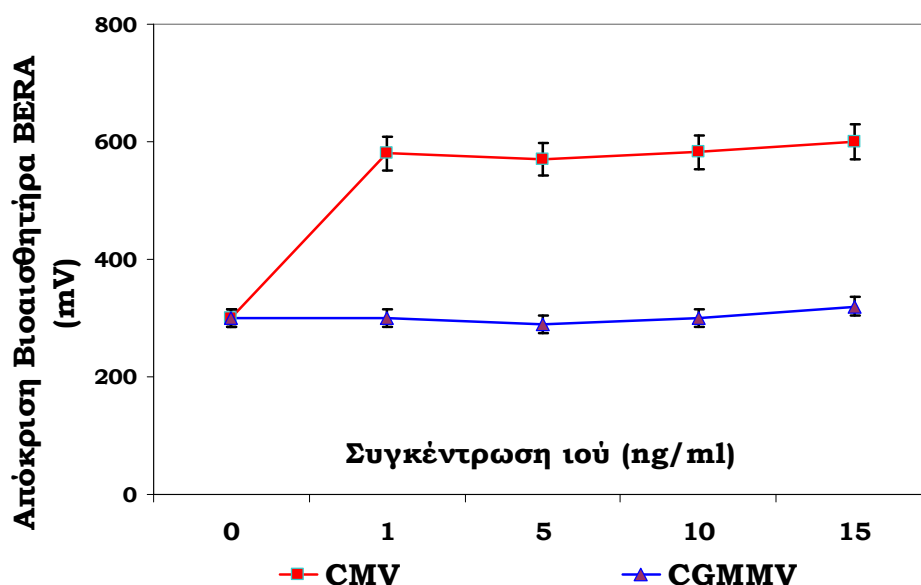
Σκοπός της εν λόγω πειραματικής διαδικασίας ήταν η μελέτη των βιοηλεκτρικών ιδιοτήτων των κυττάρων Vero, αλλά και η εξέταση της δυνατότητας απ' ευθείας χρήσης τους, χωρίς «τροποποιήσεις», σε εφαρμογές βιοαισθητήρων, για την ανίχνευση ιών.

## **9.2 Αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου BERA στην ανίχνευση του ιού του Μωσαϊκού της Αγγουριάς (*Cucumber mosaic virus, CMV*) και του ιού του Κροταλισμού του Καπνού (*Tobacco rattle virus, TRV*)**

### **9.2.1 Αποκρίσεις των βιοαισθητήρων βασισμένων σε κύτταρα των οποίων η μεμβράνη τροποποιήθηκε με αντισώματα του CMV**

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι οι βιοαισθητήρες με τα τροποποιημένα με αντισώματα του CMV, Vero κύτταρα αντέδρασαν στην παρουσία του CMV (καθαρού ιού) με αύξηση κατά απόλυτη τιμή του

δυναμικού της μεμβράνης. Η αντίδραση όμως αυτή δεν φάνηκε να σχετίζεται με τη συγκέντρωση του ιού, συνεπώς πιθανή χρήση του βιοαισθητήρα για τον ποσοτικό προσδιορισμό του CMV στην παρούσα φάση δεν είναι εφικτή. Αντίστοιχα, η μεταβολή στο δυναμικό της μεμβράνης ήταν μικρή κατά τον έλεγχο δειγμάτων τα οποία περιείχαν τον ετερόλογο CGMMV, γεγονός που επιβεβαιώνει την εκλεκτικότητα του βιοαισθητήρα. Επίσης, σταθερή ήταν η απόκριση του αισθητήρα στην μη παρουσία ιού (Διάγραμμα 4).



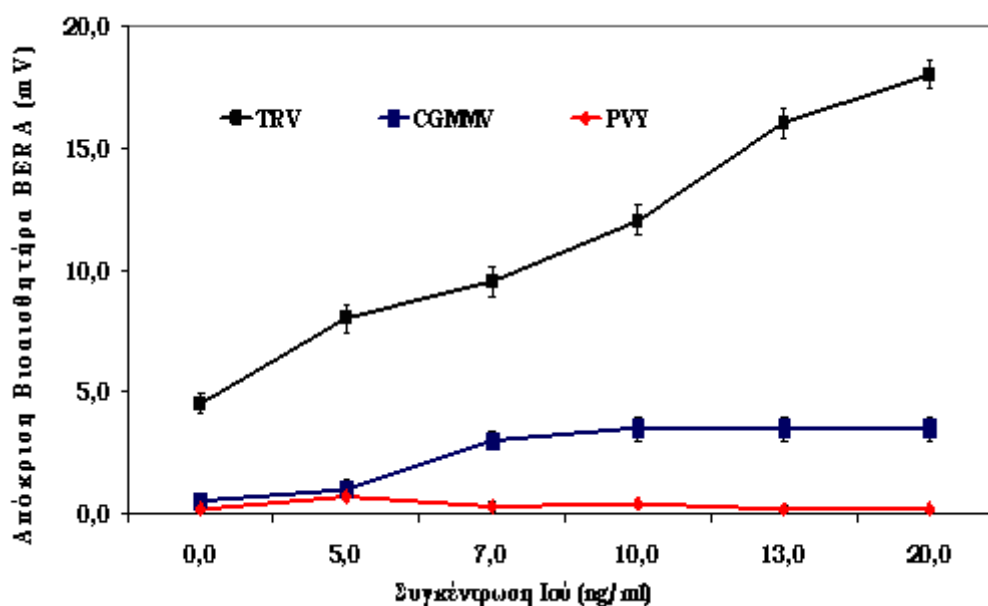
**Διάγραμμα 4.** Απόκριση βιοαισθητήρων BERA κατά την παρουσία διαλυμάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις καθαρού ιού των CMV και CGMMV. Ο αισθητήρας είναι βασισμένος σε κύτταρα Vero στην μεμβράνη των οποίων έχει εισαχθεί το αντίσωμα του CMV. Η απόκριση των βιοαισθητήρων εκφράζεται ως σχετική μεταβολή του δυναμικού των μεμβρανών των ακινητοποιημένων κυττάρων ( $n = 15$  μετρήσεις ανά δείγμα, 10 δείγματα ανά συγκέντρωση)

Σε σχέση με την απόκριση του αισθητήρα σε δείγματα προερχόμενα από μολυσμένους ιστούς, η αντίδραση ως προς τον CMV ήταν σαφώς υψηλότερη ( $74,00 \pm 11,00 \text{mV}$ ) συγκριτικά με την αντίστοιχη των αρνητικών δειγμάτων ( $0,00 \pm 3,00 \text{mV}$ ).

Ως προς την μεταβολή της συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου του κυτταροπλάσματος η παρουσία του CMV, είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του.

### 9.2.2 Αποκρίσεις των βιοαισθητήρων βασισμένων σε κύτταρα των οποίων η μεμβράνη τροποποιήθηκε με αντισώματα του TRV

Η αντίδραση του βιοαισθητήρα που βασίστηκε σε «τροποποιημένα» με αντίσωμα TRV κύτταρα Vero, στα δείγματα καθαρού απομονωμένου ιού απεικονίζεται στο Διάγραμμα 5.



**Διάγραμμα 5.** Απόκριση βιοαισθητήρων BERA κατά την παρουσία διαλυμάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις καθαρού ιού των TRV, CGMMV και PVY. Ο αισθητήρας είναι βασισμένος σε κύτταρα Vero στην μεμβράνη των οποίων έχει εισαχθεί το αντίσωμα του TRV. Η απόκριση των βιοαισθητήρων εκφράζεται ως σχετική μεταβολή του δυναμικού των μεμβρανών των ακινητοποιημένων κυττάρων ( $n = 15$  μετρήσεις ανά δείγμα, 10 δείγματα ανά συγκέντρωση)

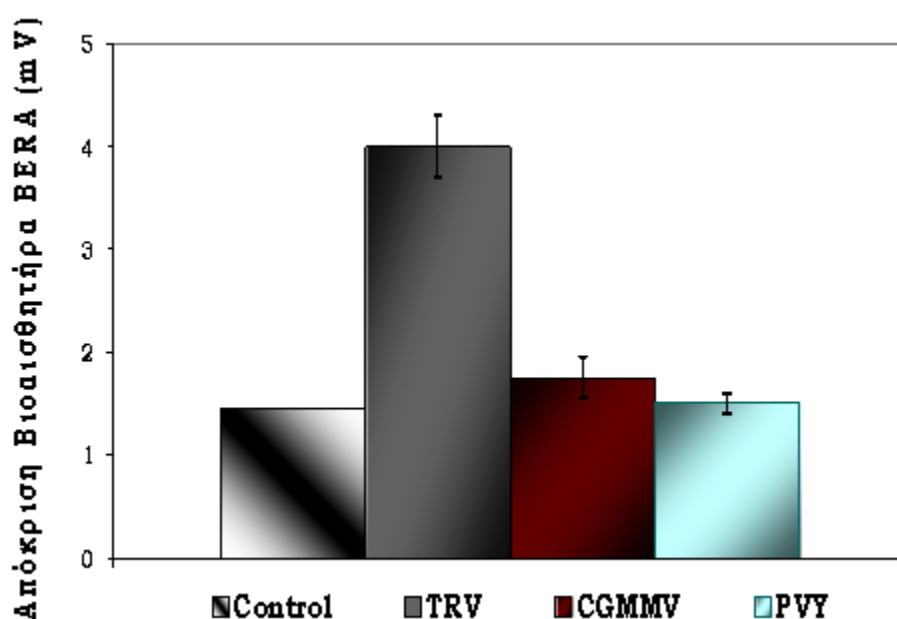
Η απόκριση του βιοαισθητήρα στην απουσία ιού ήταν σταθερή ( $4,50 \pm 0,40$ mV). Αντίστοιχα στην παρουσία του TRV παρατηρήθηκε έντονη

αύξηση του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης των «τροποποιημένων» κυττάρων.

Ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένο αποτέλεσε η γραμμική συσχέτιση ( $r^2=0,98$ ) της συγκέντρωσης του ιού με την ένταση της απόκρισης του βιοαισθητήρα, το οποίο αποτελεί σημαντική ένδειξη, αν όχι απόδειξη ότι, είναι δυνατός και ο ποιοτικός, αλλά και ο ποσοτικός προσδιορισμός του TRV με τη χρήση των βιοαισθητήρων BERA.

Αντίστοιχα, οι αποκρίσεις για τους δύο ετερόλογους CGMMV και PVY ήταν πολύ χαμηλότερες και ανεξάρτητες από τη συγκέντρωση των ιών.

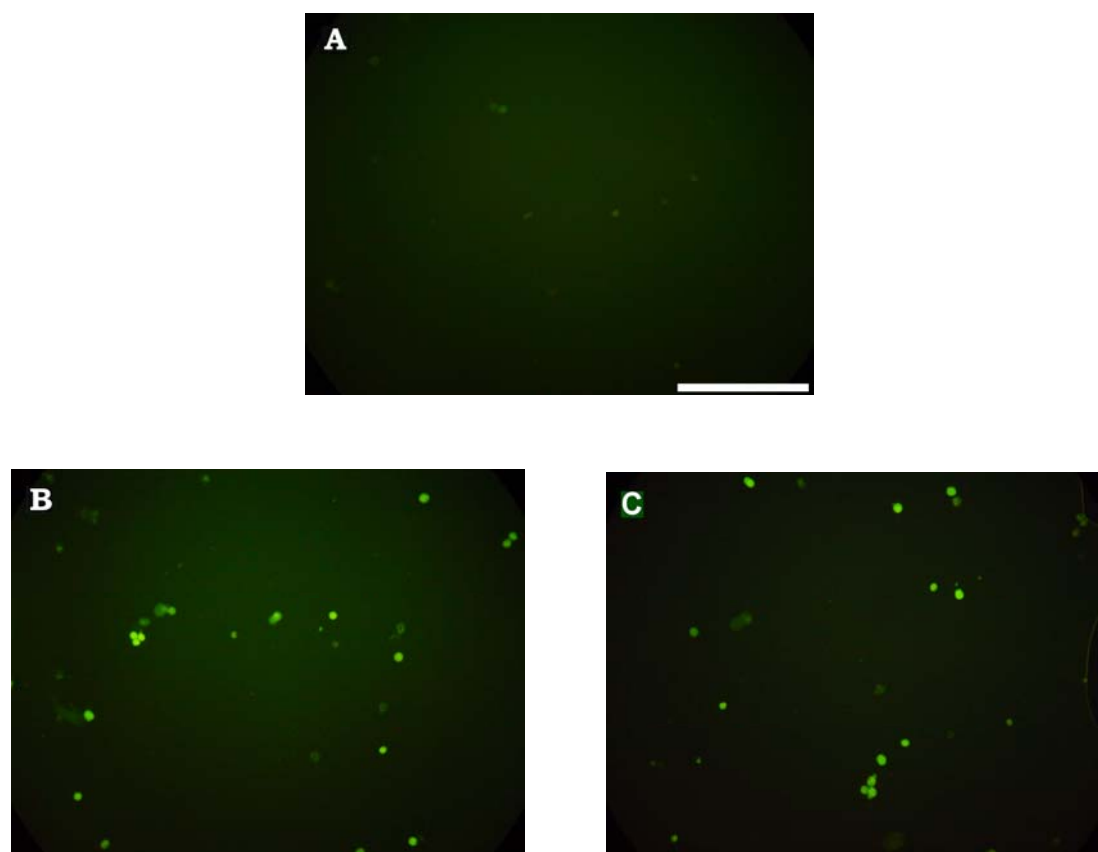
Σε σχέση με την απόκριση του αισθητήρα σε δείγματα προερχόμενα από μολυσμένους ιστούς, όπως απεικονίζεται και στο Διάγραμμα 6, η αντίδραση ως προς τον TRV ήταν σαφώς υψηλότερη ( $4,00 \pm 0,30\text{mV}$ ) σε σχέση με την αντίστοιχη των ετερόλογων ιών, του CGMMV ( $1,75 \pm 0,20\text{mV}$ ) και του PVY ( $1,50 \pm 0,10\text{mV}$ ) καθώς και των αρνητικών δειγμάτων ( $1,45 \pm 0,00\text{mV}$ ).



**Διάγραμμα 6.** Απόκριση βιοαισθητήρων BERA κατά την παρουσία των TRV, CGMMV και PVY σε δείγματα μολυσμένων ιστών. Ο αισθητήρας είναι βασισμένος σε κύτταρα Vero στην μεμβράνη των οποίων έχει εισαχθεί το αντίσωμα του TRV. Η απόκριση των βιοαισθητήρων εκφράζεται ως σχετική μεταβολή του δυναμικού των μεμβρανών των ακινητοποιημένων κυττάρων ( $n = 15$  μετρήσεις ανά δείγμα, 10 δείγματα ανά ιό)

Τα αποτελέσματα ως προς την μεταβολή της συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου του κυτοπλάσματος απεικονίζονται στη Φωτογραφία 10.

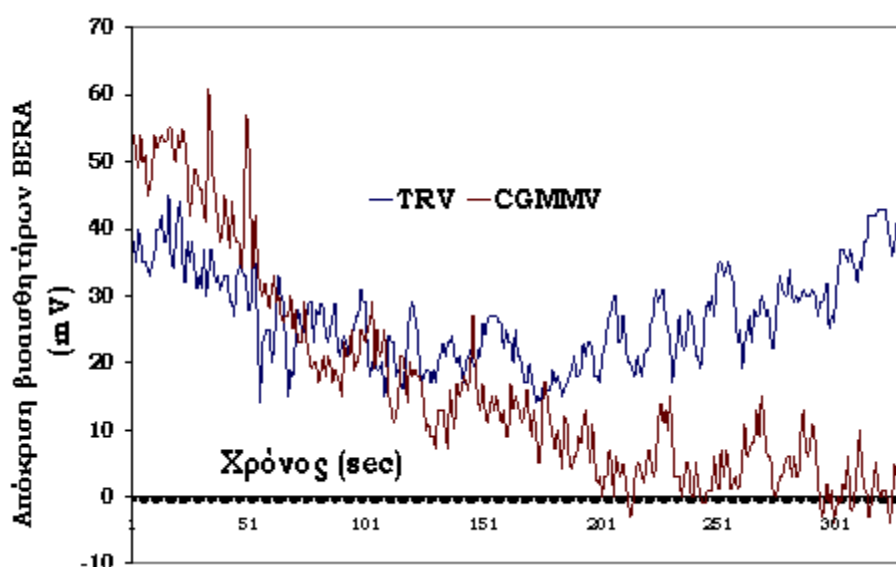
Η παρουσία των ετερόλογων CGMMV και PVY δεν είχε καμία επίδραση στην συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου (Φωτογραφίες 10B και 10C αντίστοιχα), αντίθετα η παρουσία του TRV, είχε σαν αποτέλεσμα την δραματική μείωση της συγκέντρωσης του, όπως φαίνεται και από την μείωση του φθορισμού που σχετίζεται με την συγκέντρωση των ιόντων  $Ca^{2+}$  (Φωτογραφία 10A). Αντίστοιχη ήταν και η αντίδραση των «τροποποιημένων» κυττάρων Vero σε δείγματα (μάρτυρες) τα οποία δεν περιείχαν ιό.



**Φωτογραφία 10.** Επίδραση των ετερόλογων CGMMV και PVY στη συγκέντρωση ιόντων  $Ca^{2+}$  (Φωτογραφίες B και C αντίστοιχα). Επίδραση της παρουσίας του TRV στη συγκέντρωση των ιόντων  $Ca^{2+}$  (Φωτογραφία A), όπου φαίνεται η δραματική μείωση της συγκέντρωσης του. Η κλίμακα στη φωτογραφία “A” αντιστοιχεί σε 250 $\mu$ m

### 9.2.3 Αποκρίσεις των βιοαισθητήρων βασισμένων σε κύτταρα Vero των οποίων η μεμβράνη δεν τροποποιήθηκε

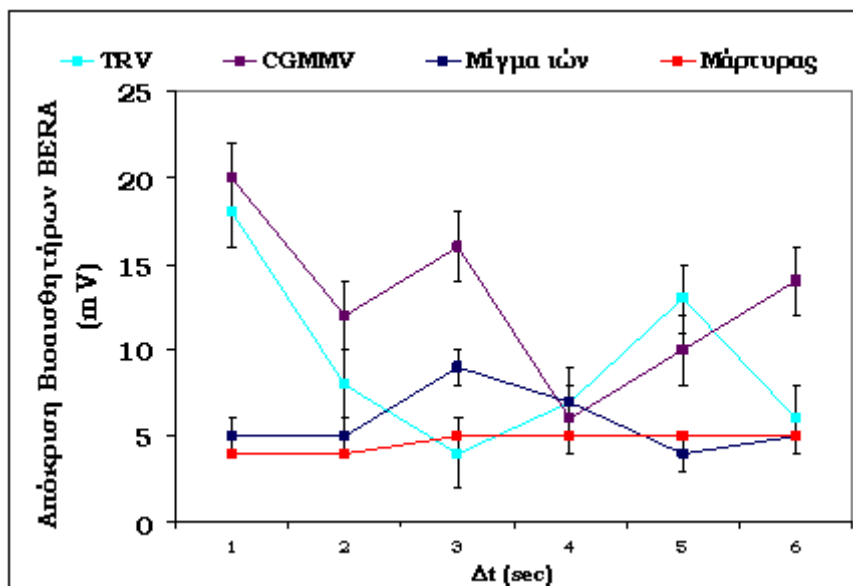
Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντίδραση των κυττάρων Vero των οποίων η μεμβράνη δεν είχε τροποποιηθεί, στην παρουσία ενός ιού, που προσβάλλει φυτικά είδη όπως ο TRV (Διάγραμμα 7). Σε καμία από τις πειραματικές διαδικασίες που έλαβαν χώρα η παρουσία του ιού δεν προκάλεσε μια αντίδραση που να ακολουθεί συγκεκριμένο πρότυπο, όμως φαίνεται να προκαλεί μια έντονη μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης των κυττάρων του βιοαισθητήρα ενεργοποιώντας το άνοιγμα και κλείσιμο πολλών καναλιών ιόντων.



**Διάγραμμα 7.** Αποκρίση βιοαισθητήρων BERA κατά την παρουσία των TRV και CGMMV. Ο αισθητήρας είναι βασισμένος σε κύτταρα Vero η μεμβράνη των οποίων δεν έχει τροποποιηθεί. Η απόκριση των βιοαισθητήρων εκφράζεται ως σχετική μεταβολή του δυναμικού των μεμβρανών των ακινητοποιημένων κυττάρων

Μια διαφορετική προσέγγιση της μελέτης των μεταβολών που προκαλείται σε κύτταρα Vero κατά την παρουσία καθαρού TRV και / ή CGMMV, ήταν η ομαδοποίηση των μεγίστων μεταβολών ανά 10 sec και στη συνέχεια λαμβάνοντας την μέση τιμή τους (Διάγραμμα 8). Ο

συγκεκριμένος τρόπος χρησιμοποιείται στη φυσική για τη μελέτη μη περιοδικών φαινομένων. Η διαδικασία εφαρμόστηκε και σε μίγμα των TRV και CGMMV.



**Διάγραμμα 8.** Απόκριση βιοαισθητήρων BERA κατά την παρουσία των TRV και CGMMV. Ο αισθητήρας είναι βασισμένος σε κύτταρα Vero η μεμβράνη των οποίων δεν έχει τροποποιηθεί. Η απόκριση των βιοαισθητήρων εκφράζεται ως η μέση μέγιστη μεταβολή ανά 10 sec ( $n = 15$  μετρήσεις ανά δείγμα). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ορός 0,5% (w/v).

Από το ανωτέρω διάγραμμα είναι προφανές ότι, η καμπύλη αντίδρασης δεν ακολουθεί κάποιο πρότυπο, αλλά λαμβάνοντας υπόψη την μέση τιμή των μεγίστων μεταβολών κατά τη διάρκεια του τελευταίου χρονικού διαστήματος (10 sec) η διαφοροποίηση για τον CGMMV σε σχέση με τον μάρτυρα είναι σαφής.

### 9.3 Εφαρμογή της μεθόδου BERA στην ανίχνευση του HBV και anti-HBs σε κλινικά δείγματα

Το παρόν κεφάλαιο της εν θέματι διδακτορικής διατριβής, αναφέρεται στην ανάπτυξη κυτταρικών βιοαισθητήρων, για την ανίχνευση του HBV

και anti-HBs σε κλινικά δείγματα. Οι αισθητήρες βασίστηκαν στη Βιοηλεκτρική Μέθοδο Αναγνώρισης (BERA), η οποία αναπτύχθηκε και περιγράφεται σε προηγούμενα κεφάλαια, αρχικά ως νέα μέθοδος για την ανίχνευση αντισωμάτων και αντιγόνων του HBV (Perdikaris et al., 2009).

Η δοκιμή είναι βασισμένη σε μια εξειδικευμένη αλληλεπίδραση μεταξύ της υπό εξέταση πρωτεΐνης του ιού και των ακινητοποιημένων κυττάρων του βιοαισθητήρα, η οποία προκαλεί την μεταβολή του ηλεκτρικού δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης.

### 9.3.1 Υλικά και Μέθοδοι

Τα δείγματα ορών αίματος τα οποία προήλθαν από το Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο της Αθήνας εξετάστηκαν για την παρουσία HBsAg, HBeAg, anti-HBsAg, anti-HCV and anti-HAV IgM με το Abbot AxSYM® test. Το σύστημα ελέγχου AxSYM® είναι ένα εργαστηριακό τέστ το οποίο χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί αν ασθενείς έχουν μολυνθεί με τον ιό όπως ο Β ή ο C της ηπατίτιδας. Η διάγνωση βασίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων που σχετίζονται με τον εν λόγω ιό και τα οποία παράγονται από τον οργανισμό με στόχο την αντιμετώπιση των αντιγόνων του ιού. Η συγκεκριμένη δοκιμή ελέγχου εξετάζει δείγματα ορού αίματος του ασθενούς.

Οι καλλιέργειες των κυττάρων Vero προήλθαν αρχικά από την LGC Promochem (Teddington, UK). Η αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA), η λ-γλουταμίνη, το propidium iodide και η fluo-3 αγοράστηκαν από την Invitrogen (Carlsbad, CA, ΗΠΑ). Όλα τα άλλα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από την Fluka (Buchs, Ελβετία).

Τα πολυκλωνικά αντισώματα ποντικών HBV (anti-HBs, anti-HBe) και τα αντιγόνα (HBsAg) προήλθαν από την Abbott Diagnostics Division (Ιλλινόις, ΗΠΑ) και προετοιμάστηκαν σε διαλύματα συγκεντρώσεων 0,0125 μg/mL, 0,0100 μg/mL και 0,0125 μg/mL, αντίστοιχα. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ορός 0,5% (w/v).



Τα κύτταρα Vero που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των βιοαισθητήρων προήλθαν από αναπαραγωγή των αρχικών καλλιέργειών στο Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθηνών.

### **9.3.2 Παρασκευή βιοαισθητήρων από κύτταρα Vero**

Παρασκευάστηκαν τρεις σειρές κυττάρων, στη μεμβράνη των οποίων εισήχθησαν πολυκλωνικά αντισώματα HBV (anti-HBs (A), anti-HBe (B) σειρά αισθητήρων) και το αντιγόνο (HBsAg (C) σειρά), σύμφωνα με ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο ηλεκτροπόρωσης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο το οποίο αφορά την ανίχνευση ιών που προσβάλλουν φυτικά είδη (Moschoroulou et al., 2008).

Συγκεκριμένα η τροποποίηση αφορούσε την εφαρμογή δύο ηλεκτρικών παλμών στα 400 V/cm. Ακολουθώντας την εν λόγω διαδικασία, περίπου  $12 \times 10^3$  αντισώματα ή αντιγόνα, αντίστοιχα, ενσωματώθηκαν στην επιφάνεια κάθε κυττάρου, όπως υπολογίστηκε με ορολογικές μεθόδους (τα σχετικά στοιχεία δεν παρουσιάζονται).

Τα τροποποιημένα κύτταρα Vero αναμίχθηκαν με 3ml διαλύματος αλγινικού νατρίου 4% (w/v) και στη συνέχεια το μίγμα αναμίχθηκε με τη βοήθεια μιας 22G σύριγγας, σε 0,8M CaCl<sub>2</sub>. Κάθε μια από τις προκύπτουσες σφαιρικού σχήματος πήγματα αλγινικού ασβεστίου είχε κατά προσέγγιση διάμετρο 2mm και περιείχε περίπου  $4 \times 10^4$  κύτταρα, όπως υπολογίστηκε με μεθόδους οπτικής μικροσκοπίας. Ακολουθώντας την εν λόγω διαδικασία, μια σειρά 100 αναλώσιμων βιοαισθητήρων προετοιμάστηκε σε τρεις ώρες.

### **9.3.3 Προετοιμασία δειγμάτων**

Τα δείγματα ορών αίματος προήλθαν από το Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο της Αθήνας και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -5 °C. Όλα τα δείγματα είχαν ελεγχθεί για την παρουσία HBsAg, HBeAg, anti-HBsAg, anti-HCV και anti-HAV IgM χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Abbot AxSYM®. Τα δείγματα εξετάστηκαν επίσης για HCV χρησιμοποιώντας το

όργανο ελέγχου Amplicor HCV v2.0 της Roche. Καμία ποσοτική πληροφορία (τίτλος ιών, φορτίο ιού) δεν αναγραφόταν στα δείγματα, διότι αρχικός μας στόχος ήταν η ανάπτυξη ενός κυτταρικού βιοαισθητήρα ποιοτικής ανάλυσης της παρουσίας του HBV.

Πριν από τη δοκιμή, τα δείγματα αποψύχθηκαν και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20 °C). Επιπρόσθετα 35 δείγματα ορού αίματος χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικά δείγματα, μετά από εξέταση για την παρουσία ιών της ηπατίτιδας ή των αντίστοιχων αντισωμάτων. Η αναλογία των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε αναφέρεται στον Πίνακα 2.

<b>Τύπος Δείγματος</b>	<b>Αριθμός Δειγμάτων</b>
HBsAg(+), anti-HBsAg(+)	35
HBeAg(+)	25
HCV(+), anti-HCV(+)	32
anti-HAV IgM(+)	6
Σύνολο Θετικών Δειγμάτων	98
Αρνητικά (Μάρτυρες)	35
<b>Σύνολο Δειγμάτων</b>	<b>133</b>

**Πίνακας 2.** Ταξινόμηση των δειγμάτων ορού που χρησιμοποιήθηκαν ανά τύπο δείγματος

#### 9.3.4 Διαδικασία ελέγχου

Η συνδεσμολογία των επιμέρους στοιχείων του βιοαισθητήρα περιγράφεται στο κεφάλαιο εφαρμογής της μεθόδου BERA για την ανίχνευση ιών που προσβάλουν φυτικά είδη. Τα ηλεκτρόδια συνδέθηκαν με μια κάρτα PMD-1608FS A/D (Measurement Computing, Middleboro, MA), ενώ η καταγραφή των μετρήσεων και η επεξεργασία έγινε με το λογισμικό InstaCal® (Measurement Computing).

Σε κάθε δοκιμή, το σύστημα βιοαισθητήρων βυθίστηκε σε δείγμα όγκου 400  $\mu$ L. Η απόκριση κάθε αισθητήρα υπολογίστηκε με την

καταγραφή της μέγιστης τιμής του δυναμικού του, για μια χρονική περίοδο 45 sec μετά από την εφαρμογή του δείγματος.

### **9.3.5 Μελέτη των μεταβολών της συγκέντρωσης ιόντων $Ca^{2+}$**

Οι μεταβολές στην συγκέντρωση του  $Ca^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων των οποίων η μεμβράνη τροποποιήθηκε με την εισαγωγή anti-HBs (A), anti-HBe (B) και HBsAg (C) πριν και μετά από την προσθήκη HBsAg (0,0125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), HBeAg (0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) και anti-HBs (0,0125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), αντίστοιχα, ελέγχθηκαν για τη λήψη του ακετομεθύλ-εστέρα της χρωστικής Fluo3 (Whelan et al., 2003). Μετά από την εφαρμογή 5 $\mu\text{l}$  χρωστικής, καταγράφηκε ο φθορισμός των δειγμάτων για 5 λεπτά σε διαστήματα των 10s.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τα κεχρωσμένα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ένα μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss AxioLab, το οποίο έφερε ένα φίλτρο διέγερσης BP-546 και έναν χρωματικό διαθλαστή ακτινών FT-580. Προκειμένου να ελεγχθεί, η διάχυση του φωτός, μειώσαμε τους χρόνους έκθεσης δειγμάτων στο κατώτατο δυνατό επίπεδο. Καμία σημαντική αλλαγή της έντασης του φθορισμού δεν παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της παρατήρησης των δειγμάτων.

### **9.3.6 Πειραματικός σχεδιασμός**

Η κλινική ανάλυση δειγμάτων εκπονήθηκε σύμφωνα με ένα double-blind πρωτόκολλο. Για τη διαδικασία ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκαν 133 διαφορετικά δείγματα ορών αίματος (98 θετικά, 35 αρνητικά), σύμφωνα με την ταξινόμηση που παρουσιάστηκε στον Πίνακα 2.

Κάθε δείγμα εξετάστηκε με τους τρεις διαφορετικούς τύπους αισθητήρων (A, B και C). Για κάθε δοκιμή, κάθε δείγμα εξετάστηκε πέντε φορές, δηλαδή με πέντε μεμονωμένους, διαφορετικούς βιοαισθητήρες. Το πείραμα δοκιμής επαναλήφθηκε τρεις φορές,

επομένως κάθε δείγμα ελέγχθηκε πραγματικά με 15 διαφορετικούς αισθητήρες.

Στις δοκιμές μικροσκοπίας φθορισμού, μετρήθηκε ο αριθμός κυττάρων (φθοριζόντων ή μη). Για κάθε παρατήρηση με το μικροσκόπιο, ο μέσος αριθμός κυττάρων και δοκιμών φθορισμού υπολογίστηκαν από 10 διαφορετικά  $7 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  οπτικά πεδία.

### **9.3.7 Μελέτη της επίδρασης των HBV (HBsAg) και HCV στο δυναμικό μη τροποποιημένων κυττάρων Vero**

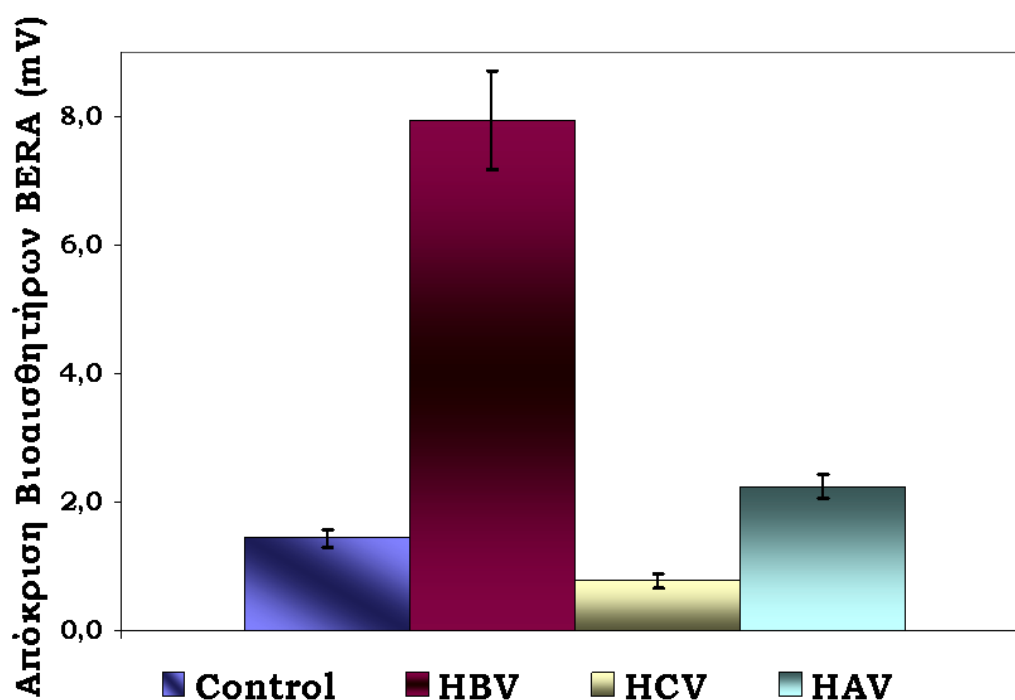
Μελετήθηκε η αντίδραση των βιοαισθητήρων BERA οι οποίοι παρασκευάστηκαν με μη τροποποιημένα κύτταρα Vero, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράψαμε. Για τους σκοπούς της εν λόγω μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 36 δείγματα θετικά για την παρουσία HBsAg και αντίστοιχα 36 θετικά δείγματα στην παρουσία του HCV. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ορός 0.5% (w/v).

Ως απόκριση του βιοαισθητήρα θεωρήσαμε την τιμή του δυναμικού της μεμβράνης των κυττάρων Vero τη χρονική στιγμή  $t = 45 \text{ sec}$ . Η συγκεκριμένη χρονική στιγμή επιλέχθηκε για λόγους αντιστοιχίας με τα λοιπές πειραματικές διαδικασίες, κατά τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν «τροποποιημένα» κύτταρα Vero.

### **9.4 Αποκρίσεις των βιοαισθητήρων βασισμένων σε κύτταρα των οποίων η μεμβράνη τροποποιήθηκε με anti-HBs, anti-HBe ή HBsAg**

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανίχνευσης των αντιγόνων και των αντισωμάτων του ιού Β της ηπατίτιδας με τη χρήση βιοαισθητήρων BERA βασισμένων σε κύτταρα Vero, τα οποία είχαν πριν τροποποιηθεί ως προς την κυτταρική τους μεμβράνη με την εισαγωγή αντιγόνων ή αντισωμάτων, παρουσιάζονται στα διαγράμματα και τις εικόνες που ακολουθούν.

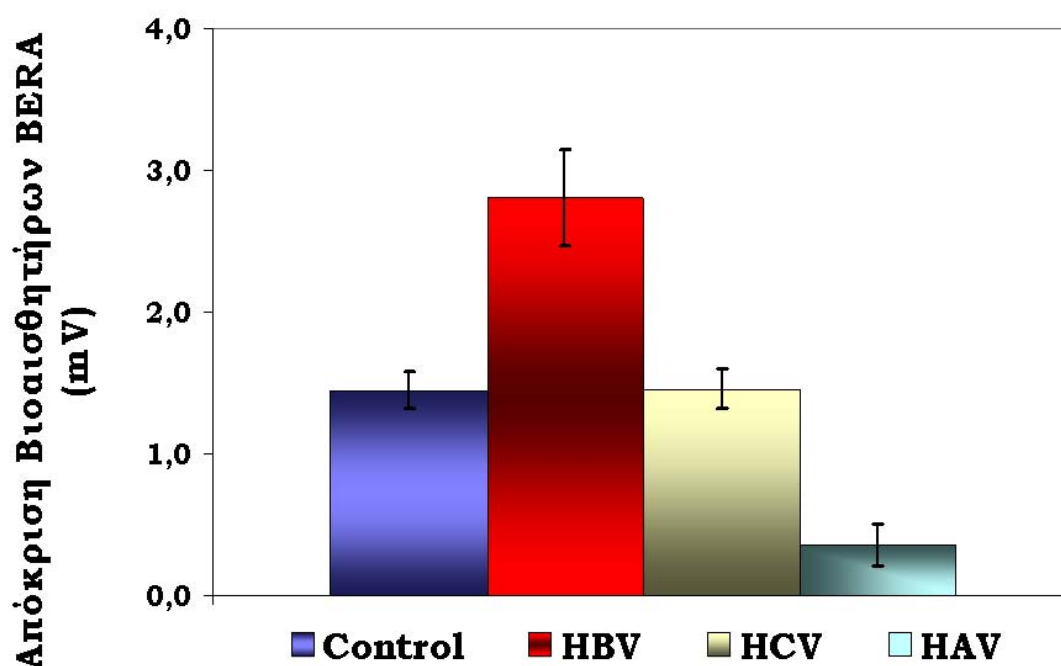
Η απόκριση του βιοαισθητήρα βασισμένου στα κύτταρα Vero των οποίων η μεμβράνη έφερε το αντίσωμα anti-HBs (αισθητήρας A) σε δείγματα θετικά για το αντιγόνο HBsAg ( $7.10 \pm 0.80$  mV), ήταν σημαντικά υψηλότερη έναντι των δειγμάτων που περιείχαν αντιγόνα ετερόλογων ιών όπως του ιού C της ηπατίτιδας (HCV) ή των αρνητικών δειγμάτων, ενώ είχε υψηλό βαθμό επαναληψιμότητας, με μια παραλλακτικότητα της τάξεως του 8.9%, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 9.



**Διάγραμμα 9.** Απόκριση βιοαισθητήρων κατά την παρουσία του HBsAg. Ο αισθητήρας είναι βασισμένος σε κύτταρα Vero στην μεμβράνη των οποίων έχει εισαχθεί το αντίσωμα anti-HBs. Η απόκριση των βιοαισθητήρων εκφράζεται ως σχετική μεταβολή του δυναμικού των μεμβρανών των ακινητοποιημένων κυττάρων ( $n = 15$  μετρήσεις ανά δείγμα)

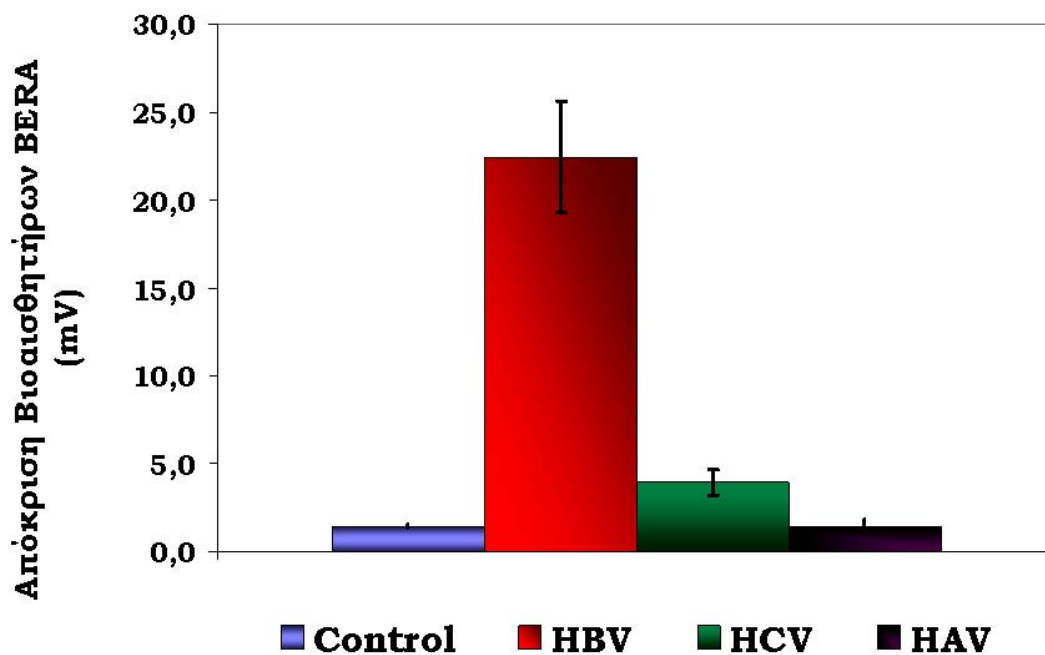
Παρόμοια αποτέλεσμα, αλλά με αρκετά μικρότερη ένταση απόκρισης ( $2.75 \pm 0.60$  mV) σε θετικά για HBeAg δείγματα λήφθηκε με βιοαισθητήρες βασισμένους σε κύτταρα Vero στην μεμβράνη των οποίων είχε εισαχθεί το αντίσωμα anti-HBe (αισθητήρας B). Όπως στην περίπτωση της ανίχνευσης της παρουσίας του HBsAg, η απόκριση ήταν

αρκετά υψηλότερη έναντι των δειγμάτων που περιείχαν ετερόλογα αντιγόνα ηπατίτιδας (HCV, HAV) ή των αρνητικών δειγμάτων (Διάγραμμα 10). Αντίστοιχα το Διάγραμμα 11 αναφέρεται στην απόκριση των βιοαισθητήρων BERA στην παρουσία του αντισώματος anti-HBs.



**Διάγραμμα 10.** Απόκριση των βιοαισθητήρων BERA στην παρουσία του HBeAg. Ο αισθητήρας είναι βασισμένος στα κύτταρα Vero στην μεμβράνη των οποίων έχει εισαχθεί το αντίσωμα anti-HBe. Η απόκριση των βιοαισθητήρων εκφράζεται ως σχετική μεταβολή του δυναμικού των μεμβρανών των ακινητοποιημένων κυττάρων ( $n = 15$  μετρήσεις ανά δείγμα)

Η ανίχνευση των αντισωμάτων anti-HBs σε κλινικά δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση ενός βιοαισθητήρα βασισμένου σε ακινητοποιημένα κύτταρα Vero που στην μεμβράνη των οποίων είχε εισαχθεί το αντίστοιχο αντιγόνο (HBsAg) (αισθητήρας C). Παρατηρήθηκε μια ιδιαίτερα υψηλή απόκριση του αισθητήρα σε δείγματα θετικά στην παρουσία anti-HBs ( $23,00 \pm 4,00$  mV), έναντι των δειγμάτων τα οποία περιείχαν αντισώματα ετερόλογων ιών (anti-HAV, anti-HCV) ή των αρνητικών δειγμάτων.



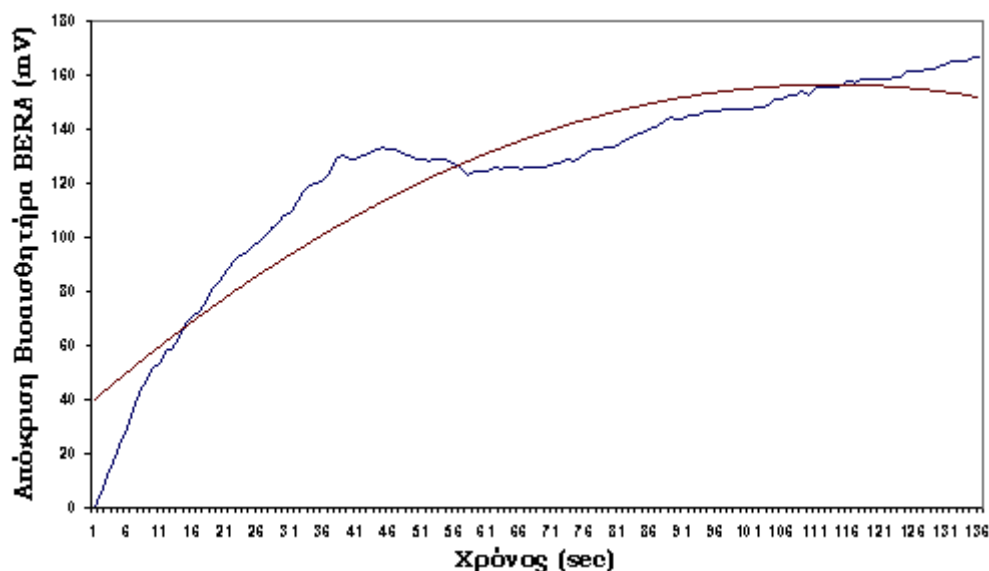
**Διάγραμμα 11.** Απόκριση του βιοαισθητήρα BERA στην παρουσία του anti-HBs. Ο αισθητήρας είναι βασισμένος στα κύτταρα Vero στην μεμβράνη των οποίων έχει εισαχθεί το αντιγόνο HBsAg. Η απόκριση των βιοαισθητήρων εκφράζεται ως σχετική μεταβολή του δυναμικού των μεμβρανών των ακινητοποιημένων κυττάρων ( $n = 15$  μετρήσεις ανά δείγμα)

Ιδιαίτερη σημασία έχουν όμως όχι μόνο οι μέγιστες μεταβολές όπως απεικονίζονται στα ανωτέρω διαγράμματα, αλλά και η τελική μορφή των διαγραμμάτων των μετρήσεων των μεταβολών του δυναμικού των κυττάρων του βιοαισθητήρα σε συνάρτηση με το χρόνο.

Τυπικό διάγραμμα αποτελεί το Διάγραμμα 12 που ακολουθεί, όπου απεικονίζεται η συνολική μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού ενός αισθητήρα «Α» στην παρουσία του HBsAg(+), που ουσιαστικά θα μπορούσε να αποτελεί την απεικόνιση της διαδικασίας φόρτισης πυκνωτή.

Η ανωτέρω υπόθεση βασίζεται, όπως θα δούμε και στις σχετικές με τη μεταβολή της συγκέντρωσης του κυτοπλασματικού ασβεστίου φωτογραφίες που ακολουθούν, όπου σημαντικό ρόλο στις παρατηρούμενες μεταβολές παίζουν τα κανάλια ασβεστίου δρώντας ως διακόπτες, όπου κατά το κλείσιμο τους παρατηρείται αύξηση του

δυναμικού. Στην πραγματικότητα η όποια παρατηρούμενη μεταβολή της τάσης, προκαλείται από περισσότερα του ενός καναλιού.



**Διάγραμμα 12.** Μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης των κυττάρων βιοαισθητήρα BERA στη διάρκεια του χρόνου, κατά την παρουσία του HBsAg. Ο αισθητήρας εμπεριέχει τροποποιημένα κύτταρα Vero, στην μεμβράνη των οποίων έχει εισαχθεί το ομόλογο αντίσωμα anti-HBs

Είναι όμως δυνατόν η προαναφερθείσα καμπύλη να έχει την μορφή που απεικονίζεται στο Διάγραμμα 13, στις περιπτώσεις που έχουμε συσσώρευση φορτίου στην μεμβράνη των κυττάρων και στη συνέχεια σταδιακή συσσώρευση αρνητικών φορτίων (De Felice, L.J., 1997).

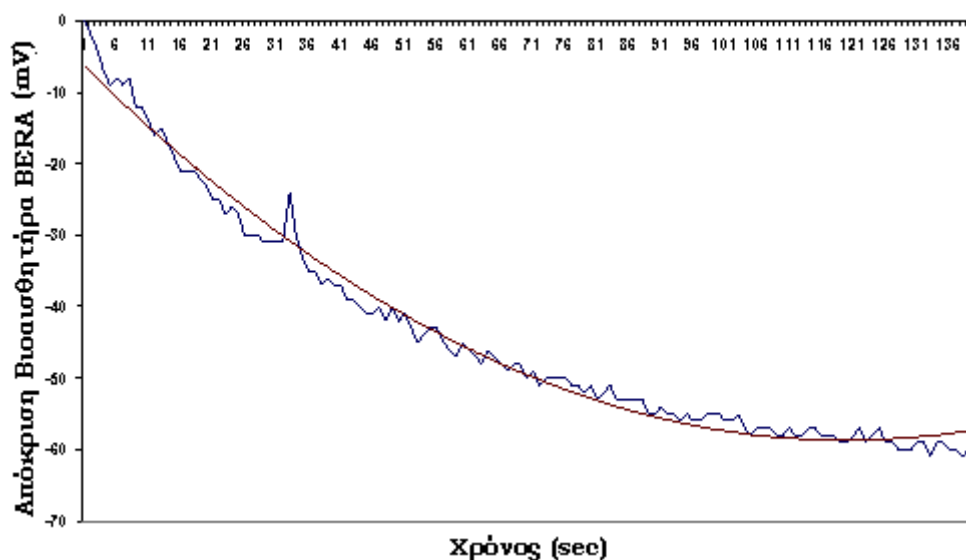
Μια άλλη αιτία για την οποία παρατηρήθηκε το εν λόγω φαινόμενο ήταν η συσσώρευση φορτίου στα ηλεκτρόδια Ag/AgCl, από τις προηγούμενες μετρήσεις. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπιζονταν φέρνοντας σε επαφή τα δύο ηλεκτρόδια μέτρησης και αναφοράς<sup>5</sup>.

Αντίστοιχα η αντίδραση του ίδιου τύπου βιοαισθητήρα με δείγμα HCV(+), παραπέμπει σε ένα κύκλωμα RC στο οποίο ανοίγουμε και κλείνουμε τον διακόπτη S συνεχώς, ενώ δεν φαίνεται να ακολουθεί

<sup>5</sup> Το συμπέρασμα αυτό είναι αποτέλεσμα πολλαπλών παρατηρήσεων κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και δεν στηρίζεται σε κάποια βιβλιογραφική αναφορά.



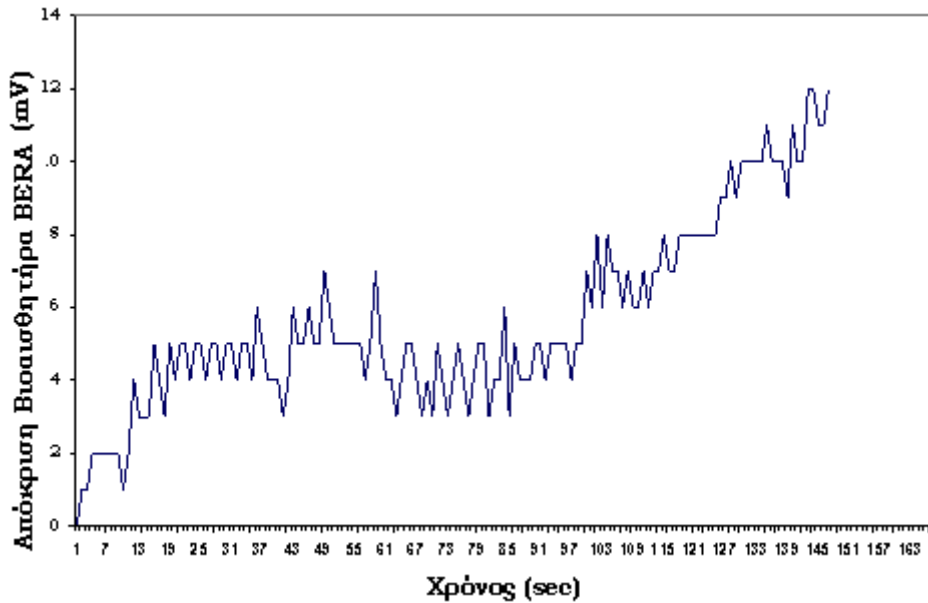
κάποιο πρότυπο αντίδρασης, γεγονός απόλυτα λογικό αφού τα τροποποιημένα κύτταρα του βιοαισθητήρα τύπου «Α» στην επιφάνεια της μεμβράνης διαθέτουν το αντίσωμα anti-HBs.



**Διάγραμμα 13.** Μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης των κυττάρων βιοαισθητήρα BERA στη διάρκεια του χρόνου, κατά την παρουσία του HBsAg. Ο αισθητήρας εμπεριέχει κύτταρα Vero στην μεμβράνη των οποίων έχει εισαχθεί το αντίσωμα ομόλογο anti-HBs

Συνεπώς δεν υπάρχει εξειδικευμένη αντίδραση, αλλά φαίνεται ότι η παρουσία έστω και ενός μη ομόλογου ιού, να επηρεάζει το άνοιγμα και κλείσιμο κάποιων καναλιών, προσομοιάζοντας Διάγραμμα 14 με το Διάγραμμα 1 το οποίο απεικονίζει την μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης κατά το άνοιγμα και κλείσιμο περισσότερων του ενός καναλιών ιόντων.

Η απεικόνιση των μεταβολών της συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου στο κυττόπλασμα ινοβλαστών Vero, εμφανίζεται στη Φωτογραφία 11, ως έκφραση των μεταβολών στην ένταση φθορισμού. Τα κύτταρα όπως προαναφέρθηκε ήταν «τροποποιημένα».



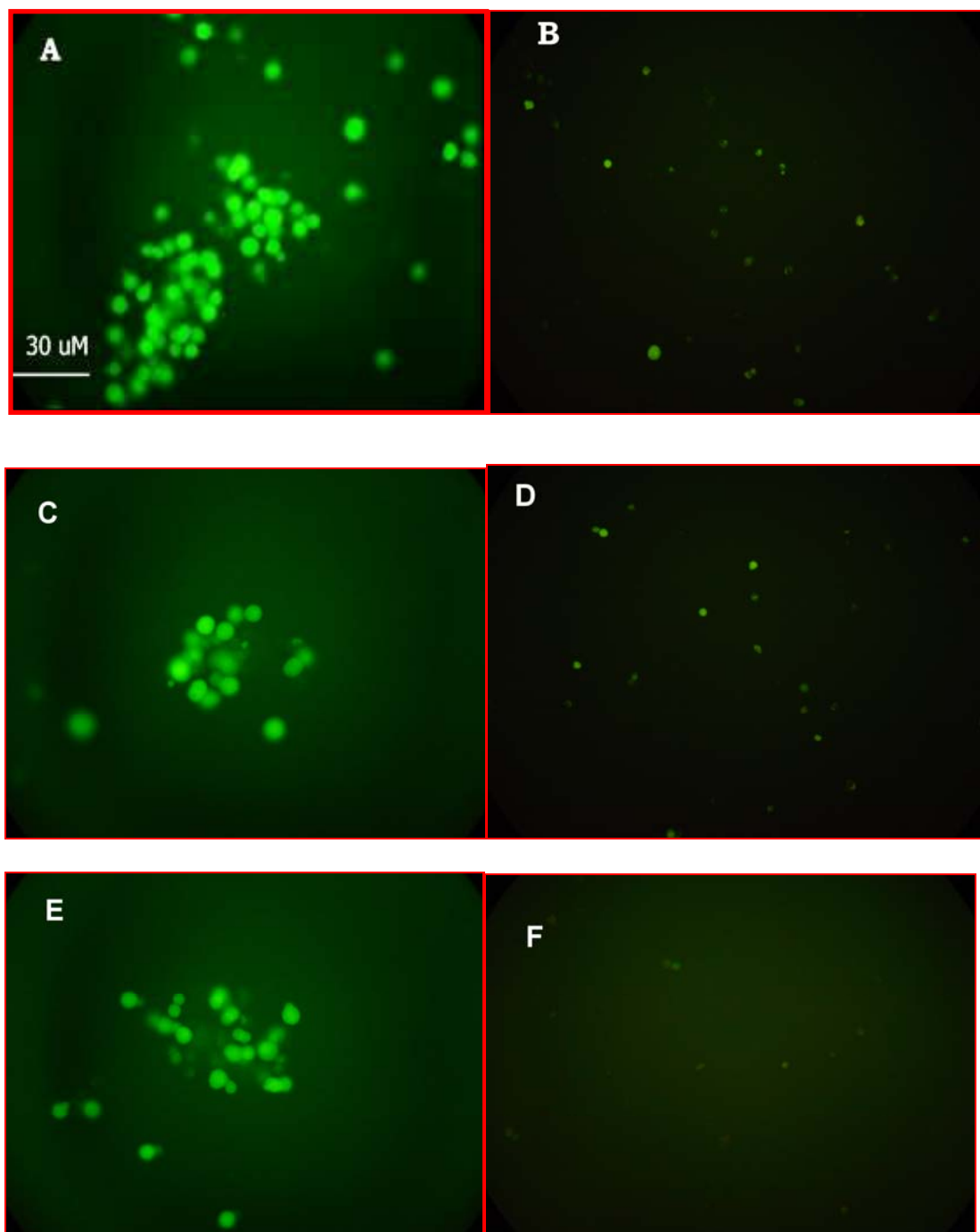
**Διάγραμμα 14.** Μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης των κυττάρων βιοαισθητήρα BERA στη διάρκεια του χρόνου, κατά την παρουσία του HCV. Ο αισθητήρας περιέχει κύτταρα Vero στην μεμβράνη των οποίων έχει εισαχθεί το μη ομόλογο αντίσωμα anti-HBs

Κύτταρα Vero στη μεμβράνη των οποίων έχει εισαχθεί το anti-HBs κατά την παρουσία του ομόλογου αντιγόνου (HBsAg), αντιδρούν και η εν λόγω αντίδραση εκφράζεται με μείωση της έντασης φθορισμού, δηλαδή έκπλυση των ιόντων ασβεστίου, που συνιστά έντονη μείωση των αποθεμάτων του ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$  (Φωτογραφίες 11A και 11B).

Αντίστοιχα, κύτταρα Vero στη μεμβράνη των οποίων έχει εισαχθεί το anti-HBe κατά την παρουσία του ομόλογου αντιγόνου (HBeAg), αντιδρούν κατά τον ίδιο τρόπο που προαναφέραμε με εμφανή και σε αυτή την περίπτωση έκπλυση των ιόντων ασβεστίου (Φωτογραφίες 11C και 11D).

Το ίδιο πρότυπο αντίδρασης εμφάνισαν και τα τροποποιημένα κύτταρα με το αντιγόνο HBsAg, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της παρουσίας του ομόλογου αντισώματος (anti-HBs). Εκ νέου η παρουσία του εν λόγω αντισώματος προκάλεσε την μείωση της έντασης του φθορισμού όπως φαίνεται και στις φωτογραφίες 11E και 11F.

Καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στην πυκνότητα φθορισμού, όταν έλαβε χώρα χειρισμός των κυττάρων με φυσιολογικό ορό.

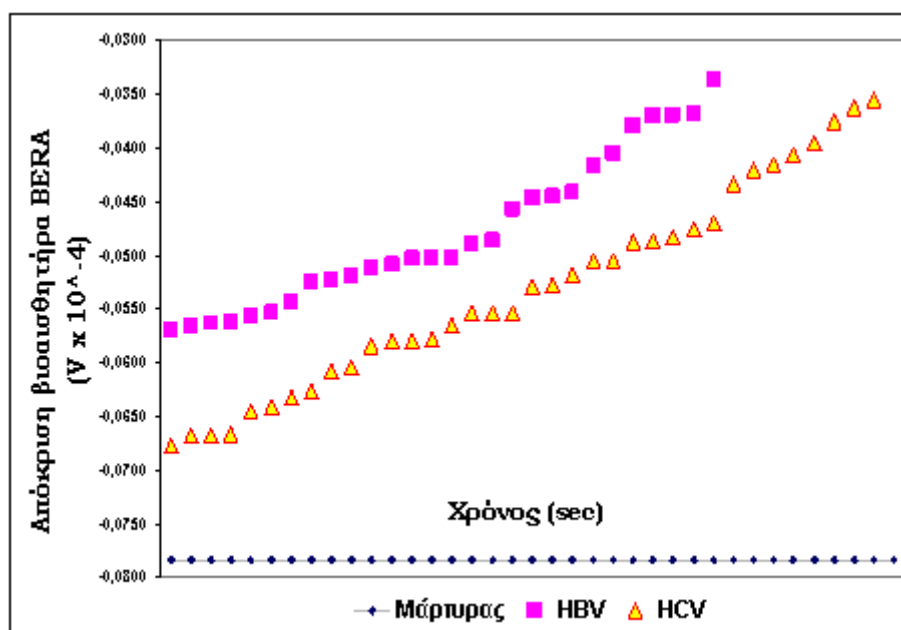


**Φωτογραφία 11.** Απεικόνιση των μεταβολών της συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου στο κυττόπλασμα σε κύτταρα Vero, εκφραζόμενες ως διαφορές στην ένταση φθορισμού, των οποίων η μεμβράνη έχει «τροποποιηθεί» με anti-HBs (A, B), anti-HBe (C, D) και HBsAg (E, F), πριν από (A, C, E) και μετά από (B, D, F) την επεξεργασία με HBsAg, HBeAg και anti-HBs αντίστοιχα.

## 9.5 Αποκρίσεις των βιοαισθητήρων βασισμένων σε κύτταρα Vero των οποίων η μεμβράνη δεν τροποποιήθηκε, στους HBV (HBsAg) και HCV

Η αντίδραση των βιοαισθητήρων BERA, οι οποίοι παρασκευάστηκαν με μη τροποποιημένα κύτταρα Vero, δεν οδήγησε σε εξειδικευμένη αντίδραση, σε σχέση με τον υπό εξέταση ιό, όμως η σχέση μεταξύ των τιμών της μεταβολής του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης τη χρονική στιγμή  $t = 45 \text{ sec}$ , για κάθε δείγμα φαίνεται να είναι γραμμική.

Το εν λόγω συμπέρασμα ισχύει και για τους δύο ιούς, με  $R^2=0,95$  στην περίπτωση του HBV (HBsAg(+)) και  $R^2=0,99$  στην περίπτωση του HCV, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 15.



**Διάγραμμα 15.** Απόκριση βιοαισθητήρων BERA κατά την παρουσία των HBsAg (HBV) και HCV. Ο αισθητήρας είναι βασισμένος σε κύτταρα Vero η μεμβράνη των οποίων δεν έχει τροποποιηθεί. Η απόκριση των βιοαισθητήρων εκφράζεται ως η μέση μέγιστη μεταβολή την χρονική στιγμή  $t=45\text{sec}$

Λαμβάνοντας όμως υπόψη τις ιδιαίτερα χαμηλές τιμές απόκρισης της τάξεως  $-7,0 \times 10^{-5} \text{V}$  έως  $-3,5 \times 10^{-5} \text{V}$  και δεδομένου ότι δεν υφίσταται διαχωρισμός, ως προς την απόκριση πάντα, μεταξύ δειγμάτων του HBV

και HCV, δεν μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η προαναφερθείσα αντίδραση των κυττάρων Vero είναι αποτέλεσμα της παρουσίας των δύο ιών, συνεπώς τα μη τροποποιημένα κύτταρα με την υπάρχουσα διάταξη βιοαισθητήρα δεν φαίνεται μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανίχνευση ηπατικών ιών.

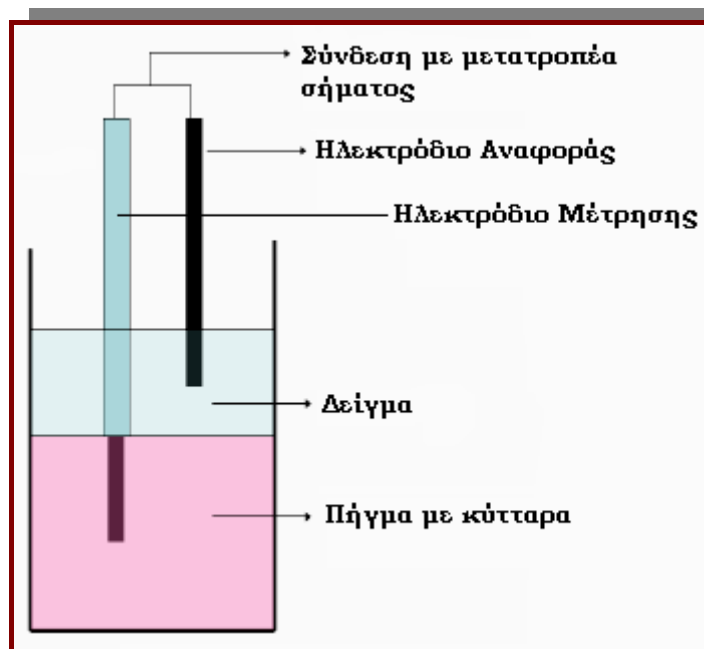
## **9.6 Εφαρμογή της μεθόδου BERA στην ανίχνευση των ιών: του Μωσαϊκού της Αγγουριάς (*Cucumber mosaic virus*), του Κροταλισμού του Καπνού (*Tobacco rattle virus*) και του Υ της πατάτας (*Potato virus Y*)**

Χρονικά η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στο παρόν κεφάλαιο έλαβε χώρα τελευταία, καθώς η δομή του βιοαισθητήρα BERA που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαφορετική όπως θα περιγραφεί κατωτέρω. Το σύστημα βιοαισθητήρα που παρουσιάζεται χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη σταθερότητα συγκριτικά με τα προαναφερθέντα συστήματα και σε σχέση με την απόκριση του κατά τον έλεγχο των δειγμάτων. Αποτελεί ένα σύστημα υψηλής απόδοσης (high throuput), ενώ για συντομία αναφέρεται ως BERA-HTP.

Η διαδικασία μέτρησης της μεταβολής του δυναμικού της μεμβράνης των κυττάρων του βιοαισθητήρα περιλαμβάνει μικρότερο αριθμό χειρισμών και παρεμβάσεων από την πλευρά του χειριστή, αφού οι βιοαισθητήρες βρίσκονται αποθηκευμένοι σε πλάκα ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay), σε σταθερή θέση και η εφαρμογή των δειγμάτων λαμβάνει χώρα άμεσα χωρίς χρόνους αναμονής απ' ευθείας με τη χρήση μικροπιπέτας, η δε επαφή των ηλεκτροδίων γίνεται αυτόματα από το σύστημα, επιτυγχάνοντας ομοιομορφία ως προς τη βύθιση του ηλεκτροδίου στον βιοαισθητήρα και κατ' επέκταση στην ακρίβεια της μέτρησης. Στο Σχήμα 20 απεικονίζεται η επιμέρους δομή του βιοαισθητήρα BERA που χρησιμοποιήθηκε.

Τα ηλεκτρόδια του βιοαισθητήρα ήταν κατασκευασμένα από τιτάνιο. Επισημαίνεται ότι οι αντίστοιχοι αγωγοί των βιοαισθητήρων που

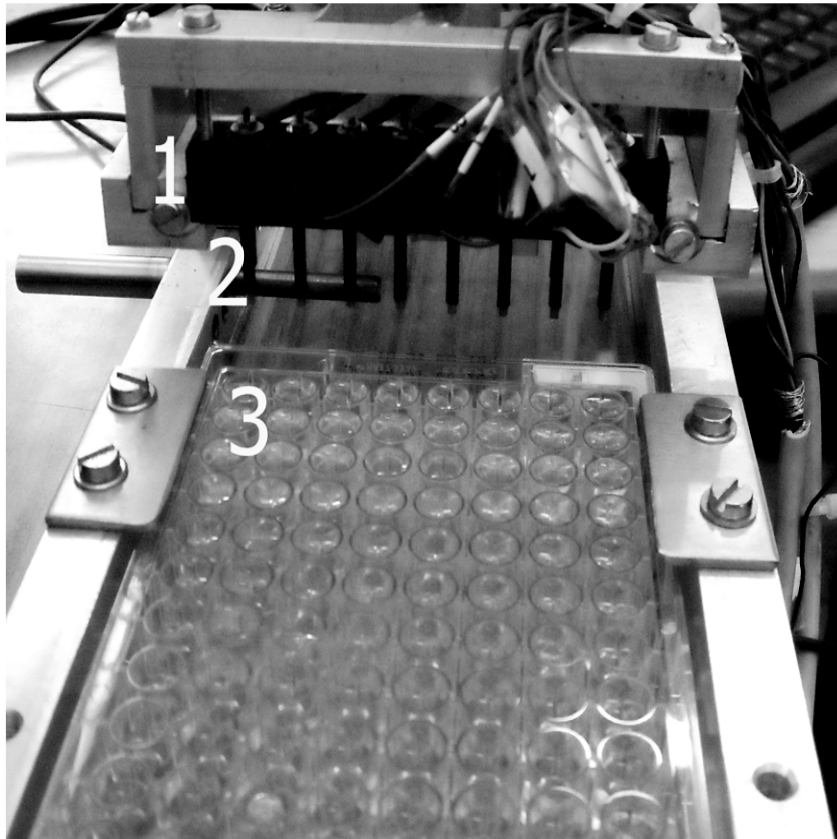
χρησιμοποιήσαμε στις προαναφερθείσες πειραματικές διαδικασίες ήταν κατασκευασμένα από άργυρο και χρυσό, ελεύθεροι οξυγόνου (oxygen free) και πάχους 2 x 0,5mm.



**Σχήμα 20.** Σχηματική διάταξη συστήματος βιοαισθητήρα BERA, στην οποία απεικονίζεται η σειρά συνδεσμολογίας των επιμέρους στοιχείων του βιοαισθητήρα. Το ηλεκτρόδιο μέτρησης καλύπτεται από μονωτικό υλικό ώστε να αποφεύγεται η επαφή του με το δείγμα.

Η γενική άποψη του συστήματος κατά τη διάρκεια της μέτρησης φαίνεται στην Φωτογραφία 12, όπου διακρίνονται αναλυτικά τα επιμέρους τμήματα του βιοαισθητήρα, όπως η πλάκα ELISA με τους αισθητήρες και τα δείγματα και η σειρά των ηλεκτροδίων.

Διακρίνεται η πλάκα ELISA στις θέσεις της οποίας βρίσκονται εγκλωβισμένα σε πήγμα Bacto Agar τα «τροποποιημένα» κύτταρα Vero. Στην επιφάνεια των αισθητήρων τοποθετείται το προς ανάλυση δείγμα. Η εν λόγω διάταξη αποτελεί ένα στάδιο πριν την πλήρη αυτοματοποίηση του βιοαισθητήρα BERA, όπου περιορίζονται στο ελάχιστο οι παρεμβάσεις και οι χειρισμοί του χειριστή όπως προαναφέρθηκε, μειώνοντας στο ελάχιστο τα σφάλματα, αλλά και το «θόρυβο» κατά τις μετρήσεις.



**Φωτογραφία 12.** Απεικόνιση της διάταξης του συστήματος βιοαισθητήρα BERA-HTP, στην οποία εμφανίζεται η συνολική δομή και τα επιμέρους στοιχεία του βιοαισθητήρα κατά τη διαδικασία της μέτρησης και ελέγχου των δειγμάτων. Με την παρούσα διάταξη είναι δυνατή η ταυτόχρονη μέτρηση 7 δειγμάτων. Οι μεταβολές του δυναμικού μετρώνται με τη βοήθεια του «οδηγού» **(1)**, ο οποίος διαθέτει 8 ζεύγη ηλεκτροδίων **(2)**, καθένα από τα οποία αντιστοιχεί σε ένα από τα 8 «πηγαδάκια» (wells) της πλάκας ELISA **(3)**. Κάθε ζεύγος ηλεκτροδίων διαθέτει δύο ηλεκτρόδια τιτανίου με διαφορετικό μήκος. Το μεγαλύτερο σε μήκος που είναι το ηλεκτρόδιο μέτρησης και το οποίο είναι μονωμένο στο μεγαλύτερο μήκος του, εισάγεται στο πήγμα που περιέχει τα κύτταρα, ενώ το μικρότερο βυθίζεται στο διάλυμα του δείγματος, πάνω από το πήγμα. Τα δύο ηλεκτρόδια συνδέονται με ένα μετατροπέα σήματος PMD 1608-FS

Επίσης ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου τύπου βιοαισθητήρα αποτελεί το γεγονός ότι κατασκευαστικά όπως και στους προηγούμενους τύπους το κόστος είναι ιδιαίτερα χαμηλό, ενώ τα απαιτούμενα εργαστηριακά αναλώσιμα, βρίσκονται ήδη σε χρήση από άλλες μεθόδους, μειώνοντας περαιτέρω το κόστος της μεθόδου.

### **9.6.1 Υλικά και Μέθοδοι**

Οι αρχικές καλλιέργειες κυττάρων Vero προήλθαν από την LGC Promochem (Teddington, UK). Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των βιοαισθητήρων προήλθαν από αναπαραγωγή των αρχικών καλλιεργειών στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τον Ammerman, N.C. (2008).

Τα αντιδραστήρια αλβουμίνη ορού βοός (BSA), ι-γλουταμίνη και propidium iodide προήλθαν από την Invitrogen (Carlsbad, CA), ενώ τα υπόλοιπα αντιδραστήρια από την Fluka (Buchs, Switzerland). Οι μολυσμένοι από τους σχετικούς ιούς φυτικοί ιστοί, οι απομονώσεις των ιών καθώς και τα ομόλογα πολυκλωνικά αντισώματα προήλθαν από το Εργαστήριο Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου

### **9.6.2 Παρασκευή βιοαισθητήρων για την ανίχνευση φυτικών ιών**

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την εισαγωγή των αντισωμάτων στην επιφάνεια της μεμβράνης των κυττάρων Vero ήταν πανομοιότυπο με εκείνο που χρησιμοποιήθηκε στις προαναφερθείσες εφαρμογές για την ανίχνευση φυτικών ιών.

### **9.6.3 Ηλεκτροεισαγωγή αντισωμάτων στην κυτταρική μεμβράνη**

Παρασκευάστηκαν τρεις σειρές «τροποποιημένων» κυττάρων Vero με ηλεκτροεισαγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων του PVY (αισθητήρας A), του TRV (αισθητήρας B) και του CMV (αισθητήρας C) αντίστοιχα. Για την ηλεκτροεισαγωγή των αντισωμάτων ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράψαμε και στις προηγούμενες εφαρμογές.



#### **9.6.4 Προετοιμασία των βιοαισθητήρων**

Ακολούθησε ανάμειξη των τροποποιημένων κυττάρων με 1% (w/v) Bacto-agar και στη συνέχεια το μίγμα κατανέμεται στις μικροκοιλότητες μιας πλάκας ELISA (150μl / well).

Συνεπώς κάθε μικροκοιλότητα αποτελεί έναν πλήρως λειτουργικό βιοαισθητήρα, ο οποίος περιλαμβάνει περίπου  $15 \times 10^3$  κύτταρα (προσδιορισμός με οπτική μικροσκοπία). Ακολουθώντας την εν λόγω διαδικασία μπορούμε να παρασκευάσουμε 96 (8 x 12) βιοαισθητήρες ανά ώρα. Κάθε μικροκοιλότητα αποτελεί έναν εξειδικευμένο στο να αντιδρά στην παρουσία ιού βιοαισθητήρα, ανάλογα με τα αντισώματα τα οποία φέρονται στην επιφάνεια των κυττάρων που τον αποτελούν.

#### **9.6.5 Καταγραφή και επεξεργασία δεδομένων**

Κάθε βιοαισθητήρας (μικροκοιλότητα) συνδέθηκε με τα δύο ηλεκτρόδια μέτρησης και αναφοράς, κατασκευασμένα από τιτάνιο όπως φαίνεται και στην Φωτογραφία 12. Στη σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού βιοαισθητήρα BERA (Σχήμα 20), το ηλεκτρόδιο αναφοράς έρχεται σε επαφή με το δείγμα, ενώ αντίστοιχα το μονωτικό υλικό που περιβάλλει το ηλεκτρόδιο μέτρησης εμποδίζει οποιαδήποτε επαφή του με το δείγμα, συνεπώς οποιαδήποτε μεταβολή «διέρχεται» μέσω το εν λόγω ηλεκτροδίου αφορά αποκλειστικά μεταβολή που συνδέεται με την αντίδραση της μεμβράνης των κυττάρων του βιοαισθητήρα με το δείγμα.

Τα δύο ηλεκτρόδια αναφοράς και μέτρησης συνδέονται με μια κάρτα PMD 1608FS A/D (Measurement Computing, Middleboro, MA). Η καταγραφή των μετρήσεων και η επεξεργασία έγινε με το λογισμικό InstaCal® (Measurement Computing).

Σε κάθε δοκιμή, το σύστημα βιοαισθητήρων βυθίζεται σε δείγμα όγκου 200 μL. Η απόκριση κάθε αισθητήρα υπολογίστηκε με την καταγραφή της μέσης τιμής της μεταβολής του δυναμικού της μεμβράνης των κυττάρων που περιλαμβάνονται στον βιοαισθητήρα για χρονική περίοδο 330 sec μετά από την εφαρμογή του δείγματος.

### 9.6.6 Μέθοδος ανίχνευσης των ιών

Ιοί σε καθαρή μορφή (PVY, TRV και CMV), οι οποίοι προήλθαν από το εργαστήριο Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου διαλύθηκαν σε 1x PBS ( $1\text{mgml}^{-1}$ ) σε συγκεντρώσεις  $206\mu\text{gml}^{-1}$ ,  $4.2\mu\text{gml}^{-1}$  και  $25\mu\text{gml}^{-1}$  αντίστοιχα. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε από όλα τα διαλύματα καθαρού ιού αντίστοιχα διάλυμα βασικής συγκέντρωσης της τάξεως  $4.2\mu\text{gml}^{-1}$ .

Τα δείγματα ιών από μολυσμένους ιστούς παρασκευάστηκαν από φύλλα καπνού τα οποία είχαν μολυνθεί τεχνητά με PVY ή TRV ή CMV.

Σε επόμενο στάδιο συνδυασμός ανά δύο των εν λόγω ιών χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση του ιδίου φυτού σύμφωνα με τους συνδυασμούς PVY-TRV, PVY-CMV και TRV-CMV, ώστε να μελετηθεί η ικανότητα διάκρισης μεταξύ ιών στον ίδιο δείγμα ιστού από τον βιοαισθητήρα BERA. Για τις εν λόγω μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε βελτιωμένη έκδοση του βιοαισθητήρα που περιγράψαμε ανωτέρω, ο οποίος ενσωμάτωσε σημαντικές βελτιώσεις τόσο στο ηλεκτρονικό τμήμα του, όσο και στο χρησιμοποιούμενο λογισμικό, επιτυγχάνοντας κατά αυτό τον τρόπο την βελτίωση της ευαισθησίας του λαμβανομένου σήματος και την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, διατηρώντας στο ίδιο επίπεδο το όριο ανίχνευσης του οργάνου.

Η παρουσία των ιών στους ιστούς αξιολογήθηκε ημιποσοτικά με τη μέθοδο DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-ELISA). Η διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων περιελάμβανε τις εξής διαδικασίες:

- Ομογενοποίηση του φυτικού ιστού σε 1:10 (w/v) PBS-Tween το οποίο περιείχε 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone 40.
- Φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 5 λεπτά.
- Τα δείγματα ιστών όπως και τα δείγματα καθαρού ιού παρασκευάστηκαν με διάλυση των σωματιών των ιών σε PBS σύμφωνα με τις ακόλουθες αραιώσεις: 1:10, 1:100, 1:1.000 και 1:10.000.

### 9.6.7 Πειραματικός σχεδιασμός

Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Χρησιμοποιήθηκαν 80 συνδυασμοί για κάθε δείγμα (4 συγκεντρώσεις ιού x 20 δείγματα για κάθε μία). Αντίστοιχα για κάθε δείγμα προερχόμενου από μολυσμένους με τον ιό ιστούς, έλαβαν χώρα 15 επαναλήψεις.

## 9.7 Αποκρίσεις των βιοαισθητήρων στους ιούς του Μωσαϊκού της Αγγουριάς (*Cucumber mosaic virus*), του Κροταλισμού του Καπνού (*Tobacco rattle virus*) και του Υ της πατάτας (*Potato virus Y*)

### 9.7.1 Δείγματα καθαρού ιού

Η απόκριση των βιοαισθητήρων BERA σε δείγματα καθαρού ιού απεικονίζεται στο Διάγραμμα 16. Το δείγμα ελέγχου (μάρτυρας) το οποίο δεν περιείχε ιό (διάλυμα PBS 1x), όπως φαίνεται και στο διάγραμμα μας έδωσε μια σταθερή απόκριση  $96,7 \times 10^{-4}V \pm 4,3 \times 10^{-4}V$ . Το πρότυπο απόκρισης στην περίπτωση και των τριών ιών (PVY, TRV και CMV) ήταν παρόμοιο.

Οι βιοαισθητήρες αποκρίθηκαν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις ομόλογου με τα αντισώματα που έφεραν ιού (PVY ή TRV ή CMV) με μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης των κυττάρων τους, ένδειξη για το οποίο αποτελεί η αρνητική αύξηση του δυναμικού του βιοαισθητήρα.

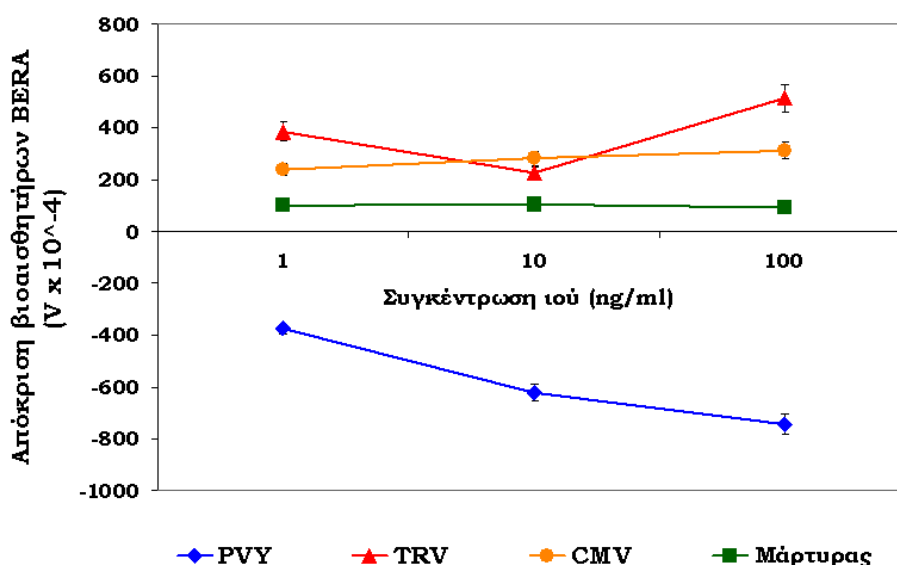
Αντιθέτως η απόκριση των βιοαισθητήρων ήταν θετική ως προς το δυναμικό για το δείγμα ελέγχου και τους μη ομόλογους ιούς, εκτός από την περίπτωση του εξειδικευμένου στον TRV βιοαισθητήρα, όπου κατά τον έλεγχο σε δείγματα τα οποία περιείχαν τον PVY το δυναμικό που παράχθηκε ήταν επίσης αρνητικό αλλά σημαντικά υψηλότερο σε σχέση με το αντίστοιχο των δειγμάτων ομόλογου ιού (TRV).

Ειδικότερα για τους PVY και CMV κατά την αλληλεπίδραση με τα ομόλογα αντισώματα των βιοαισθητήρων BERA η απόκριση είχε γραμμικό χαρακτήρα, γεγονός το οποίο αποτελεί σοβαρή ένδειξη ότι η

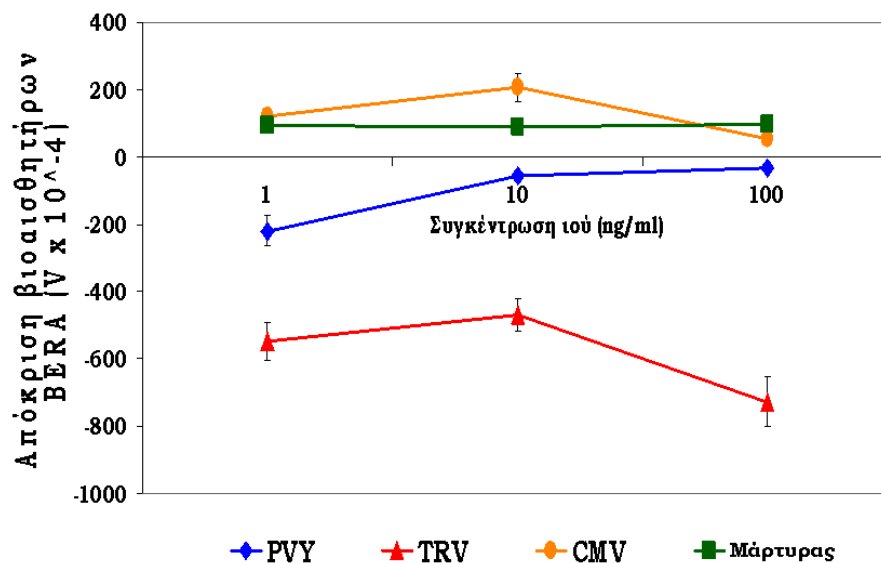
μεταβολή του δυναμικού των κυττάρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης του ιού, με  $r^2 = 0.96$  και  $r^2 = 0.99$  αντίστοιχα. Συνεπώς υπάρχει η δυνατότητα με το παρόν σύστημα βιοαισθητήρα, ποσοτικού προσδιορισμού του ιού για τουλάχιστον περιορισμένο εύρος συγκεντρώσεων του μέχρι  $1\text{ngml}^{-1}$ .

Η αντίδραση του εξειδικευμένου στον TRV βιοαισθητήρα στην παρουσία του TRV είχε μια απόκλιση της τάξεως του 3 έως 10% από τον μέσο όρο, αλλά ακολουθούσε και αυτή συγκεκριμένο πρότυπο, το οποίο όμως δεν ήταν σε καμία περίπτωση γραμμικό, όπως στην περίπτωση των άλλων δύο βιοαισθητήρων. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις δεν επιτευχθεί εξειδικευμένη αντίδραση για αραιώσεις του ιού μεγαλύτερες από  $0,1\text{ngml}^{-1}$ .

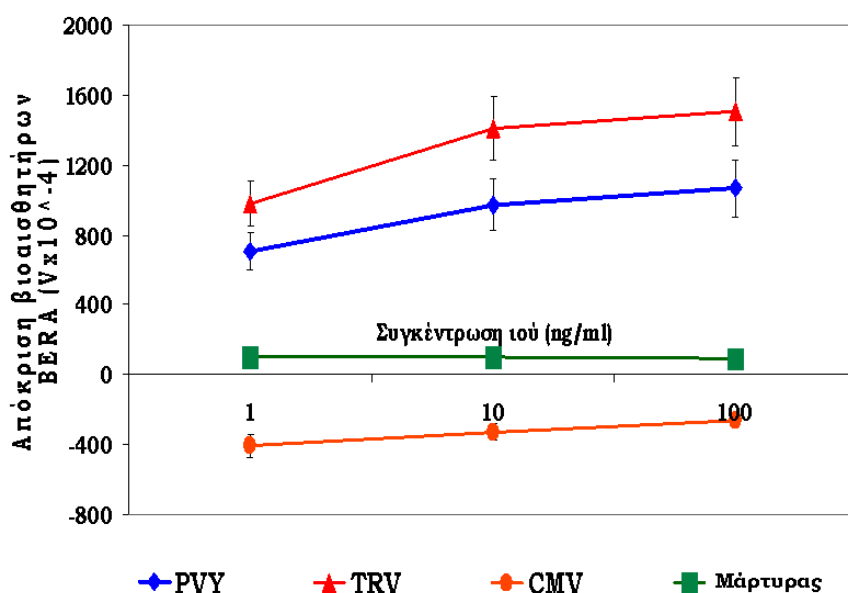
Στο Διαγράμμα 16 απεικονίζονται οι αποκρίσεις των βιοαισθητήρων οι οποίοι βασίστηκαν σε ακινητοποιημένα κύτταρα, στην μεμβράνη των οποίων είχαν εισαχθεί πολυκλωνικά αντισώματα των ιών PVY ή TRV ή CMV, όπου ως βιοαισθητήρας (Α) περιλαμβάνει anti-PVY αντισώματα, (Β) anti-TRV αντισώματα και (Γ) anti-CMV αντισώματα. Η απόκριση του βιοαισθητήρα εκφράζεται ως μέση μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης των ακινητοποιημένων κυττάρων.



Διάγραμμα 16Α



**Διάγραμμα 16B**



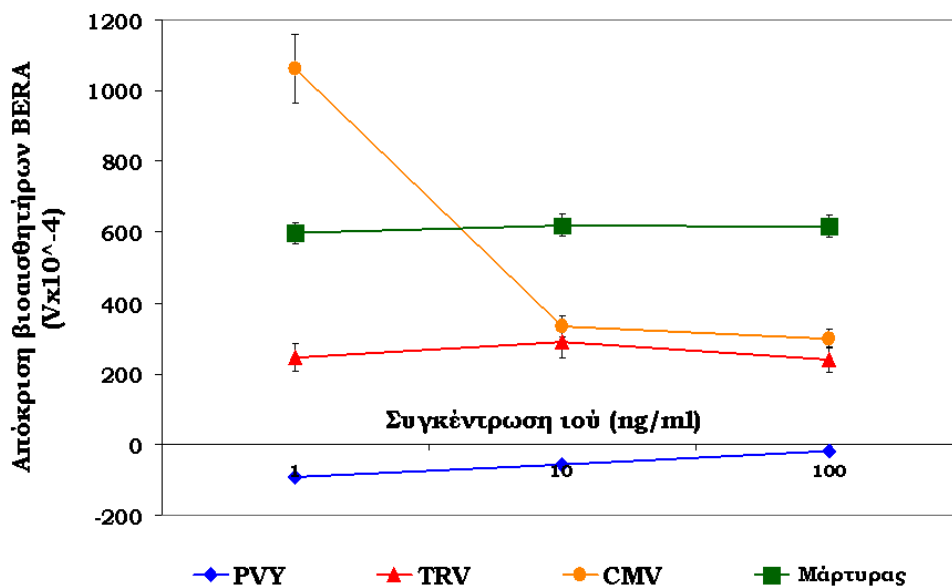
**Διάγραμμα 16Γ**

**Διάγραμμα 16.** Απόκριση βιοαισθητήρα σε δείγματα σε δείγματα καθαρού ιού PVY ή TRV ή CMV ή διαλύματος PBS 1x (Μάρτυρας). Ο βιοαισθητήρας βασίστηκε σε ακινητοποιημένα κύτταρα, στην μεμβράνη των οποίων είχαν εισαχθεί πολυκλωνικά αντισώματα του PVY **(Α)**, TRV **(Β)** και CMV **(Γ)**. Η απόκριση των βιοαισθητήρων στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ομόλογου ιού (1, 10, 100 ngml<sup>-1</sup>) εκφράζεται με την μείωση του δυναμικού τους (αρνητικό δυναμικό). Αντίθετα θετικό δυναμικό του αισθητήρα παρατηρείται για το μάρτυρα (δείγμα χωρίς ιό) και για τα δείγματα μη ομόλογων ιών ( $n = 20$  επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση)

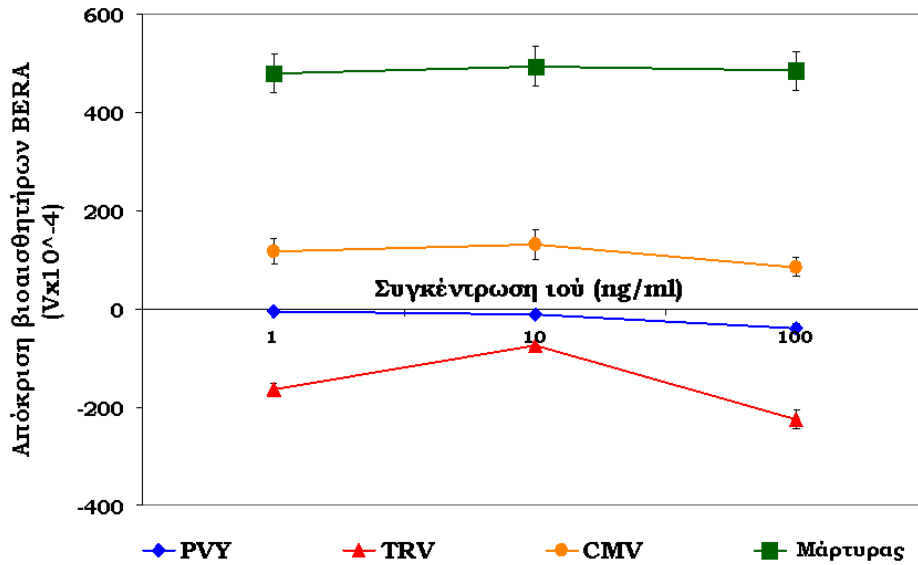
### 9.7.2 Δείγματα τεχνητά μολυσμένων από ιό ιστών

Η απόκριση των βιοαισθητήρων σε δείγματα φυτικών ιστών τα οποία είχαν τεχνητά μολυνθεί από ιούς παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 17. Η απουσία ιού στο δείγμα (μάρτυρας) είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενός σταθερού σήματος, το επιτεύχθηκε και από τους τρεις βιοαισθητήρες. Το δε πρότυπο απόκρισης (PVY, TRV και CMV) για όλους τους ιούς ήταν παρόμοιο.

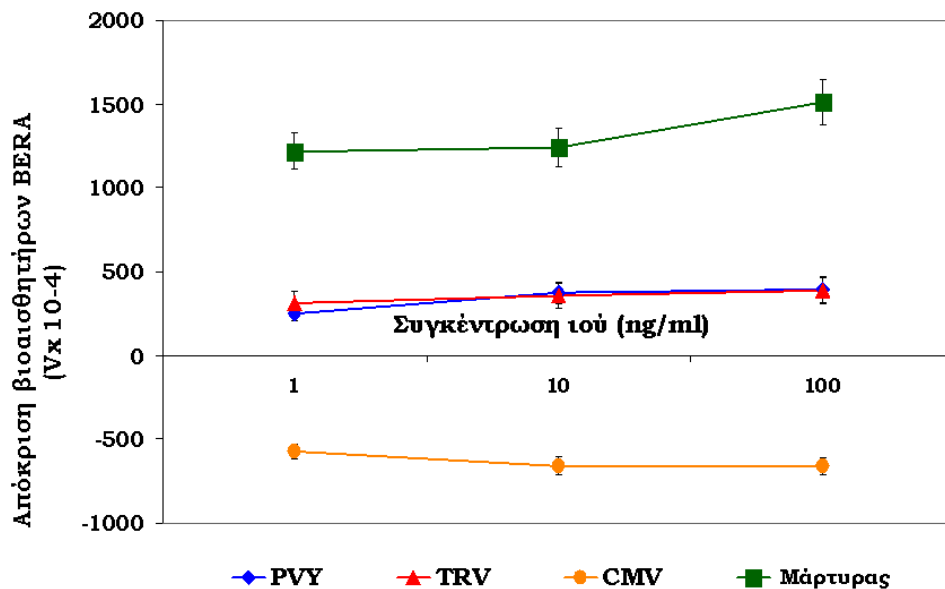
Οι αισθητήρες αποκρίθηκαν στις διαφορετικές αραιώσεις των ομολόγων ιών (PVY ή TRV ή CMV) με μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης των κυττάρων τους, όπως φαίνεται και από την αρνητική αύξηση του δυναμικού του βιοαισθητήρα. Αντιθέτως, η απόκριση του βιοαισθητήρα στην παρουσία του μάρτυρα καθώς και μη ομολόγων ιών εκφράστηκε με θετική αύξηση του δυναμικού, με εξαίρεση τα δείγματα PVY, όπου η αντίδραση σχετιζόταν άμεσα με την συγκέντρωση του ιού στο δείγμα ακολουθώντας ένα γραμμικό πρότυπο ( $r^2=0.99$ ), συνεπώς υπάρχει η δυνατότητα του ποσοτικού προσδιορισμού του ιού με το υπάρχον σύστημα για συγκεντρώσεις μέχρι και  $1\text{ngml}^{-1}$  (Διάγραμμα 17Α).



Διάγραμμα 17Α



**Διάγραμμα 17B**



**Διάγραμμα 17Γ**

**Διάγραμμα 17.** Απόκριση βιοαισθητήρων σε δείγματα τεχνητώς μολυσμένων με PVY ή TRV ή CMV ή υγιή φυτά καπνού (Μάρτυρας). Οι βιοαισθητήρες βασίστηκαν σε ακινητοποιημένα κύτταρα, στην μεμβράνη των οποίων είχαν εισαχθεί πολυκλωνικά αντισώματα του PVY **(Α)** ή TRV **(Β)** ή CMV **(Γ)** αντίστοιχα. Η απόκριση των βιοαισθητήρων στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ομόλογου ιού (1, 10, 100 ngml<sup>-1</sup>) εκφράζεται με την μείωση του δυναμικού τους (αρνητικό δυναμικό). Αντίθετα θετικό δυναμικό του αισθητήρα παρατηρείται για το μάρτυρα (δείγμα χωρίς ιό) και για τα δείγματα μη ομόλογων ιών. ( $n = 20$  επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση)

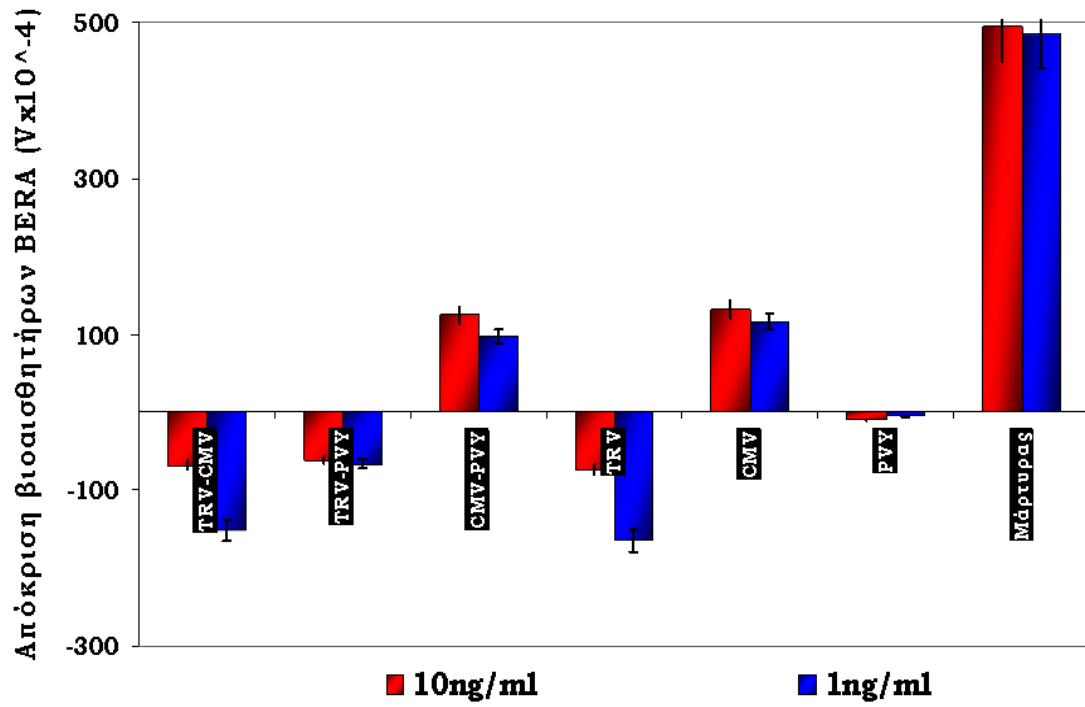
Όπως και στην περίπτωση των δειγμάτων καθαρού ιού δεν υπήρξε διακριτή απόκριση των βιοαισθητήρων για αραιώσεις μεγαλύτερες από προαναφερθείσα, συνεπώς στην παρούσα μελέτη το κατώφλι ανίχνευσης που επετεύχθη ήταν της τάξεως του  $1\text{ngml}^{-1}$ .

Ως προς την ικανότητα του βιοαισθητήρα BERA να διακρίνει την παρουσία ενός ιού όταν αυτός βρίσκεται σε φυτικό οργανισμό ο οποίος έχει μολυνθεί και από άλλο ιό, τα αποτελέσματα ήταν θετικά κατά τον έλεγχο βιοαισθητήρων εξειδικευμένων στην ανίχνευση των TRV και CMV. Το Διάγραμμα 18 απεικονίζει την απόκριση των αισθητήρων BERA σε δείγματα ιστών προερχόμενα από φυτά καπνού τα οποία είχαν μολυνθεί με περισσότερους του ενός ιούς.

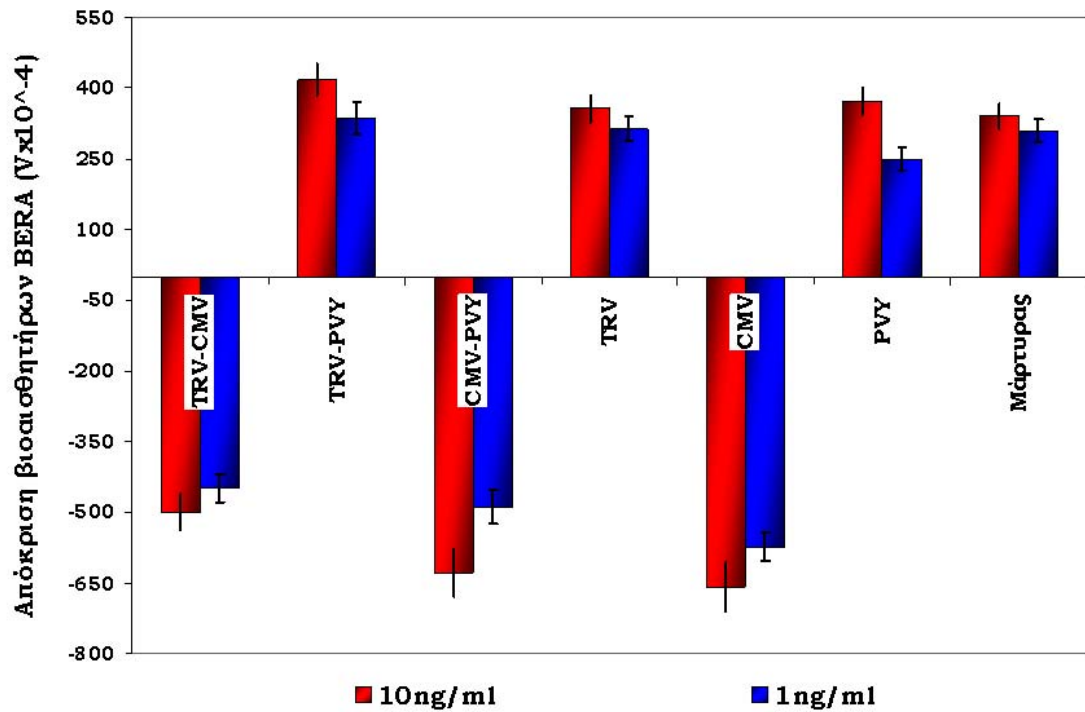
Τα αποτελέσματα ήταν ανάλογα με εκείνα που παρατηρήθηκαν κατά τον έλεγχο καθαρού ιού σε διάλυμα καθώς και δειγμάτων από ιστούς τεχνητώς μολυσμένους. Συγκεκριμένα, η παρουσία ομόλογου ιού προκάλεσε αρνητική αύξηση του δυναμικού του βιοαισθητήρα. Αντιθέτως η απόκριση του βιοαισθητήρα στην παρουσία του μάρτυρα καθώς και μη ομόλογων ιών εκφράστηκε με θετική αύξηση του δυναμικού.

Κατά την παρουσία δύο ιών (ομόλογου και μη) σε δείγμα καπνού (Διαγράμματα 18Α και 18Β) παρατηρήθηκε αρνητική αύξηση του δυναμικού, λιγότερο έντονη όμως σε σχέση με εκείνη κατά την παρουσία μόνο του ομόλογου ιού, αποτέλεσμα που πιθανόν σχετίζεται με την «μηχανική» παρεμπόδιση του μη ομόλογου ιού, ενώ δεν επηρεάζει την απόκριση του βιοαισθητήρα ο ξενιστής του ιού, όπως αποδείχθηκε κατά το έλεγχο δειγμάτων κολοκυνθοειδών τα οποία είχαν τεχνητώς μολυνθεί με ιό CMV (ομόλογος ιός) και CGMMV (ετερόλογος ιός), όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 18Γ.

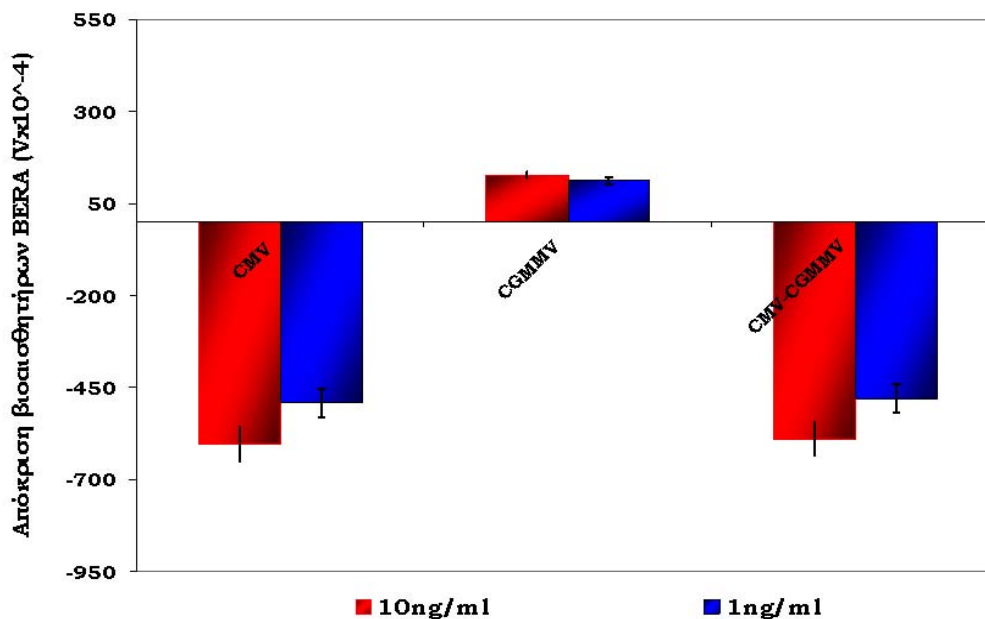




Διάγραμμα 18A



Διάγραμμα 18B



**Διάγραμμα 18Γ**

**Διάγραμμα 18.** Απόκριση βιοαισθητήρα εξειδικευμένου στην ανίχνευση του TRV (A) και CMV (B) σε δείγματα τεχνητώς μολυσμένων με PVY ή TRV ή CMV ή συνδυασμό αυτών και σε υγιή φυτά καπνού (Μάρτυρας). Ο βιοαισθητήρας βασίστηκε σε ακινητοποιημένα κύτταρα, στην μεμβράνη των οποίων είχαν εισαχθεί πολυκλωνικά αντισώματα του TRV (A) ή του CMV (B). Το διάγραμμα **18Γ** αναφέρεται σε κολοκυνθοειδή τα οποία έχουν μολυνθεί είτε με CMV είτε με CGMMV ή με συνδυασμό αυτών. Χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεντρώσεις του δείγματος 1 και 10 ngml<sup>-1</sup> (n = 20 επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση)

## 9.8 Ανάπτυξη αμπερομετρικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του ιού Y της πατάτας – Συγκριτική μελέτη με τους βιοαισθητήρες BERA

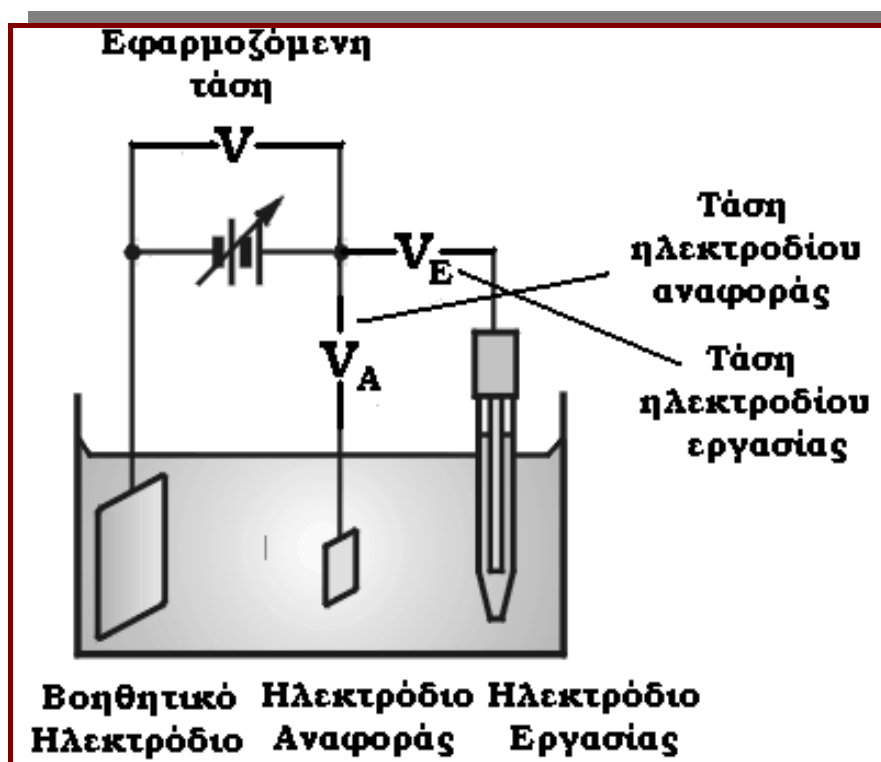
Αναπτύχθηκε αμπερομετρικός αισθητήρας εξειδικευμένος στην ανίχνευση του PVY και μελετήθηκε η απόδοση του σε σχέση με τον αντίστοιχο βιοαισθητήρα BERA. Η διάταξη του αισθητήρα καθώς και η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα σύμφωνα με υπάρχον τροποποιημένο πρωτόκολλο (Rao et al., 2005).

### 9.8.1 Υλικά και εξοπλισμός

Για την κατασκευή του χρησιμοποιήθηκε ο ποτενσιοστάτης PG581 της εταιρείας Uniscan, ενώ για τους σκοπούς του πειράματος κατασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρόδια από ίνες άνθρακα, ως ηλεκτρόδια εργασίας.

Η ανάκτηση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων έλαβε χώρα με τη χρήση του λογισμικού UiEChem™ της ίδιας εταιρείας. Με το εν λόγω λογισμικό υπάρχει η δυνατότητα υλοποίησης ενός πειράματος «χρονοαμπερομέτρησης» καθορίζοντας διαφορετικές παραμέτρους.

Αντίστοιχα το ηλεκτρόδιο αναφοράς ήταν ένα ηλεκτρόδιο Ag/AgCl, ενώ το βοηθητικό ηλεκτρόδιο ήταν ένα ηλεκτρόδιο κατασκευασμένο από πλατίνα (Σχήμα 21).



**Σχήμα 21.** Απεικόνιση ηλεκτρόλυσης με τη χρήση τριών ηλεκτροδίων. Το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας παρακολουθείται συνεχώς και έτσι διορθώνεται η εφαρμοζόμενη τάση ώστε να διατηρείται σε τιμή που έχουμε καθορίσει.

Πηγή: [http://www.chem.uoa.gr/courses/instrumental/instrumental\\_potanim.htm](http://www.chem.uoa.gr/courses/instrumental/instrumental_potanim.htm)

Με το σύστημα των τριών ηλεκτροδίων μπορούμε να παρακολουθήσουμε το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας. Εάν διαπιστωθεί ότι το δυναμικό αυτό αποκλίνει από την τιμή που έχουμε καθορίσει μεταβάλλεται η τιμή της εφαρμοζόμενης τάσης ώστε η τιμή του δυναμικού του ηλεκτροδίου εργασίας να επανέλθει στην τιμή που καθορίσαμε.

Η ηλεκτρόλυση όμως λαμβάνει χώρα μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων και όχι των τριών. Μεταξύ ηλεκτροδίου εργασίας και ηλεκτροδίου αναφοράς το φαινόμενο που λαμβάνει χώρα αποκαλείται ποτενσιομετρία, η ηλεκτρόλυση λαμβάνει χώρα μεταξύ ηλεκτροδίου εργασίας και βοηθητικού ηλεκτροδίου.

Για τα σκοπούς της πειραματικής διαδικασίας παρασκευάστηκε μία σειρά διαλυμάτων:

1. Διάλυμα BSA 3% σε Tris-HCl 0.2M. Το pH του διαλύματος το προσαρμόζουμε στην τιμή 7.2
2. Διάλυμα Tris-HCl 0.2M. Το pH του διαλύματος το προσαρμόζουμε στην τιμή 7.2
3. Ρυθμιστικό διάλυμα εθανοδιαμίνης (EDA), το οποίο περιλαμβάνει 0.1M εθανοδιαμίνη, 0.1M NaCl και 1mM MgCl<sub>2</sub>, το οποίο χρησιμοποιείται ως ηλεκτρολύτης κατά τη διάρκεια της αμπερομέτρησης. Το pH του διαλύματος το προσαρμόζουμε στην τιμή 9.8.
4. Διάλυμα 0.01M 1-naphthyl phosphate το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα της αντίδρασης
5. Σύζευγμα (conjugate) anti-PVY και αλκαλική φωσφατάση συγκέντρωσης 1μgml<sup>-1</sup>.
6. Καθαρός ιός PVY συγκέντρωσης 1mgml<sup>-1</sup>.

Το σύζευγμα και ο ιός (PVY) προήλθαν από το εργαστήριο Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

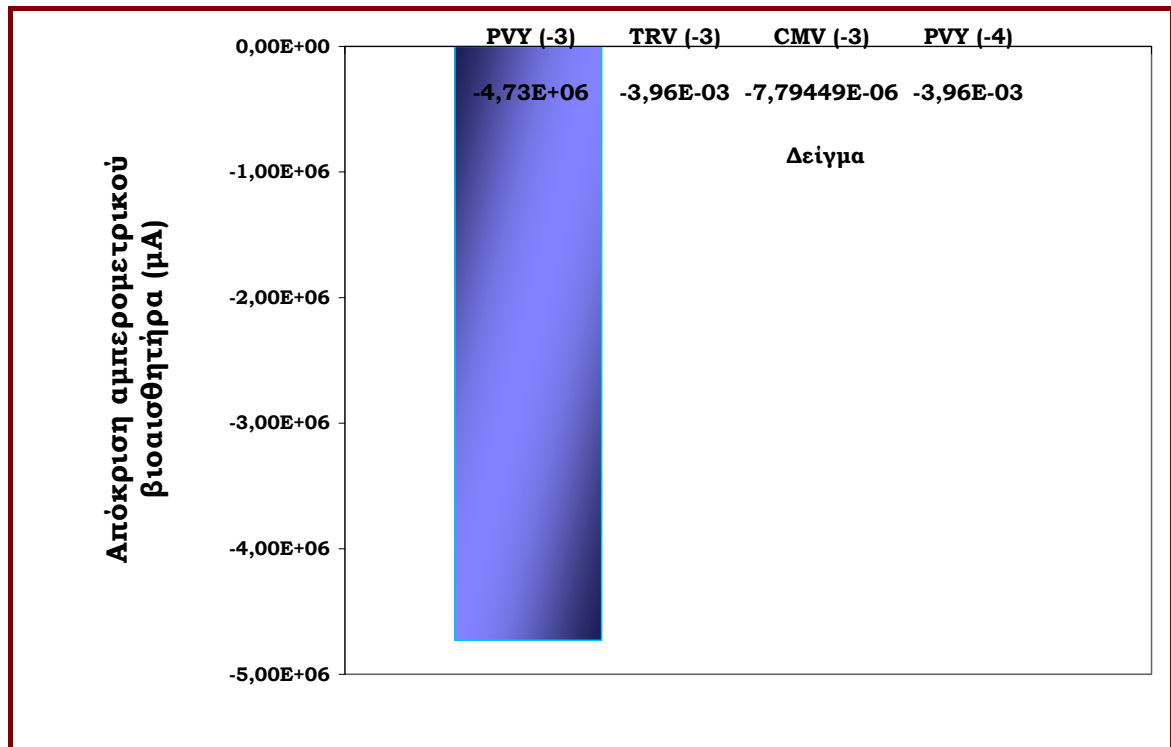
### **9.8.2 Διαδικασία Ελέγχου**

Το πρωτόκολλο της διαδικασίας ελέγχου αποτελούνταν από τα ακόλουθα βήματα (Rao et al., 2005).

1. Τοποθέτηση του ηλεκτροδίου εργασίας (ηλεκτρόδιο άνθρακα) για 15 λεπτά στο διάλυμα του ιού (PVY)
2. Ξέπλυμα με διάλυμα Tris-HCl
3. Φραγμός (block) του ηλεκτροδίου εργασίας με διάλυμα BSA
4. Ξέπλυμα με διάλυμα Tris-HCl
5. Επώαση με σύζευγμα για 5 λεπτά
6. Τοποθέτηση και βύθιση συστήματος ηλεκτροδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα EDA με παράλληλη δημιουργία σταθερών υδροδυναμικών συνθηκών με σταθερή ανάδευση
7. Εφαρμογή σταθερής τάσης 0.4V στο ηλεκτρόδιο αναφοράς και αναμονή μέχρι η ένταση του ρεύματος να σταθεροποιηθεί σε ένα κατώτερο επίπεδο
8. Προσθήκη του υποστρώματος και παρατήρηση της μεταβολής του ρεύματος

### **9.9. Αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης του αμπερομετρικού βιοαισθητήρα και των αισθητήρων BERA στην ανίχνευση του ιού Y της πατάτας**

Στο Διάγραμμα 19 απεικονίζεται η απόκριση του αμπερομετρικού αισθητήρα εξειδικευμένου στην ανίχνευση του PVY. Ο διαχωρισμός του θετικού για τον PVY δείγματος σε σχέση με τα μη θετικά (μάρτυρας και μη ομόλογοι ιοί) είναι σαφής, με όριο ανίχνευσης όμως υψηλότερο από το αντίστοιχο του βιοαισθητήρα BERA. Στην συγκεκριμένη περίπτωση προσδιορίστηκε στα  $10\text{ngml}^{-1}$ , ενώ το αντίστοιχο όριο ανίχνευσης του βιοαισθητήρα BERA προσδιορίστηκε στα  $1.0\text{ngml}^{-1}$ .



**Διάγραμμα 19.** Απόκριση αμπερομετρικού βιοαισθητήρα εξειδικευμένου στην ανίχνευση PVY, σε δείγματα καθαρού ιού PVY, TRV, CMV και διάλυμα 1x PBS (Control). Τα δείγματα των ιών αραιώθηκαν μέχρι συγκέντρωσης  $1\text{ngml}^{-1}$ , ενώ στην περίπτωση του PVY, χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεντρώσεις  $1\text{ngml}^{-1}$  και  $0,1\text{ngml}^{-1}$  (PVY(-4)), ώστε να ελεγχθεί το κατώτερο όριο ανίχνευσης ( $n = 10$  επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση)



**10.**

**Συμπεράσματα –  
Συζήτηση**





Η ανίχνευση ιών αποτελεί ένα πεδίο πρόκλησης, κυρίως αναφορικά με την ανάπτυξη νέων μεθόδων ελέγχου αλλά και βελτίωσης των υπάρχοντων μεθόδων, με τη χρήση μικροβιολογικών, βιοχημικών, βιοφυσικών, ανοσοβιολογικών, ορολογικών μεθόδων κλπ (Fung, D.Y.C., 1995).

Παρόλο που ερωτήματα όπως η χρησιμότητα, χαμηλό κόστος συντήρησης και συνεχής λειτουργία δεν είναι πάντοτε κρίσιμα, θα πρέπει να εξεταστούν κατά την ανάπτυξη κάθε νέου τύπου βιοαισθητήρα (Lazca et al., 2007).

Επίσης ιδιαίτερα στον τομέα των τροφίμων οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ανίχνευσης χαρακτηρίζονται από πολλά στάδια κατά την εφαρμογή της διαδικασίας ελέγχου και είναι χρονοβόρες. Η εναλλακτική λύση των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων φαίνεται πιο ελκυστική (Ivnitski et al., 2000).

Το κεφάλαιο το οποίο αναφέρεται στην ανίχνευση του CMV αποτέλεσε εξέλιξη της βασικής αρχής λειτουργίας του κυτταρικού βιοαισθητήρα BERA, λόγω των βελτιώσεων που επήλθαν ως προς το όριο ανίχνευσης και την επιλεκτικότητα του βιοαισθητήρα. Το όριο ανίχνευσης καθορίστηκε στο  $1-10\text{ngml}^{-1}$ , ενώ κατέστη σαφής η διάκριση του CMV από τον CGMMV.

Βασική υπόθεση όλων των πειραμάτων αποτέλεσε η αποδοχή της αρχής ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του ιού και των ομόλογων αντισωμάτων τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια της μεμβράνης των κυττάρων του βιοαισθητήρα. Η εν λόγω υπόθεση ενισχύθηκε από την παρατήρηση της μεταβολής του δυναμικού των μεμβρανών των κυττάρων, αλλά αντίστοιχα και της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου του κυτοπλάσματος, κατά την επαφή των βιοαισθητήρων με τα αντίστοιχα δείγματα των ομόλογων ιών.

Οι ανωτέρω μεταβολές δεν έλαβαν χώρα κατά την επαφή με τους μάρτυρες (control) ή με τα δείγματα μη ομόλογου ιού, προς τα αντισώματα των βιοαισθητήρων. Συνεπώς τα «τροποποιημένα» κύτταρα των βιοαισθητήρων BERA, κύτταρα δηλαδή στα οποία είχαν εισαχθεί με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης αντισώματα των υπό εξέταση ιών,

λειτουργήσαν ως πλατφόρμες αναγνώρισης / ανίχνευσης για τους ομόλογους ιούς.

Η ανάλυση δε της απόκρισης των κυττάρων, η οποία εκφράστηκε ως μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης, προσέδωσε στην μέθοδο ταχύτητα και ευαισθησία, συγκρινόμενη πάντα με τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την ανίχνευση ιών.

Με βάση πάντα τα αποτελέσματα η ανίχνευση του CMV κατέστη δυνατή μόνο ποιοτικά, ενώ αντίθετα στην περίπτωση του TRV τα αποτελέσματα και ως προς τον ποσοτικό προσδιορισμό ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά.

Μια σημαντική παρατήρηση ως προς την απόκριση του βιοαισθητήρα κατά την πειραματική διαδικασία με καθαρό CMV σε διάφορες συγκεντρώσεις, ήταν ότι σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των  $20\text{ngml}^{-1}$  η απόκριση μειώνεται. Πιθανόν η εν λόγω αντίδραση να οφείλεται σε υπερκορεσμό των αντισωμάτων από την παρουσία μεγάλου αριθμού σωματιδίων των ιών.

Κρίνοντας από τα πειραματικά δεδομένα θα πρέπει να υπάρχει ένα όριο ως προς τη μεταβολή του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης, που προκαλείται από την αντίδραση αντισώματος ιού. Είναι επίσης πιθανό να προκαλείται ένα είδος ηλεκτρομηχανικού stress στο σημείο της μεμβράνης όπου βρίσκεται το αντίσωμα, το οποίο προκαλεί μεταβολή στην περατότητα της και κατά συνέπεια μεταβάλλει την αγωγιμότητα της (Zigler et al., 1998).

Πολλά από τα προβλήματα που προαναφέραμε λύθηκαν με την βελτίωση του συστήματος βιοαισθητήρα για την ανίχνευση φυτικών ιών (BERA-HTP). Επετεύχθηκε επίσης η δημιουργία ενός συστήματος ημι-αυτοματοποιημένου, με δυνατότητες και ποσοτικού προσδιορισμού του προς εξέταση ιού, ενώ προσδιορίσθηκε με μεγαλύτερη ακρίβεια το όριο ανίχνευσης του βιοαισθητήρα BERA στο  $1\text{ngml}^{-1}$ .

Με το ίδιο σύστημα βιοαισθητήρα αποδείχθηκε ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί απόλυτα ο προσδιορισμός και η ανίχνευση ενός ιού, ο οποίος βρίσκεται στον ίδιο φυτικό ιστό με άλλον ιό, χωρίς να επηρεάζεται αισθητά η ευαισθησία της μεθόδου.

Η συγκριτική μελέτη του προαναφερθέντος βιοαισθητήρα BERA με αντίστοιχο αμπερομετρικό βιοαισθητήρα εξειδικευμένο στην ανίχνευση του PVY, μας απέδειξε την υπεροχή της BERA ως μεθόδου για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων ανίχνευσης ιών που προσβάλουν φυτικά είδη, τόσο ως προς την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, λειτουργικότητα αλλά κυρίως την ευαισθησία της, σημαντική παράμετρο για μια διαγνωστική μέθοδο.

Όπως στην περίπτωση των ιών που προσβάλουν φυτικά είδη (CMV και TRV), αντίστοιχα και στην περίπτωση των ιών της ηπατίτιδας, έγινε φανερό ότι είναι δυνατή η ανίχνευση αντιγόνων και αντισωμάτων του ιού Β της ηπατίτιδας (HBV), με τη χρήση κυτταρικών βιοαισθητήρων, βασισμένους σε κύτταρα των οποίων η μεμβράνη είχε τροποποιηθεί με την χρήση της μεθόδου της ηλεκτροπόρωσης και εισαγωγής σε αυτές των ομόλογων αντισωμάτων ή αντιγόνων.

Σε κάθε περίπτωση η βασική υπόθεση ήταν, ότι και σε αυτή την πειραματική εργασία η αλληλεπίδραση των αντισωμάτων της μεμβράνης και των σωματιδίων του ιού ή των αντιγόνων της μεμβράνης και των αντισωμάτων του δείγματος, προκαλεί μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης του κυττάρου (Moschoroulou et al., 2006; 2008; Perdikaris et al., 2009). Σημαντικές ενδείξεις για τη στήριξη της εν λόγω υπόθεσης αποτελούν, όπως και στα προαναφερθέντα πειράματα η απόκριση των κυττάρων Vero κατά την επαφή του βιοαισθητήρα με δείγμα ομόλογου αντισώματος ή αντιγόνου αλλά και η μεταβολή των ιόντων ασβεστίου. Αντίστοιχα, δεν έλαβε χώρα καμία μεταβολή με μη ομόλογα δείγματα ή με τους μάρτυρες.

Όπως προαναφέρθηκε οι αντιδράσεις μεταξύ μορίων που εδράζουν στην επιφάνεια της μεμβράνης και μορίων που περιέχονται στο προς ανάλυση δείγμα, προκαλούν μεταβολή της συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου, η οποία είναι ανιχνεύσιμη (Whelan et al., 2003).

Συνεπώς τα «τροποποιημένα» κύτταρα του βιοαισθητήρα και σε αυτή την περίπτωση λειτουργούν ως πλατφόρμες ανίχνευσης ομόλογων ιών, ενώ παράλληλα η ανάλυση των της απόκρισης του βιοαισθητήρα σε ενδεχόμενη μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης, προσδίδει στη

μέθοδο ταχύτητα και σε ορισμένες περιπτώσεις μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με άλλες ανοσοβιολογικές μεθόδους.

Η εκλεκτικότητα των βιοαισθητήρων εξαρτάται πάντα από την εξειδίκευση των αντισωμάτων ή των αντιγόνων που έχουν εισαχθεί στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Συνεπώς η περιγραφείσα μεθοδολογική προσέγγιση ενσωματώνει πολλά από τα μειονεκτήματα που εμφανίζουν και οι ορολογικές μέθοδοι. Παρόλα αυτά όμως η απόκριση του βιοαισθητήρα είναι ανεξάρτητη από παράγοντες που μειώνουν το πεδίο εφαρμογής των PTA (plate-tapped antigen) ορολογικών μεθόδων, όπως ο χρόνος επώασης (Mowat et al., 1987).

Ο βιοαισθητήρας επιτυχώς χρησιμοποιήθηκε στην ανίχνευση του HBV και των αντισωμάτων σε κλινικά δείγματα, παρουσιάζοντας εκλεκτικότητα αλλά και ικανοποιητικό βαθμό επαναληψιμότητας (11-17% απόκλιση). Η ανίχνευση του HBV με εξελιγμένα συστήματα βιοαισθητήρων συνεχώς κερδίζει έδαφος σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους. Πρόσφατα αναφέρθηκαν άνοσο-βιοαισθητήρες που μπορούν να ανιχνεύουν HBsAg και / ή anti-HBs σε επίπεδο nano ή ακόμη και σε pico συγκεντρώσεις, με ιδιαίτερα υψηλό ρυθμό ανάλυσης (Chung et al., 2005; Hassen et al., 2008; Yao et al., 2008; Zhang et al., 2007).

Οι συνηθισμένες διαδικασίες περιλαμβάνουν έκχυση του δείγματος και εναλλακτικά στάδια επώασης, συνολικής διάρκειας μεταξύ 30 και 200 λεπτών. Ο βιοαισθητήρας που στην παρούσα διατριβή παρουσιάζεται μπορεί να παράγει το ίδιο ή καλύτερα ποιοτικά αποτελέσματα ταχύτερα αναλογιζόμενη τη μικρή διάρκεια της διαδικασίας μέτρησης (45sec).

Συγκριτικά με τους οπτικούς και ηλεκτροχημικούς αισθητήρες, το σύστημα που παρουσιάσαμε έχει ένα επιπλέον πλεονέκτημα, είναι απλούστερο στη χρήση και η διαδικασία ανίχνευσης αποτελείται ουσιαστικά από ένα βήμα. Θα πρέπει όμως να επισημανθεί ότι αποτελεί ένα προκαταρκτικό βήμα για την ανάπτυξη ενός ολοκληρωμένου συστήματος βιοαισθητήρα, το οποίο θα βασίζεται σε κύτταρα των οποίων η μεμβράνη έχει τροποποιηθεί κατάλληλα, προσδίδοντας τους

εξειδίκευση ως προς το μόριο, χημική ένωση ή μικροοργανισμό που πρόκειται να αναλυθεί.

Σε σύγκριση με τις χρησιμοποιούμενες ορολογικές μεθόδους, η παρούσα μέθοδος εμφανίζει ευαισθησία 10-100 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με αισθητήρες που ενσωματώνουν αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων (Guo et al., 2007; Hassen et al., 2008; Ly et al., 2009). Από ένα μικρό αριθμό συγκριτικών δειγμάτων (25 δείγματα), με τη χρήση του περιγραφόμενου βιοαισθητήρα και της real time PCR γνωρίζουμε ότι η ευαισθησία του βιοαισθητήρα βρίσκεται στο επίπεδο των  $10^3$  ιϊκών αντιγράφων (viral copies)/ml. Σε επίπεδο συμβατικών ορολογικών μεθόδων όπως η ELISA, το όριο ανίχνευσης των HBsAg/HBeAg είναι περίπου 0,05 ng/ml. Στο σημείο όμως αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον ακριβή προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης.

Πιθανόν με την αύξηση του αριθμού των κυττάρων ανά αισθητήρα, να αυξηθεί και η ευαισθησία του ή αντίστοιχα με την αύξηση του αριθμού των αντισωμάτων ή αντιγόνων στην επιφάνεια της μεμβράνης των κυττάρων. Υπάρχει επίσης η δυνατότητα χρήσης του βιοαισθητήρα-HBV για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιού ή των αντισωμάτων του, όπως περιγράψαμε στην διαδικασία ανίχνευσης του TRV, όπου η απόκριση του βιοαισθητήρα σε σχέση με τη συγκέντρωση του ιού είναι σχεδόν γραμμική.

Όπως επίσης προαναφέρθηκε η μοριακή αναγνώριση σωματιδίων ιού με «τροποποιημένα» κύτταρα, βασίζεται σε ένα ηλεκτρομηχανικό stress στο σημείο αντίδρασης ιού / αντισώματος, το οποίο προκαλεί μεταβολές στην περατότητα της μεμβράνης και κατ' επέκταση στην αγωγιμότητα της.

Τα εν λόγω χαρακτηριστικά των εξειδικευμένων για την ανίχνευση του HBV βιοαισθητήρων BERA σε συνδυασμό με την αυξημένη διάρκεια ζωής τους, τους καθιστούν ένα πολύτιμο διαγνωστικό εργαλείο (Katsanakis et al., 2009).

Η σύγκριση «τροποποιημένων» και μη κυττάρων μας απέδειξε την βελτίωση της ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας της κυτταρικής

μεμβράνης, δίνοντας μας τη δυνατότητα να ανιχνεύσουμε την παρουσία και των δύο προς εξέταση ιών, HBV και ιδιαίτερα δε του HCV.

Επίσης η αντίδραση μεταξύ θετικών και αρνητικών δειγμάτων ήταν ιδιαίτερα εξειδικευμένη, αλλά χωρίς να καταστεί δυνατό όπως αναφέρθηκε στην περίπτωση του HBV, να έχουμε διακριτή αντίδραση μεταξύ των διαφόρων πρωτεϊνών του ιού. Το τελευταίο δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα αν αναλογιστούμε τον πρωταρχικό στόχο της μεθόδου, δηλαδή τη χρήση της ως μεθόδου γενικής χρήσης, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για την ταχεία διάγνωση της παρουσίας των HBV και HCV.

Επιπρόσθετα οι επιμέρους μελέτες με μη «τροποποιημένα» κύτταρα Vero, κατέδειξαν τη δυνατότητα των βιοαισθητήρων BERA, ως εργαλείο για τη μελέτη των βιοηλεκτρικών ιδιοτήτων των κυττάρων.

Στο τελευταίο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής καταβλήθηκε μια προσπάθεια βελτίωσης του βιοαισθητήρα ανίχνευσης ιών που προσβάλουν φυτικούς οργανισμούς, τροποποιώντας τόσο το ηλεκτρονικό και μηχανικό τμήμα όσο και τη μορφή του αισθητήρα, χρησιμοποιώντας υλικά άλλων παραδοσιακών μεθόδων όπως η ELISA. Σε αυτό το στάδιο της μελέτης κατασκευάστηκε ένα πρότυπο βιοαισθητήρα το οποίο μπορεί να ανιχνεύει τρεις συγκεκριμένους ιούς πρωτίτως σε ποιοτικό επίπεδο, αλλά και με προοπτική χρήσης του για τον προσδιορισμό του φορτίου ενός ιού σε φυτικό ιστό. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι σε πρακτικό επίπεδο το εν λόγω σύστημα μπορεί να λειτουργήσει στα όρια ανίχνευσης μιας παραδοσιακής μεθόδου όπως η ELISA, με πολύ μικρότερο φυσικά κόστος και σε ελάχιστο απαιτούμενο χρόνο για τον έλεγχο του δείγματος.

Η ευαισθησία του βιοαισθητήρα μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω αυξάνοντας τον αριθμό των τροποποιημένων κυττάρων που περιέχονται σε αυτόν ή τον αριθμό των αντισωμάτων στην επιφάνεια των κυττάρων. Το τελευταίο κρίζει ιδιαίτερη μελέτη λόγω των περιορισμών που σχετίζονται με την αντοχή της μεμβράνης στην διαδικασία της ηλεκτροπόρωσης και κατά συνέπεια με την βιωσιμότητα των κυττάρων.

# **11. Μελλοντικά Σημεία Έρευνας**





Η εμπειρία που αποκομίσθηκε από τις πειραματικές διαδικασίες που περιγράψαμε, έχουν καταδείξει συγκεκριμένους ερευνητικούς στόχους που θα πρέπει ίσως να επιτευχθούν στο μέλλον. Όπως αναφέρθηκε και στα πρώτα κεφάλαια κατά την περιγραφή της μεθόδου BERA και των πρώτων γενιών βιοαισθητήρων που βασίστηκαν σε αυτή, οι διαδικασίες αλλά και η δομή των βιοαισθητήρων άλλαξε δραματικά, όπως είναι εμφανές και κατά την περιγραφή των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της παρούσης διατριβής, συνεπώς πολλά προβλήματα που χαρακτηρίζουν την λειτουργία των βιοαισθητήρων έπρεπε να αντιμετωπιστούν εκ του μηδενός.

Η επιλογή των κυττάρων του βιοαισθητήρα και συγκεκριμένα των κυττάρων Vero έγινε λόγω διαθεσιμότητας και ευκολίας χειρισμού, ενώ η χρήση ενός και μόνο τύπου αποσκοπούσε στην τυποποίηση της διαδικασίας παρασκευής βιοαισθητήρων. Επισημαίνεται όμως ότι, ο τύπος του κυττάρου φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία του συστήματος.

Συνεπώς κρίνεται απαραίτητη η δοκιμή διαφόρων τύπων κυττάρων ανάλογα με την εφαρμογή, αλλά και διαφορετικών συγκεντρώσεων τους στον βιοαισθητήρα BERA, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ευαισθησία.

Στο ανωτέρω σημείο θα μπορούσε να εξεταστεί και η δυνατότητα παρασκευής γενετικά τροποποιημένων κυττάρων, των οποίων οι ιδιότητες να εξειδικεύονται ανάλογα με το προς ανάλυση στοιχείο.

Περαιτέρω μελέτη απαιτείται σε τομείς όπως τα υλικά από τα οποία αποτελείται το σύστημα του βιοαισθητήρα, υλικών όπως τα ηλεκτρόδια Ag/AgCl που χρησιμοποιήθηκαν για την μεταφορά του σήματος από τον βιοαισθητήρα στον μετατροπέα και οι οποίοι επιλέχτηκαν με βάση μια σειρά πειραματικών δεδομένων, που σχετιζόνταν με το ύψος των τιμών των μεταβολών του δυναμικού της μεμβράνης των κυττάρων. Περαιτέρω έρευνα στο εν λόγω θέμα θα βελτιώνει την ποιότητα του σήματος και θα συνέβαλε στη μείωση του θορύβου.

Τέλος σημαντικό σημείο για περαιτέρω έρευνα θα αποτελούσε και η περαιτέρω βελτίωση του συστήματος BERA-HTP, σε συνδυασμό με την

δημιουργία του κατάλληλου λογισμικού, είτε ως προς την καταγραφή των μετρήσεων από τον μετατροπέα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή, είτε σε επίπεδο νευρωνικού δικτύου. Το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία κατά την ανίχνευση του TRV. Η ανάπτυξη νευρωνικών δικτύων ανάλογα με την εφαρμογή, θα βελτιώνει την ποιότητα των αποτελεσμάτων, την ακρίβεια τους και θα μειώνει το φόρτο για τον χρήστη.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abidor, I.G., Arakelyan, V.B., Chernomordik, L.V., Chizmadzhev, Y.A., Pastushenko V.F., Tarasevich, M.R. (1979). Electrical breakdown of BLM: main experimental facts and their qualitative discussion, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **6**: 37–52
2. Ammerman, N., C., Beier-Sexton, M., Azad, A., F. (2008). Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. *Current Protocols in Microbiology* **11**: A.4E.1-A.4E.7.
3. Aramburu, J., Galipienso, L., Matas M., 2006. Characterization of potato virus Y isolates from tomato crops in northeast Spain. *Eur. J. Plant Path.* 115, 247–258.
4. Αργυράκης, Π., (2001). Νευρωνικά Δίκτυα και Εφαρμογές (Τόμος Β'). Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας. ISBN: 960–538–341–1. σελ. 15-29
5. Bonino, F., Chiaberge, E., Maran, E., Piantino, P. (1987). Serological markers of HBV infectivity. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **24**: 217-223
6. Beck, J., Nassal, M. (2007). *Hepatitis B virus replication*. *World J. Gastroenterol.* **13**(1): 48–64
7. Bos, L. (1999). In *Plant Viruses, Unique and Intriguing Pathogens*. Leiden, The Netherlands, Backhuys Publishers.
8. Bouchard, M.J., Puro, R.J., Wang, L., Schneider, R.J. (2003). Activation and inhibition of cellular calcium and tyrosine kinase signalling pathways identify targets of the HBx protein involved in hepatitis B virus replication. *Journal Virology* **77** (14): 7713–7719.
9. Bouchard, M.J., Schneider, R.J. (2004). The Enigmatic X Gene of Hepatitis B Virus. *Journal of Virology* **78**(23): 12725-12734.
10. Candotti, D. Temple, J. Owusu-Ofori, S. Allain, J.P. (2004). Multiplex real-time quantitative RT-PCR assay for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol. Met.* **118**: 39-47.

11. Catterall, W.A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**:13-25
12. Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244** (4902): 359-362.
13. Chung, J.W., Kim, S.D., Bernhardt, R., Pyun, J.C. (2005). Application of SPR biosensor for medical diagnostics of human hepatitis B virus (hHBV). *Sens. Actuat. B Chem.* **111-112**: 416-422.
14. Clark, M.F., Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general Virology* **34**: 475-483
15. Collier, L., Balows, A., Sussman, M. (1998). In *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections* 9<sup>th</sup> ed., Volume 1, *Virology*, volume editors: Mahy, B., Collier, L., p. 760
16. Cardozo, D.L. (2005). A model for understanding membrane potential using springs. *Adv. Physiol. Educ.* **29**: 204-207
17. De Felice, L.J. (1997). In *Electrical Properties of Cells: Patch Clamp for Biologists*. Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45345-2
18. Di Bisceglie, A.M., Goodman, Z.D., Ishak, K.G., Hoofnagle, J.H., Melpolder, J.J., Alter H.J. (1991). Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic post-transfusion hepatitis. *HEPATOLOGY* **14**: 969-974.
19. Dolphin, A.C. (2003).  $\beta$ -subunits of voltage-gated calcium channels. *J. Bioeng. Biomemb.* **35**: 599-620
20. Dolphin, A.C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol* **147**(1): S56-62.
21. Erdem, A., Ariksoysal, D.O., Karadeniz, H., Kara, P., Sengonul, A., Sayiner, A.A., Ozsoz, M. (2005). Electrochemical

- genomagnetic assay for the detection of the hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology. *Electrochem. Commun.* **7**: 815-820.
22. Eriksen, S., Olsnes, S., Sandvig, K., Sand, O., (1994). Diphtheria toxin at low pH depolarizes the membrane, increases the membrane conductance and induces a new type of ion channel in Vero cells. *The EMBO Journal* **13**(19): 4433-4439
  23. Frossyniotis, D., Anthopoulos, Y., Kintzios, S., Perdikaris, A., Yialouris, C.P. (2006a). A Multisensor Fusion System for the Detection of Plant Viruses by Combining Artificial Neural Networks. S. Kollias et al. (Eds.): ICANN 2006, Part II, LNCS 4132, pp. 401 – 409, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006.
  24. Frossyniotis, D., Anthopoulos, Y., Kintzios, S., Perdikaris, A., Yialouris, C.P. (2006b). Detection of Plant Viruses Using Biosensors and Artificial Neural Networks. International Symposium HAICTA 2006, Volos, Greece
  25. Frossyniotis, D., Anthopoulos, Y., Kintzios, S., Moschopoulou G., Yialouris, C.P. (2008). Artificial Neural Network Selection for the Detection of Plant Viruses. *World Journal of Agricultural Sciences* **4**(1): 114-120
  26. Fung, D.Y.C. (1995). Rapid methods and automation in food microbiology: an update. In: Bourgeois, C.M., Leveau, J.Y., eds. *Microbiological Control for Foods and Agricultural Products*. New York, USA: VCH Publishers, pp. 3-20.
  27. Genco, I., Gliozzi, A., Relini, A., Robello, M., Scalas, E. (1993). Electroporation in symmetric and asymmetric membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1149**: 10–18
  28. Glaser, R.W., Leikin, S.L., Chernomordik, L.V., Pastushenko, V.F., Sokirko, A.I. (1988). Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores, *Biochim. Biophys. Acta* **940**: 275–287
  29. Giannini, G., Brechot, C. (2003). Hepatitis C virus biology. *Cell Death and Differentiation* **10**: S27-S38

30. Guo, M., Yanqing, L., Hongxia, G., Xiaoqin, W., Lifang, F. (2007). Electrochemical detection of short sequences related to the hepatitis B virus using MB on chitosan-modified CPE. *Bioelectrochem.* **70**: 245-249
31. Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stuhmer, W., Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**(4): 473–508
32. Hassen, W.M., Chaix, C., Abdelghani, A., Bessueille, F., Leonard, D., Jaffrezic-Renault, N. (2008). An impedemetric DNA sensor based on functionalized magnetic nanoparticles for HIV and HBV detection. *Sens. Actuat. B Chem.* **134**: 755-760.
33. Heermann, K.H., Kruse, F., Seifer, M., Gerlich, W.H. (1987). Immunogenicity of the gene S and Pre-S domains in hepatitis B virions and HBsAg filaments. *Intervirology* **28**: 14-25
34. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952a). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**: 500 – 544
35. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952b). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* **116**: 449– 472
36. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952c). The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* **116**: 473– 496
37. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952d). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* **116**: 497– 506
38. Holeva, R., Phillips. M.S., Neilson. R. *et al.* (2006). Real-time PCR detection and quantification of vector trichodroid nematodes and Tobacco rattle virus. *Molecular and Cellular Probes* **20**: 203-211

39. Hoppe, G.K., Hansford, G.S., (1984). *Biotech. Lett.* **6**: 681–686
40. Hunt, D.M. (2007). Influenza. In *Microbiology and Immunology On-line*, Hunt, R.C. editor. Univ. of South Carolina School of Medicine, <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/flu.htm>.
41. Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P. *et al.* (2000). Application of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria. *Electroanalysis* **12**: 317–25.
42. Jones, S.W. (2003). Calcium channels: unanswered questions. *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**: 461–464
43. Karube, I., Okada, T., Suzuki, S. (1981). Amperometric Determination of Ammonia Gas with Immobilized Nitrifying Bacteria, *Anal. Chem.* **53**(12): 1852-1854
44. Katsanakis, N., Katsivelis, A., Kintzios, S. (2009). Immobilization of electroporated cells: physiological effects of the shape of calcium alginate matrices and foetal calf serum. *Sensors* **9**: 378-385.
45. Kay, A., Zoulim, F. (2007). Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res.* **127** (2): 164–76
46. Kintzios, S., Goldstein, J., Perdikaris, A., Moschopoulou, G., Marinopoulou, I., Mangana, O., Nomikou, K., Papanastasiou, I., Petrou, A.-L., Arakelyan, V., Economou, G., Simonian, A. (2005). The BERA Diagnostic System: an all-purpose cell biosensor for the 21st Century. In: 5th Biodetection Conference, Baltimore, MD, USA.
47. Kintzios, S., Pistola, E., Panagiotopoulos, P., Bomsel, M., Alexandropoulos, N., Bem, F., Ekonomou, G., Biselis, J., Levin, R. (2001a). Bioelectric recognition assay (BERA). *Biosensors & Bioelectronics* **16**: 325-336.
48. Kintzios, S., Pistola, E., Konstas, J., Matakidiadis, T., Alexandropoulos, N., Bem, F., Biselis, J., Levin, R., (2001b). Application of the Bioelectric Recognition Assay (BERA) on the detection of human and plantviruses. *Biosens. Bioelectron.* **16**: 467–480.



49. Kintzios, S., Bem, F., Mangana, O., Nomikou, K., Markoulatos, P., Alexandropoulos, N., Fasseas, C., Arakelyan, V., Petrou, A.-L., Soukouli, K., Moschopoulou, G., Yialouris, C., Simonian, A. (2004). Study on the mechanism of Bioelectric Recognition Assay: evidence for immobilized cell membrane interactions with viral fragments. *Biosens. Bioelectron.* **20**: 907–916.
50. Kintzios, S., Marinopoulou, I., Moschopoulou, G., Mangana, O., Nomikou, K., Endo, K., Papanastasiou, I., Simonian, A. (2006). Development of a novel, multi-analyte biosensor system for assaying cell division: Identification of cell proliferation/death precursor events *Biosens. Bioelectron.* **21**: 1365-1373
51. Kintzios, S., Yiakoumetis, I., Moschopoulou, G., Mangana, O., Nomikou K., Simonian, A. (2007). Differential effect of the shape of calcium alginate matrices on the physiology of immobilized neuroblastoma N2a and Vero cells: A comparative study. *Biosensors and Bioelectronics* **23**: 543–548
52. Kintzios, S., Moschopoulou, G., Pedrikaris, A., Blouchos, P., Mavrikou, S., Flampouri, E., Yialouris, C., Frosysniotis, D., Anthopoulos I., (2007). Biosensors for field-based detection of plant pathogens and pesticide residue analysis: the state-of-the-art technology as a key tool in Integrated Plant Disease Management. International Symposium: Best Practices in Disease, Pest Management and Weed Management. Berlin, Germany
53. Kintzios, S. (2007). Cell-based Biosensors in Clinical Chemistry. *Mini-reviews in Medical Chemistry* **7**: 1019-1026
54. Kitagawa, Y., Tamiya, E., Karube, I., (1987). Microbial-FET Alcohol Sensor. *Annal. Lett.* **20**(1): 81-96.
55. Koretz, R.L., Abbey, H., Coleman, E., Gitnick, G. (1993). NANB post-transfusion hepatitis: looking back on the second decade. *Ann. Intern. Med.* **119**: 110-115.
56. Κουτής, Χ. (1998). Ηπατίτιδα Β και Πρωτοπαθής Καρκίνος του Ήπατος, Εκδόσεις “ΕΛΛΗΝ”, ISBN 960-286-321-8, σελ. 16-31

57. Kwon, J.A., Yoon, S.Y., Lee, C.K., Lima, C.S., Lee, K.N., Sung, H.J., Brennan, C.A., Devare, S.G. (2006). Performance evaluation of three automated human immunodeficiency virus antigen–antibody combination immunoassays. *J. Virol. Met.* **133**: 20-26
58. Lazcka, O., Del Campo J.F., Xavier Munoz, F. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **22**: 1205-1217.
59. Li, X-M., Ju, H.Q., Ding, C.F., Zhang, S.S. (2007). Nucleic acid biosensor for detection of hepatitis B virus using 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline copper complex as electrochemical indicator. *Anal. Chim. Acta* **582**: 158-163.
60. Ly, S.Y., Cho, N.S. (2009). Diagnosis of human hepatitis B virus in non-treated blood by the bovine IgC DNA-linked carbon nanotube biosensor. *J. Clin. Virol.* **44**: 43-47.
61. McClain, S.L., Clippinger, A.J., Lizzano, R., Bouchard, M.J. (2007). Hepatitis B virus replication is associated with an HBx-dependent mitochondrion-regulated increase in cytosolic calcium levels. *Journal Virology* **81**(21): 12061–12065
62. MacFarlane, S.A. (1999). The molecular biology of the tobnaviruses. *J Gen Virol* **80**:2799–2807
63. Macholan, L., Schanel, L. (1984). Mushroom Tissue – Based Biocatalytic Electrode for Determination of Phenols, *Biologia (Bratislava)* **39**(12): 1191-1197
64. MacKinnon, R. (2004). Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **43**: 4265-4277
65. Mandog, G., Yanqing, L., Hongxia, G., Xiaoqin, W., Lifang, F. (2007). Electrochemical detection of short sequences related to the hepatitis B virus using MB on chitosan-modified CPE. *Bioelectrochem.* **70**: 245-249.

66. Mason, W., S., Seal, G., Summers, J. (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virology* **36**: 829-836
67. Matsunaga, T., Karube, I., Suzuki, S. (1978). Rapid Determination of Nicotinic Acid by Immobilized *Lactobacillus arabinosus*. *Annal. Chim. Acta* **99**(2): 233-239
68. Mattson, L., Sonnerborg, A., Weiland, O. (1993). Outcome of acute asymptomatic NANB hepatitis: a 13-year follow-up study of hepatitis C virus markers. *Liver* **13**: 274-278.
69. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erensoy, S., Akarca, U.S., Mascini, M., Ozsoz, M. (2002). Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue. *Talanta* **56**: 837-846.
70. Moschopoulou G., Kintzios S. (2005). Membrane engineered Bioelectric Recognition Cell sensors for the detection of subnanomolar concentrations of superoxide: A novel biosensor principle. *International Conference on Instrumental Methods of Analysis (IMA) 2005*, Crete, Greece, 1-5/10/2005.
71. Moschopoulou, G., Kintzios, S., (2006). Application of “membrane-engineering” to bioelectric recognition cell sensors for the ultra-sensitive detection of superoxide radical: A novel biosensor principle. *Anal. Chim. Acta* **573/574**: 90–96.
72. Moschopoulou, G., Vitsa, K., Bem, F., Vassilakos, N., Perdikaris, A., Blouhos, P., Yialouris, C., Frosyniotis, D., Anthopoulos, I., Mangana, O., Nomikou, K., Rodeva, V., Kostova, D., Grozeva, S., Michaelides, A., Simonian, A., Kintzios, S. (2008). Engineering of the membrane of fibroblast cells with virus-specific antibodies: A novel biosensor tool for virus detection. *Biosens. Bioelectron.* **24**: 1027-1030.
73. Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M.S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Imoto, K., Tanabe, T. Numa, S. (1991). Primary

- structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* **350**: 398–402
74. Mounir, T. (2005). Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation. *Biophysical Journal* **88**(6): 4045-4053
  75. Mowat, W.P., Dawson, S. (1987). Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *J. Virol. Methods*, **15**: 233-247
  76. Nagel, B., Dellweg, H., Gierasch, L.M. (1992). Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *Pure Appl. Chem.* **64**(1): 143-168
  77. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo Journal* **1**(7): 841–845
  78. Odata, T., Karube, I., Suzuki, S. (1993). Microbial Sensor System which uses *Methylobacterium* sp. for the Determination of Methane. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 102-106
  79. Pavlin, M., Kanduser, M., Rebersek, M., Pucihar, G., Hart, F.X., Magjarevic, R., Miklavcic, D. (2005). Effect of Cell Electroporation on the Conductivity of a Cell Suspension. *Biophysical Journal* **88**: 4378–4390
  80. Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., Pawlotsky, J.M. (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *HEPATOLOGY* **39**(1): 5-19
  81. Περγικάρης, Α., Μοσχοπούλου, Γ., Μπεμ, Φ., Ανθόπουλος, Ι., Γιαλούρης, Κ., Νομικού, Ο., Μαγγανά Κ., Κιντζιος, Σ. (2006). Ανάπτυξη Μεθόδου ανίχνευσης των ιών TRV και CGMMV με τη χρήση συστήματος βιοαισθητήρων BERA και σε συνδυασμό με Νευρωνικά Δίκτυα. 8<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας, Θεσσαλονίκη
  82. Perdikaris, A., Alexandropoulos, N., Kintzios, S. (2009). Development of a Novel, Ultra-rapid Biosensor for the Qualitative Detection of Hepatitis B Virus-associated Antigens and Anti-HBV, Based on “Membrane-engineered” Fibroblast

- Cells with Virus-Specific Antibodies and Antigens. *Sensors* **9**: 2176-86
83. Ploeg, A.T., Brown, D.J.F., Robinson, D.J. (1992). The association between species of *Trichodorus* and *Paratrichodorus* vector nematodes and serotypes of tobacco rattle tobnavirus. *Ann. Appl. Biol.* **121**:619–630
  84. Purves, D., Augustine, G.J, Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., Williams, S.M. (2001). In *Neuroscience* (2nd ed.). editors: Sinauer Associates Inc. ISBN 0-87893-741-2.
  85. Racek, J., Musil, J. (1990). Possibilities of Lactate Determination by Cell Biosensors. *Proceedings of the Symposium on Bioanalytical Methods*. pp 36-38, Prague, Czech Republic
  86. Racek, J., (1991). A Yeast Biosensor for Glucose Determination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**(4): 473-477.
  87. Racek, J., (1995). Properties of Cell-Based Biosensors. In *Cell-Based Biosensors*. Technomic Publishing AG, Switzerland, pp. 19-22
  88. Rao, V.K., Rai, G.P., Agarwal, G.S., Suresh, S. (2005). Amperometric immunosensor for detection of antibodies of *Salmonella typhi* in patient serum. *Analitica Chimica Acta* **531**: 173-177
  89. Riska, P.F., Su, Y., Bardarov, S., Freundlich, L., Sarkis, G., Hatfull, G., Carriere, C., Kumar, V., Chan, J., Jacobs, W.R., Jr. (1999). Rapid film-based determination of antibiotic susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis strains by using a luciferase reporter phage and the Bronx Box. *J. Clin. Microbiol.* **37**(4): 1144-1149.
  90. Roberts, C.A., Dietzgen. R.G.A., Heelan. L.A. *et al.* (2000). Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. *Journal of Virological Methods* **88**: 1-8.

91. Robinson, D.J., (1992). Detection of tobacco rattle virus by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* **40**: 57-66.
92. Rodrigues, J. M., Luis, A. L., Lobato, J. V., Pinto, M. V., Faustino, A., Sooraj Hussain, N., Lopes, M. A., Veloso, A. P., Freitas, M., Geuna, S., Santos, J. D., Mauricio, A. C. (2005). Intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in the n1e-115 neuronal cell line and its use for peripheric nerve regeneration. *Acta Med Port* **18**: 323-328
93. Rosner, A., Lachman, A, Pearlsman, M., Maslenin, L. and Antignus, Y., 2000. Molecular characterisation and differential diagnosis of a necrotic PVY isolate in tomato. *Ann. Appl. Biol.* 137, 253–257
94. Seeff, L.B. (2002). Natural History of Chronic Hepatitis C. *HEPATOLOGY* **36**: S35-S46.
95. Sprengel, R., Kaleta, E., F., Will, H. (1988). Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J. Virology* **62**: 932-937
96. Stenger, D.A., Pike, C.J., Hickman, J.J., Cotman, C.W. (1993). Surface Determinants of Neuronal Survival and Growth on Self Assembled Monolayers in Culture. *Brain. Res.* **630**: 136-147
97. Sudarshama, M.R., Berger, P.H. (1998). Nucleotide sequence of both genomic RNAs of a North American tobacco rattle virus isolate. *Archives of Virology* **143**: 1535-1544.
98. Tieleman, D.P., Leontiadou, H., Mark, A.E., Marrink, S.J. (2003). Molecular dynamics simulation of pore formation in phospholipid bilayers by mechanical force and electric fields. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 6382–6383.
99. Tremolada, F., Cassin, C., Alberti, A., Drago, C., Tagger, A., Ribero, M.L., Realdi, G. (1992). Long-term follow-up of NANB (type C) post-transfusion hepatitis. *J. Hepatol* **16**: 273-281.
100. Valkonen, J.,P.,T., 2007. Viruses: Economical losses and biotechnological potential. In Vreugdenhil, D., Bradshaw, J.,

- Gebhardt, C., Govers, F., Mackerron, D.K.L., Taylor, M.A., Ross, H.A. (eds). *Potato Biology and Biotechnology: advances and perspectives*, Elsevier, Amsterdam, pp. 619-641.
101. Van der Lelie, D., Regniers, L., Borremans, B., Provoost, A., Verschaeve, L., (1997). The VITOTOX test, a SOS bioluminescence *Salmonella typhimurium* test to measure genotoxicity kinetics. *Mutat. Res.* **389**: 279–290
  102. Vassilakos, N., Vellios, E.K., Brown, E.C., Brown, D.J.F., MacFarlane, S.A. (2001). The Tobravirus 2b protein acts in trans to facilitate transmission by nematodes. *Virology* **279**:478–487
  103. Vassilakos, N., Bem, F., Tzima, A., Barker, H., Reavy, B., Karanastasi, E., Robinson, D.J. (2008). Resistance of transgenic tobacco plants incorporating the putative 57-kDa polymerase read-through gene of Tobacco rattle virus against rub-inoculated and nematode-transmitted virus. *Transgenic Res.* **17**: 929–941
  104. Visser, P.B., Brown, D.J.F., Brederode, F.T. *et al.* (1999). Nematode Transmission of Tobacco Rattle Virus serves as a bottleneck to clear the virus population from defective interfering RNAs. *Virology* **263**: 155-65.
  105. Walker, D. De Waard, M. (1998). Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *TiNS*, **21**: 148–154
  106. Wang, P., Liu, Q. (2010). Cell Immobilization Factors. In *Cell-Based Biosensors, Principles and Applications*. Artech House Series, Engineering in Medicine and Biology, USA, p. 14-15
  107. Whelan, R.J., Zare, R.N. (2003). Single-cell immunosensors for protein detection. *Biosens. Bioelectron.* **18**: 1065–1072
  108. Wollenberger, U., Scheller, F., Atrat, P. (1980). Microbial Membrane Electrode for the Determination of Cholesterol. *Annal. Lett.* **13**: 825-836

109. Χατζηγιάννης, Σ. (2006). Ηπατίτιδα Β και C. Μέρος Β': Επίκτητες anti-HBV αντιδράσεις. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, ISBN 978-960-399-541-8, σελ. 61-70
110. Yao, C., Zhu, T., Tang, J., Wu, R., Chen, Q., Chen, M., Zhang, B., Huang, J., Fu, W. (2008). Hybridization assay of hepatitis B virus by QCM peptide nucleic acid biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **23**: 879-885.
111. Yasumura, Y., Kawakita, M. (1963). The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho* **21**(6): 1201-1219.
112. Ye, Y.K., Zhao, J.H., Yan, F., Zhu, Y.L., Ju, H.X. (2003). Electrochemical behaviour and detection of hepatitis B virus DNA PCR production at gold electrode. *Biosens. Bioelectron.* **18**: 1501- 1508.
113. Yellen, G. (1998). The moving parts of voltage-gated ion channels. *Quarterly Reviews of Biophysics* **31**: 239-295
114. Yu, F.H., Catterall, W.A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology* **4**(3): 207.1-207.7
115. Zeira, M., Tosi, P.F., Mounemne, Y., Lazarte, J., Sneed, L., Volsky, D.L., Nikolau, C. (1991). Fulllength CD4 electroinserted in the erythrocyte membrane as a long-lived inhibitor of infection by human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 4409-4411.
116. Zhang, Y., Zhang, Z., Yang, F. (2007). A sensitive immunoassay for determination of hepatitis B surface antigen and antibody in human serum using capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *J. Chromatogr.* **857**: 100-107.
117. Zhou, X., Liu, L., Hu, M., Wang, L., Hu, J. (2002). Detection of hepatitis B virus by piezoelectric biosensor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27**: 341-345.
118. Zigler, *et al.* (1998). Agar-supported lipid layers – basic structures for biosensor design, electrical and mechanical properties. *Colloids and Surfaces* **140**: 357-367



119. Zuckerman, A.J. (1996). Hepatitis Viruses. In *Baron's Medical Microbiology*, 4th Ed.; Baron, S., Ed.; University of Texas Medical Branch: Galveston, TX, USA, pp. 2371-2381.

## Πρωτότυπες επιστημονικές Δημοσιεύσεις

1. Perdikaris, A., Vassilakos, N., Giakoumetis, I., Kektsidou, O., Kintzios, S. (2011). Development of a portable, high throughput biosensor system for rapid plant virus detection. *Journal of Virological Methods*. Accepted 30<sup>th</sup> June 2011
2. Perdikaris, A., Alexandropoulos, N., Kintzios, S. (2009). Development of a Novel, Ultra-rapid Biosensor for the Qualitative Detection of Hepatitis B Virus-associated Antigens and Anti-HBV, Based on “Membrane-engineered” Fibroblast Cells with Virus-Specific Antibodies and Antigens. *Sensors* **9**: 2176-86.
3. Moschopoulou, G., Vitsa, K., Bem, F., Vassilakos, N., Perdikaris, A., Blouhos, P., Yialouris, C., Frossyniotis, D., Anthopoulos, I., Mangana, O., Nomikou, K., Rodeva, V., Kostova, D., Grozeva, S., Michaelides, A., Simonian, A., Kintzios, S. (2008). Engineering of the membrane of fibroblast cells with virus-specific antibodies: A novel biosensor tool for virus detection. *Biosens. Bioelectron.* **24**: 1027-1030.
4. Frossyniotis D., Anthopoulos, Y., Kintzios, S., Perdikaris, A., Yialouris, C.P. (2006). A multisensor fusion system for the detection of plant viruses by combining artificial neural networks. *Lectures Comp. Sci.* **4132**: 401-409