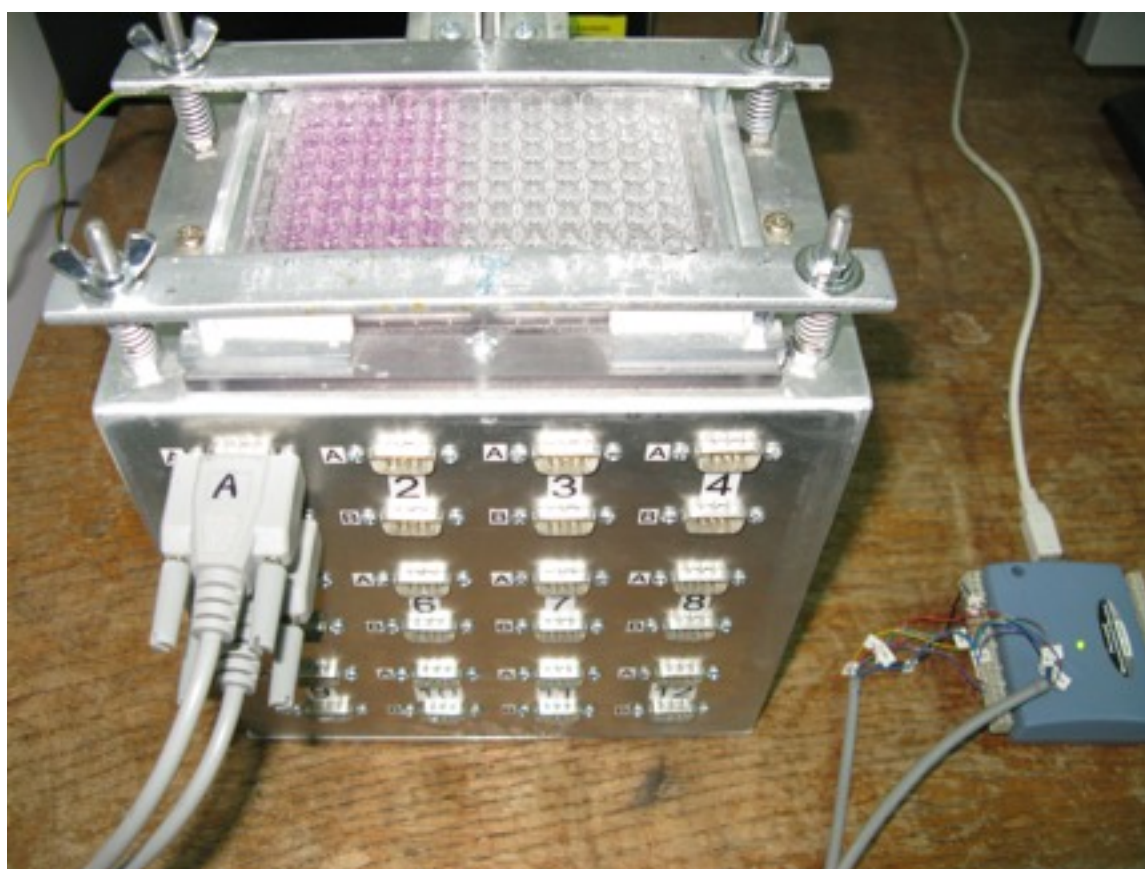


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ
ΠΜΣ «ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

Ανάπτυξη συστοιχίας κυτταρικών σειρών και διερεύνηση της διαφορικής απόκρισης σε βιοκτόνα.



**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
του μεταπτυχιακού φοιτητή Κατοίκου Γεωργίου
Πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών υπό την
επίβλεψη του Αναπλ. Καθηγητή κ. Σ. Κίντζιου.
Αθήνα 2010**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ
ΠΜΣ «ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«Ανάπτυξη συστοιχίας κυτταρικών σειρών και διερεύνηση της διαφορικής
απόκρισης σε βιοκτόνα»**

Κατοίκος Γιώργος

Αθήνα 2010

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κίντζιος Σπυρίδων, Αναπληρωτής Καθηγητής	Επιβλέπων
Αϊβαλάκης Γεώργιος, Επικ. Καθηγητής	Μέλος
Δροσινός Ελευθέριος, Αναπληρωτής Καθηγητής	Μέλος

Ευχαριστίες:

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σ. Κίντζιο για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Παράλληλα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής: Επικ. Καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκι και Αναπλ. Καθηγητή κ. Ε. Δροσινό.

Θερμές ευχαριστίες στα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών και ειδικότερα στους Μπλούχο Π., Μοσχοπούλου Γ. και Βαλέρο Τ. για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Ευχαριστώ τον πολύ καλό μου φίλο Γιώργο Τσανικλίδη, τον Κώστα Σκαρμούτσο, τον Νίκο Νικολουδάκη και φυσικά τον συμφοιτητή και φίλο Δημήτρη Ρούτσιο για την άριστη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Συντμήσεις

ACh: **Ακετυλοχολίνη**

AChE: **Ακετυλοχολινεστεράση**

AChR: **Υποδοχέας της ακετυλοχολίνης**

BERA: **Βιοηλεκτρική Μέθοδος Αναγνώρισης**

CBBs: **Κυτταρικοί βιοαισθητήρες**

DMEM: **Θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας ζωικών κυττάρων**

ENFET: **Ενζυμικά-επαγόμενο FET**

FETs: **Βιοαισθητήρες επαγόμενου πεδίου**

GABA: **γ-αμινο βουτυρικό οξύ**

ISEs: **Επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων**

ISFET: **Ιόν-εκλεκτικό FET**

NTs: **Νευροδιαβιβαστές**

Περιεχόμενα		
Περίληψη		1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ		4
1.1 Εισαγωγή στους αισθητήρες		4
1.2 Χημικοί αισθητήρες		8
1.3 Εισαγωγή στους βιοαισθητήρες		9
1.3.1 Ορισμός-Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων		9
1.3.2 Ταξινόμηση βιοαισθητήρων		13
1.3.3 Χαρακτηριστικά βιοαισθητήρων		21
1.3.4 Πλεονεκτήματα βιοαισθητήρων		26
1.3.5 Εφαρμογές των βιοαισθητήρων		28
1.4 Κυτταρικοί βιοαισθητήρες		32
1.4.1 Σχεδιασμός κυτταρικού βιοαισθητήρα		35
1.4.2 Ηλεκτροφυσιολογικές μέθοδοι μέτρησης-Εφαρμογές		39
1.4.3 Μέθοδος Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης, BERA		42
1.4.4 Γενιές κυτταρικών βιοαισθητήρων		43
1.4.5 Θεωρία κυτταρικής λειτουργίας και απόκρισης		44
1.4.5.1 Μετάδοση σημάτων στους κυτταρικούς βιοαισθητήρες-		
Ιοντικά Κανάλια		50
1.4.5.2 Νευροδιαβιβαστές (Neurotransmitters, NTs)		55
1.4.5.3 Ακετυλοχολίνη και ακετυλοχολινεστεράση		56
1.4.5.4 Υποδοχέας της ακετυλοχολίνης		58
1.4.6 Βελτίωση κυτταρικών βιοαισθητήρων		59
1.4.7 Ανίχνευση τοξικών ουσιών με τη χρήση		
κυτταρικών βιοαισθητήρων		61
1.5 Εισαγωγή στα φυτοφάρμακα		62
1.5.1 Ταξινόμηση γεωργικών φαρμάκων- Τρόπος δράσης		
κυριότερων ομάδων εντομοκτόνων		64
1.5.2 Φυτοπροστατευτικές ουσίες οι οποίες μελετήθηκαν		
στην παρούσα εργασία		75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		77
A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ		77
2.1 Φυτοφάρμακα		77
2.2 Βιολογικό υλικό		77
2.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός		78
2.4 Κατασκευή κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5 ^{ης} γενιάς		79
2.4.1 Βιοαισθητήρες με τη μορφή σφαιριδίων		79
2.4.2 Βιοαισθητήρες σε πλακίδιο τύπου ELISA		80
2.5 Διάταξη κυτταρικού βιοαισθητήρα		81
2.5.1 Βιοαισθητήρας με τη μορφή σφαιριδίου		81
2.5.2 Βιοαισθητήρας σε πλακίδιο τύπου ELISA		82

2.6	Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων φυτοφαρμάκων	83
2.7	Μέθοδοι ανάλυσης δειγμάτων	84
2.7.1	Βιοαισθητήρας με τη μορφή σφαιριδίου	84
2.7.2	Βιοαισθητήρας σε πλακίδιο τύπου ELISA	84
	B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	86
2.8	Απόκριση κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA στα προς ανάλυση δείγματα	86
2.8.1	Αποτελέσματα απόκρισης κυτταρικών βιοαισθητήρων 5 ^{ης} γενιάς με τη μορφή σφαιριδίου (κύτταρα N2a, Vero και πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού)	86
2.8.2	Αποτελέσματα απόκρισης κυτταρικών βιοαισθητήρων 5 ^{ης} γενιάς σε πλακίδιο ELISA (κύτταρα N2a, Vero και πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού)	91
	Γ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	96
	Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	103

Περίληψη

Στη γεωργική πρακτική έχει παρατηρηθεί εκτεταμένη χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών και κατά συνέπεια απαιτούνται αξιόπιστες μέθοδοι για την ανίχνευση υπολειμμάτων τους στα τρόφιμα.

Μια μεγάλη κατηγορία φυτοπροστατευτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στην αγροτική παραγωγή είναι τα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα (βιοκτόνα). Υπολείμματα τέτοιων ουσιών συναντώνται συχνά σε πολλές κατηγορίες τροφίμων και ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των υπολειμμάτων αυτών των ουσιών έχει περιοριστεί στη χρήση κλασσικών τεχνικών της αναλυτικής χημείας, όπως χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών. Παρόλο που οι μέθοδοι αυτοί παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία, είναι χρονοβόρες και απαιτούν την παρουσία εξειδικευμένου και έμπειρου προσωπικού, όπως επίσης και την χρήση υψηλού κόστους εξοπλισμού. Επιπλέον, δεν έχουν την ικανότητα διεξαγωγής αναλύσεων τοξικών ουσιών επί τόπου και σε πραγματικό χρόνο.

Σε αυτή τη μελέτη αναπτύχθηκε μια καινοτόμος διάταξη κυτταρικού βιοαισθητήρα, για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών, βασισμένη στη μέτρηση των αλλαγών του μεμβρανικού δυναμικού ακινητοποιημένων κυττάρων, σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας της μεθόδου βιοηλεκτρικής αναγνώρισης BERA (Bioelectric Recognition Assay). Τα κύτταρα ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου (1^η μέθοδος) και σε πλακίδια με αгарόζη (2^η μέθοδος), προκειμένου να διατηρηθούν οι φυσιολογικές τους λειτουργίες.

Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές: N2a (καρκινικά κύτταρα νευροβλαστώματος), Vero (νεφρικά κύτταρα πράσινου πιθήκου) και φυτικά κύτταρα (πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού *Nicotiana tabacum*). Συνολικά μελετήθηκε η απόκριση των κυτταρικών βιοαισθητήρων σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις, (1ppb, 10ppb, 100ppb, 500ppb και 1ppm), ενός ακαρεοκτόνου (fenbutatin oxide) και ενός εντομοκτόνου (imidacloprid).

Η χρήση αυτών των κυτταρικών βιοαισθητήρων οδήγησε κυρίως σε ποιοτική και σε ορισμένες περιπτώσεις ποσοτική ανίχνευση των φυτοφαρμάκων, καθώς και σε υψηλούς βαθμούς επαναληψιμότητας.

Abstract

An extensive use of pesticides has been observed in agricultural practice, therefore reliable methods are required for the detection of residues in food.

Two of the most important categories of pesticides used in agricultural production are the insecticides and acaricides (biocides). These compounds are frequently found in food, whereas conventional methods of analysis, chromatographic and spectroscopic techniques, are sufficiently sensitive but time-consuming, and require the presence of specialized and experienced personnel, as well as the use of highly expensive equipment. Also, these standard analysis methods have not the ability to detect toxic substances in real time.

In the present study, a novel cell-biosensory method has been developed for the detection of pesticides residues, based on the measurement of changes of the cell membrane potential of immobilized cells, according to the working principle of the Bioelectric Recognition Assay. The cells were immobilized by entrapment in a sodium alginate bead (1st method) and in an agarose tile (2nd method), in order to preserve their physiological functions.

Three different kind of cell lines have been used; N2a (neuroblastoma cancer cells), Vero (kidney cells from green monkey) and plant cells (protoplasts from leaves of *Nicotiana tabacum*). This study presents the response of the cellular biosensors to five different concentrations, (1ppm, 500ppb, 100ppb, 10ppb, 1ppb), of one acaricide (fenbutatin oxide) and one insecticide (imidacloprid).

The use of these cellular biosensors resulted in qualitative and in some cases quantitative detection of the pesticides and a high degree of reproducibility.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Εισαγωγή στους αισθητήρες

Η είσοδος στον 21^ο αιώνα σηματοδοτεί την είσοδο στην "εποχή της πληροφορίας". Η εμφάνιση νέων δυνατοτήτων ταυτόχρονου χειρισμού πολυάριθμων πηγών πληροφοριών, καθώς επίσης και εφαρμογής ιδιαίτερα αποτελεσματικών μεθόδων ταξινόμησης και ανάκτησης δεδομένων, δημιούργησαν νέες απαιτήσεις, στις ήδη υπάρχουσες μεθόδους άντλησης και επεξεργασίας πληροφοριών. Τη σημερινή εποχή, πλέον, είναι δυνατή η χρήση συστημάτων αντίληψης και μέτρησης, των λεγόμενων αισθητήρων, ικανών να μετρήσουν φυσικά μεγέθη, όπως θερμοκρασία, πίεση, ηλεκτρικό δυναμικό, ένταση φωτός, ιξώδες. Οι φυσικοί αισθητήρες, όπως αυτοί που απαντώνται στους ζωντανούς οργανισμούς, συνήθως αποκρίνονται σε ερεθίσματα ηλεκτροχημικού χαρακτήρα, δηλαδή η λειτουργία τους βασίζεται στη μεταφορά ιόντων, όπως συμβαίνει στις νευρικές ίνες. Οι πρώτοι αισθητήρες και όργανα μέτρησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μηχανικής φύσεως. Η συστηματική μελέτη του ηλεκτρισμού, οδήγησε στην ανάπτυξη νέων αισθητήρων, ηλεκτρικής φύσεως, οι οποίοι οδηγούσαν στην παραγωγή αναλογικού σήματος. Στους τεχνητούς αισθητήρες, η μετάδοση των πληροφοριών διεξάγεται υπό ηλεκτρική μορφή επίσης, αλλά και μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων (Fraden 2004; Taylor – Schultz 1996). Σημαντική ώθηση στην εξέλιξη των αισθητήρων έδωσε η ανάγκη εξέλιξης της τεχνολογίας, καθώς και αντιμετώπισης και επίλυσης ποικίλων προβλημάτων της σύγχρονης έρευνας στο πεδίο των θετικών επιστημών. Οι αισθητήρες είναι ένα από τα βασικότερα στοιχεία των σύγχρονων συστημάτων, δεδομένου ότι καθορίζουν την ποιότητα των πληροφοριών που προκύπτουν από την πραγματική ζωή και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο και τη λήψη καθοριστικών αποφάσεων. Αποτελούν ζωτικής σημασίας τμήμα των περισσότερων βιομηχανικών οργάνων, οργάνων μεταφοράς κ.α. και ο ρόλος τους στα περιβαλλοντικά συστήματα, στα συστήματα υγείας και σε άλλους τομείς, γίνεται όλο και πιο σημαντικός. Η παγκόσμια αγορά αισθητήρων αναπτύσσεται γρήγορα και ο βαθμός καινοτομίας είναι εξαιρετικά υψηλός. Οι αισθητήρες, οι οποίοι λειτουργούν με βάση τις νέες αρχές και βασίζονται στην χρήση νέων υλικών και καινοτόμων τεχνολογικών μεθόδων, είναι ακριβέστεροι, γρηγορότεροι, μικρότερου μεγέθους, χαμηλότερης ισχύος και οικονομικότεροι. Η έρευνα στη νανοτεχνολογία και στην

βιοτεχνολογία θα συμβάλλει σημαντικά, στην βελτίωση των ήδη υπαρχόντων εξελιγμένων αισθητήρων και στην εμφάνιση των μελλοντικών.

Ο αισθητήρας ορίζεται ως μια συσκευή η οποία ανιχνεύει ένα μακροσκοπικό φυσικό μέγεθος και το μετατρέπει σε ηλεκτρικά μετρήσιμο, συγκεκριμένων χαρακτηριστικών, το οποίο ύστερα από επεξεργασία παίρνει την μορφή τυποποιημένου σήματος. Οποιαδήποτε μορφή ενέργειας δεχθεί μια τέτοια συσκευή, (χημική, μηχανική, θερμική, μαγνητική), την μετατρέπει σε μορφή ηλεκτρικής ενέργειας, (Middelhoeck – Noorlag 1981). Η διαδικασία ανίχνευσης από τους αισθητήρες, αποτελεί μια διαδικασία μεταφοράς πληροφοριών και κάθε τέτοια μετάδοση πληροφοριών απαιτεί την μετάδοση ενέργειας (Fraden 2004; Makinwa 2008). Στοιχείο εισόδου ενός αισθητήρα είναι το ερέθισμα που λαμβάνει, το οποίο μπορεί να είναι κάποια μετρούμενη ποσότητα, κάποια ιδιότητα ή κάποια κατάσταση, η οποία μπορεί να γίνει αντιληπτή και να μετατραπεί σε ηλεκτρικό σήμα, ενώ το σήμα εξόδου, μπορεί να έχει τη μορφή τάσης, ηλεκτρικού φορτίου ή ρεύματος (Lambrechts – Sansen 1992).

Τα βασικά στοιχεία που απαρτίζουν ένα αισθητήρα είναι μια ενεργός επιφάνεια (active surface), ένας μετατροπέας σήματος (transducer) και ένα ηλεκτρονικό τμήμα επεξεργασίας δεδομένων. Η ενεργός επιφάνεια ενός αισθητήρα αποτελείται από το συστατικό αναγνώρισης (recognition element), που πραγματοποιεί την ανίχνευση και το οποίο μπορεί να είναι κάποιο ακινητοποιημένο βιομόριο ή στρώμα πολυμερών. Το συστατικό αναγνώρισης είναι ένα βασικό τμήμα για κάθε αισθητήρα, καθώς ενισχύει την ικανότητα της συσκευής να αντιδράσει επιλεκτικά με κάποια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία ή με μια επιθυμητή ομάδα συστατικών, αποφεύγοντας έτσι την ανεπιθύμητη αλληλεπίδραση με άλλα συστατικά. Ο μετατροπέας σήματος, είναι μια συσκευή που ανιχνεύει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ενεργό επιφάνεια και την προς μέτρηση ουσία και μετατρέπει την παρατηρούμενη μεταβολή (φυσική, χημική), σε μετρήσιμο σήμα (Eggins 2002). Η μεταβολή που λαμβάνει χώρα στον μετατροπέα σήματος και που οφείλεται στην παρουσία της ενεργού επιφάνειας, εκφράζεται ως ένα συγκεκριμένο σήμα, το οποίο δύναται να συμπεριλαμβάνει μεταβολές μεγεθών, όπως είναι η σύνθετη αντίσταση, η τάση, η ένταση του φωτός, η ανάκλαση, το βάρος, η θερμοκρασία, κ.α. Ο μετατροπέας σήματος αποτελεί το δυσκολότερο και πιο κρίσιμο τμήμα ενός αισθητήρα, καθώς η ποιότητα και η αρχή κατασκευής του καθορίζουν και τα χαρακτηριστικά του αισθητήρα. Για να γίνει δυνατή η κατασκευή ενός μετατροπέα σήματος κάποιου μακροσκοπικού μεγέθους, θα πρέπει να κατασκευαστεί μια δομή στην οποία οι μεταβολές του μακροσκοπικού μεγέθους θα μπορούν να επιφέρουν

μεταβολή σε κάποιο ηλεκτρικά μετρήσιμο μέγεθος. Ένας μετατροπέας από μόνος του δεν αποτελεί μια ιδιαίτερα αξιόπιστη λύση σαν αισθητήρας, καθώς τα ηλεκτρικά σήματα τα οποία συνήθως παράγει είναι πολύ μικρής έντασης και έτσι τις περισσότερες φορές είναι δύσκολα μετρήσιμα. Σαν μια ελάχιστη διαμόρφωση θα μπορούσε να θεωρηθεί η χρήση ενός μετατροπέα μαζί με ένα μεταλλάκτη, ώστε να προκύψει ένα πιο σταθερό σήμα, κάτι το οποίο δεν είναι επίσης αρκετό, εάν ληφθούν υπόψη οι διακυμάνσεις της τάσης ή η μεταβολή της θερμοκρασίας. Ο όρος αισθητήρας πρέπει να διαχωρίζεται από τον όρο μετατροπέα. Ο μετατροπέας μετατρέπει ένα τύπο ενέργειας σε κάποιον άλλο, ενώ ο αισθητήρας μετατρέπει κάθε τύπο ενέργειας σε ηλεκτρική. Τέλος, το ηλεκτρικό τμήμα του αισθητήρα είναι υπεύθυνο για την επεξεργασία και την ενίσχυση του παραγόμενου σήματος.

Οι αισθητήρες βαθμονομούνται με εφαρμογή γνωστών φυσικών μεγεθών και καταγραφή της απόκρισης του συστήματος. Τα χαρακτηριστικά ενός αισθητήρα καθορίζουν την απόδοση του, τη σταθερότητα της λειτουργίας του και την ταχύτητα της απόκρισης του στα ερεθίσματα που δέχεται. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να είναι είτε στατικά, είτε δυναμικά. Τα στατικά χαρακτηριστικά ενός αισθητήρα καθορίζουν την απόδοση του σε μια σταθερή κατάσταση και είναι τα ακόλουθα: η πιστότητα, η ικανότητα ακρίβειας, επαναληψιμότητας, αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων, η διακριτική ικανότητα, η μονοτονικότητα της συνάρτησης μεταφοράς, η ευαισθησία στην μέτρηση και στην διαταραχή, η γραμμική απόκριση, η πλήρης κλίμακα εισόδου και εξόδου, η υστέρηση, το εύρος, το σφάλμα μη γραμμικότητας, τα σφάλματα βαθμονόμησης και τέλος τα συστηματικά και τυχαία σφάλματα (Hock et al. 2002). Εκτός από τα στατικά χαρακτηριστικά, τα οποία αναφέρονται στην περίπτωση εκείνη όπου έχει επέλθει ισορροπία μεταξύ σήματος εξόδου και αισθητήρα, δηλαδή όταν τα σήματα εισόδου και εξόδου δεν μεταβάλλονται πλέον συναρτήσει του χρόνου, κάθε αισθητήρας διαθέτει και δυναμικά χαρακτηριστικά. Τα δυναμικά αυτά χαρακτηριστικά περιγράφουν την συμπεριφορά του αισθητήρα μεταξύ της χρονικής εκείνης στιγμής, κατά την οποία το σήμα εισόδου μεταβάλλεται, έως την χρονική στιγμή που το σήμα εξόδου σταθεροποιείται εκ νέου. Τα δυναμικά όπως και τα στατικά χαρακτηριστικά ισχύουν εντός κάποιου συγκεκριμένου εύρους συνθηκών λειτουργίας του αισθητήρα και εάν ο αισθητήρας βρεθεί εκτός αυτού του εύρους, τότε τα δυναμικά χαρακτηριστικά δύνανται να μεταβληθούν.

Η ταξινόμηση των αισθητήρων μπορεί να γίνει με βάση τη λειτουργία που επιτελούν, (μέτρηση πίεσης, θερμοκρασίας), τη φυσική αρχή στην οποία στηρίζεται η

λειτουργία τους ή τον τύπο του μεταγωγέα σήματος που διαθέτουν, (Janata – Bezegh 1988). Βάσει της κύριας μορφής ενέργειας που μεταφέρει το σήμα τους, κατηγοριοποιούνται σε: i) μηχανικούς, ii) θερμικούς, iii) ηλεκτρικούς, iv) μαγνητικούς, v) ακτινοβολίας και vi) (βιο)χημικούς (Hulanicki et al. 1991).

1.2. Χημικοί αισθητήρες

Ενας από τους τομείς της Αναλυτικής Χημείας με ιδιαίτερη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια είναι οι χημικοί αισθητήρες. Αυτή η νέα γενιά αισθητήρων, αποτελεί μια πολύπλοκη επέκταση συστημάτων μέτρησης των φυσικών αισθητήρων. Οι χημικοί αισθητήρες ορίζονται ως συσκευές οι οποίες αντιδρούν με μια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία, με ένα συγκεκριμένο τρόπο, μέσω κάποιας χημικής αντίδρασης και χρησιμοποιούνται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της αναλυτέας αυτής ουσίας. Η ίδια η παρουσία της αναλυόμενης ουσίας στην επιφάνεια της συσκευής θα μεταφέρει ποιοτική αναλυτική πληροφορία, ενώ ο αριθμός των θέσεων που καταλαμβάνονται από μια τέτοια ουσία θα αποδώσει ένα ποσοτικό αποτέλεσμα. Τα όργανα αυτά έχουν την ικανότητα για την συνεχή και άμεση εξαγωγή των πληροφοριών που αφορούν τη χημική σύσταση ενός δείγματος. Στόχος τους είναι η αναγνώριση και η επιλογή μιας αναλυόμενης ουσίας (ή μιας ομάδας χημικών ουσιών), η οποία είναι παρούσα είτε μέσα στην αέρια είτε μέσα στην υγρή φάση πιθανότατα συνδυασμένη με μεγάλη ποικιλία άλλων ουσιών (Eggins 2002).

Οι χημικοί αισθητήρες αποτελούνται από δύο κύρια μέρη: α) ένα χημικά ευαίσθητο στρώμα (το τμήμα του αισθητήρα που είναι υπεύθυνο για την χημική αναγνώριση) και β) ένα μετατροπέα σήματος, ο οποίος μετατρέπει τη χημική πληροφορία που δέχεται σε ηλεκτρικό ή οπτικό σήμα, (Bedair – Fedder). Η ενεργός επιφάνεια, όπου πραγματοποιείται η αντίδραση, μπορεί να είναι κάποιο στρώμα πολυμερών ή στρώμα εμπλουτισμένο με κάποιο χημικό παράγοντα ή επιστρωμένο υλικό, (συνήθως μικρού μοριακού βάρους), μη βιολογικής φύσεως. Τα στρώματα αυτών των πολυμερών ή οι συγκεκριμένες χημικές ουσίες που βρίσκονται προσκολλημένες είτε στην ενεργό επιφάνεια είτε απευθείας στον μετατροπέα σήματος, αλληλεπιδρούν και υπολογίζουν την επιθυμητή αναλυτέα ουσία. Ο ρόλος του μετατροπέα σήματος, είναι η μετάφραση της παρουσίας της επιλεγμένης αναλυόμενης ουσίας σε ανιχνεύσιμο σήμα το οποίο θα μπορεί με τη σειρά του να συλλεχθεί και να ερμηνευθεί (Taylor – Schultz 1996). Οι πιθανές εφαρμογές της τεχνολογίας του χημικού αισθητήρα είναι πολυάριθμες και παραδείγματα αυτών αποτελούν περιβαλλοντικοί έλεγχοι, όπως

ανίχνευση δηλητηριωδών αερίων, η ανάλυση αερίων καυσίμων, ο καθορισμός των ιόντων στο πόσιμο νερό, κ.α.

Στην οικογένεια των χημικών αισθητήρων, εντάσσονται οι βιοαισθητήρες. Στους βιοαισθητήρες, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους χημικούς αισθητήρες, η ενεργός επιφάνεια αναγνώρισης μπορεί να είναι κάποιο βιολογικό μόριο, (όπως κάποιο ένζυμο, αντίσωμα ή υποδοχέας) ή κύτταρο. Ο συνδυασμός της βιολογικής αναγνώρισης με την φυσικοχημική μετατροπή του σήματος, δίνει τη δυνατότητα στους βιοαισθητήρες να παρέχουν την ευαισθησία των χημικών αισθητήρων και ταυτόχρονα την πολύ καλή επιλεκτικότητα (εκλεκτικότητα) των βιολογικών αναγνωριστικών μηχανισμών.

1.3. Εισαγωγή στους βιοαισθητήρες

1.3.1 Ορισμός-Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων

Ο βιοαισθητήρας, ως έννοια στην βιοτεχνολογία, αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε κατά το δεύτερο μισό του 20^{ου} αιώνα. Η πρώτη περιγραφή βιοαισθητήρα, ο οποίος είναι βασισμένος σε ακινητοποιημένο ένζυμο, παρουσιάζεται το 1962 από τους Clark & Lyons, δίνοντας το έναυσμα για εκτεταμένη μελέτη, σχεδιασμό και εξέλιξη εφαρμογών για τη χρήση βιοαισθητήρων. Οι πολλές και διαφορετικές παράμετροι που χαρακτηρίζουν τους βιοαισθητήρες, έδωσαν τη δυνατότητα για πολλαπλούς ορισμούς του. Μια αρκετά ακριβής περιγραφή για το τι είναι βιοαισθητήρας αναφέρει: *“είναι μια αυτόνομη και ολοκληρωμένη αναλυτική συσκευή, ικανή να παρέχει εξειδικευμένες ποσοτικές ή ημιποσοτικές αναλυτικές πληροφορίες, χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό αναγνωριστικό στοιχείο, που διατηρείται σε άμεση χωρική επαφή με τον μεταλλάκτη-μετατροπέα σήματος”*.

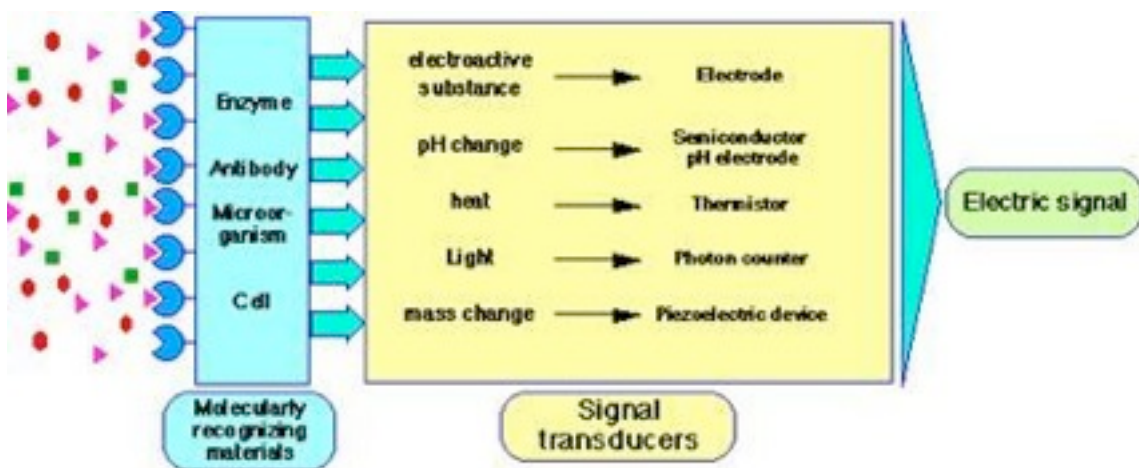
Το 1991 οι Owicki and Parce έδωσαν έναν άλλο σχετικό ορισμό στον οποίο αναφέρουν ότι ο βιοαισθητήρας είναι αναλυτική συσκευή που περιλαμβάνει βιολογικό υλικό(κύτταρα, ένζυμα, αντισώματα, νουκλεϊκά οξέα, κλπ), το οποίο έρχεται σε άμεση συσχέτιση με ένα φυσικό μετατροπέα ή μικροσύστημα, που μπορεί να είναι οπτικό, ηλεκτροχημικό, θερμομετρικό, πιεζοηλεκτρικό ή μαγνητικό, ενώ το 2000 οι Daunert et al. χαρακτηρίζουν ως βιοαισθητήρα ένα βιολογικό αισθητήριο μηχανισμό, που αναγνωρίζει μια φυσική ή χημική αλλαγή – αντίδραση, ενωμένος με ένα μετατροπέα που παράγει ένα μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα αποκρινόμενο σε περιβαλλοντική αλλαγή.

Σύμφωνα με τον πιο πρόσφατο ορισμό της IUPAC 1, βιοαισθητήρες είναι χημικοί αισθητήρες στους οποίους η χημική αναγνώριση επιτελείται με τη βοήθεια ενός βιοχημικού μηχανισμού (Thevenot et al. 1999). Το 2004 ο Martin Chaplin έδωσε μια απλουστευμένη αλλά και πολύ ακριβή περιγραφή για το τι είναι βιοαισθητήρας, προσδιορίζοντάς τον ως *“μια αναλυτική συσκευή η οποία μετατρέπει μια βιολογική αντίδραση σε ηλεκτρικό σήμα”*.

Χρησιμοποιούν ως βιολογικό υλικό, κάποιο υλικό βιολογικής προέλευσης ή κάποιο βιομιμητικό υλικό, προκειμένου να ανιχνεύσουν μια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία σε κάποιο υπόστρωμα, ενεργοποιώντας υψηλής εξειδίκευσης αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα βιολογικά μόρια ανίχνευσης και στην προς ανάλυση ουσία. Η αναλυτέα ουσία μπορεί να είναι οποιοδήποτε συστατικό που συμμετέχει σε κάποια βιοχημική διαδικασία, (οργανικό συστατικό, όπως πρωτεΐνες, σάκχαρα ή ανόργανο συστατικό, όπως αέρια, ιόντα, βαρέα μέταλλα) ή οποιαδήποτε μονάδα που συμμετέχει σε κάποια βιοχημική διαδικασία, (μικροοργανισμοί, κύτταρα, αντι σώματα, αντιγόνα).

Οι βιοαισθητήρες είναι ευαίσθητοι σε φυσικά και χημικά ερεθίσματα και μετατρέπουν μια βιολογική απόκριση σε ηλεκτρικό σήμα, μεταδίδοντας έτσι πληροφορίες για μια ζωτική διαδικασία και για μια βιοχημική ή φυσιολογική μεταβολή. Η ικανότητα των βιολογικών μορίων να αντιδρούν με συστατικά πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων, επιτρέπει στους βιοαισθητήρες να χρησιμοποιούνται σε ποικίλες εφαρμογές, όπως είναι η ανίχνευση τοξικών και ρυπαντικών ουσιών στο νερό, στον αέρα και στο έδαφος, οι ποιοτικοί έλεγχοι τροφίμων και ο εντοπισμός μορίων ιατρικής σημασίας, όπως ορμονών, σακχάρων και πεπτιδίων υγρών του σώματος. Οι βιοαισθητήρες, επίσης, μπορούν να ανιχνεύσουν την συγκέντρωση ουσιών και άλλες παραμέτρους βιολογικού ενδιαφέροντος, χωρίς άμεση χρήση βιολογικών συστημάτων, όπως συμβαίνει στη βιομηχανία τροφίμων. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια ραγδαία αύξηση στις διαγνωστικές μεθόδους που βασίζονται σε βιοαισθητήρες που αποτελούνται από ζωντανά, άθικτα κύτταρα και σε ορισμένες περιπτώσεις ιστούς, κινητικά οργανίδια ή ακόμα και ολόκληρους οργανισμούς. Η ικανότητα των βιοαισθητήρων να μετρούν εξειδικευμένα και με μεγάλη ευαισθησία σχεδόν οποιοδήποτε χημικό δυναμικό, πιστεύεται ότι θα οδηγήσει στην αποκλειστική τους χρήση στη βιομηχανία και στην ζωή για τους πάσης φύσεως ελέγχους. Η γενική αρχή λειτουργίας των βιοαισθητήρων, (Σχήμα 1.1), προσομοιάζει με εκείνη των κλασσικών ηλεκτροδίων μέτρησης pH ή διαφοράς δυναμικού. Ο βιοαισθητήρας μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα της σύζευξης δύο κύριων

τμημάτων, του βιολογικού υλικού (bioelement), το οποίο λειτουργεί ως το ενεργό τμήμα ανίχνευσης και του μετατροπέα σήματος (transducer). Το ενεργό τμήμα ανίχνευσης ενός βιοαισθητήρα, είναι κάποιο βιολογικό μόριο (ιστός, μικροοργανισμός, κυτταρικός υποδοχέας, ένζυμο, αντίσωμα, νουκλεϊκό οξύ), κάποιο στοιχείο βιολογικής προέλευσης ή κάποιο βιομιμητικό μόριο.



ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ

Σχήμα 1.1 Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων

(<http://www.jaist.ac.jp/~yokoyama/images/biosensor.gif>)

Το βιολογικό υλικό εμφανίζει εκλεκτικότητα για μια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία και έτσι είναι υπεύθυνο για την εξειδικευμένη μοριακή αναγνώριση της ουσίας αυτής και την επιλεκτικότητα της συσκευής, καθιστώντας την έτσι ένα δυναμικό εργαλείο σε περιπτώσεις όπου απαιτείται υψηλή εκλεκτικότητα. Το βιολογικό τμήμα είναι στενά συνδεδεμένο με ένα μετατροπέα σήματος, (μεταλλάκτη). Ο μετατροπέας σήματος είναι απαραίτητος για την μετατροπή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή (βιο)χημικής μεταβολής, που προκύπτει κατά την διαδικασία της μοριακής αναγνώρισης της ουσίας - στόχου από το βιολογικό υλικό, σε ηλεκτρικής φύσεως πληροφορία, η οποία θα συμβάλλει στην αναγνώριση κάποιου συγκεκριμένου στοιχείου ή στην ανίχνευση και στον διαχωρισμό των διαφορετικών βιοχημικών συστατικών μιας σύνθετης ουσίας, καθώς οι διαστάσεις του παραγόμενου ηλεκτρικού σήματος αντιστοιχούν στην συγκέντρωση της αναλυτέας ουσίας. Λειτουργεί με φυσικοχημικό τρόπο και συνδυάζει την εξειδίκευση και την εκλεκτικότητα του βιολογικού τμήματος με την υπολογιστική δύναμη του

μικροεπεξεργαστή. Τέλος, το ηλεκτρικό τμήμα του βιοαισθητήρα λαμβάνει το σήμα από τον μετατροπέα ενέργειας, το καταγράφει και το εκφράζει υπό μορφή μετρήσεων (Mehvar – Abdi 2004).

1.3.2. Ταξινόμηση βιοαισθητήρων

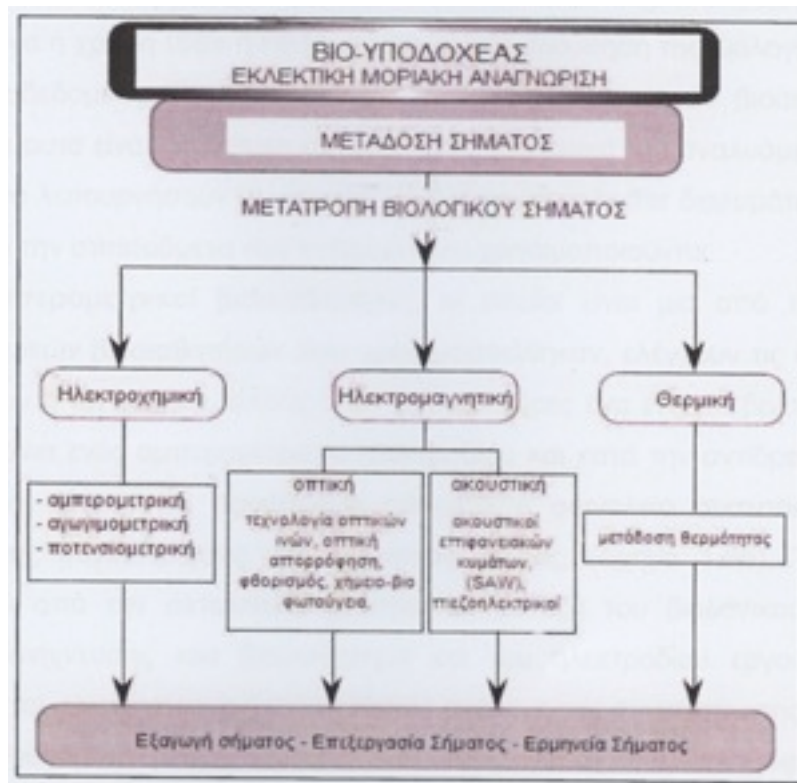
Υπάρχουν γενικά τρία είδη βιοαισθητήρων. Στο πρώτο είδος, το προϊόν της αντίδρασης, διαδίδεται στον μετατροπέα και προκαλεί την ηλεκτρική ή οπτική απόκριση. Στο δεύτερο είδος, συγκεκριμένοι μεσολαβητές ανάμεσα στον αναλυτή και στον μετατροπέα, χρησιμοποιούνται προκειμένου να πραγματοποιηθεί βελτιωμένη απόκριση και στο τρίτο είδος όπου ο αναλυτής από μόνος του προκαλεί την απόκριση και κανένα προϊόν ή μεσολαβητής δεν απαιτείται ή δεν εμπλέκεται άμεσα.

Η ταξινόμηση των βιοαισθητήρων μπορεί να γίνει με τα παρακάτω κριτήρια:

- i. Τον μετατροπέα σήματος
- ii. Το βιολογικό υλικό-αισθητήριος υποδοχέας
- iii. Την τεχνική ακινητοποίησης.

i) Μετατροπέας σήματος

Ενας από τους βασικούς τρόπους κατηγοριοποίησης των βιοαισθητήρων βασίζεται στην φυσικοχημική αρχή, η οποία διέπει το σύστημα ανίχνευσης - τροποποιητή σήματος, (Σχήμα 1.2). Έτσι οι βιοαισθητήρες διακρίνονται κυρίως σε: α) ηλεκτροχημικούς, (αγωγιμετρικούς, ποτενσιομετρικούς, αμπερομετρικούς), (Meadows 1996), β) οπτικούς, οι οποίοι μετρούν οπτικές παραμέτρους, όπως απορρόφηση, φθορισμό, χημειοφωταύγεια, κ.α., γ) βαρυμετρικούς, οι οποίοι μετρούν τις αλλαγές στην μάζα, (πιεζοηλεκτρικοί, ακουστικοί επιφανειακών κυμάτων) και δ) θερμομετρικούς, οι οποίοι υπολογίζουν την έκλυση και την απορρόφηση θερμότητας.



Σχήμα 1.2 Ταξινόμηση βιοαισθητήρων με βάση την αισθητήρια αρχή με την οποία ανιχνεύεται η μετρήσιμη ποσότητα (Bedioui 1999)

Οι **ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες** είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι βιοαισθητήρες σε κλινικές αναλύσεις και διαγνωστικές μελέτες. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες αποτελούνται από ηλεκτροχημικούς μεταλλάκτες σήματος (π.χ. ηλεκτρόδια). Οι βιοαισθητήρες αυτοί βασίζονται σε μία ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση, που οδηγεί στην παραγωγή ιόντων. Οι βιοαισθητήρες που βασίζονται σε αυτή τη μέθοδο αναγνώρισης, απλοποιούν σημαντικά την μετατροπή του σήματος, χωρίς να χρειάζονται δαπανηρό εργαστηριακό εξοπλισμό. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες εφαρμόζονται κυρίως για την ανίχνευση συγκεντρώσεων γλυκόζης, για τον εντοπισμό υβριδισμένων τμημάτων DNA κ.α. Οι ηλεκτροχημικοί μεταλλάκτες σήματος διακρίνονται σε:

- Ποτενσιομετρικούς,
- Αμπερομετρικούς και
- Αγωγιμομετρικούς

Οι **ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες**, υπολογίζουν το οξειδωτικό/αναγωγικό δυναμικό μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης. Στην ποτενσιομετρία καταγράφεται το δυναμικό που διαρρέει ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος.

Αυτοί οι βιοαισθητήρες κάνουν χρήση ενζύμων ακινητοποιημένων στην επιφάνεια μιας pH-ευαίσθητης συσκευής, (Keusgen 2002). Οι δύο σημαντικότεροι εκπρόσωποι των ποτενσιομετρικών αισθητήρων, είναι τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων (ISEs) και οι αισθητήρες επαγόμενου πεδίου (FETs). Οι ενζυμικές αντιδράσεις οδηγούν πολύ συχνά στην παραγωγή ιόντων και γι' αυτό το λόγο η χρήση ISEs ή FETs για την παρακολούθηση της βιολογικής αναγνώρισης είναι ευρέως διαδεδομένη. Ένας περιορισμός των ποτενσιομετρικών βιοαισθητήρων είναι ότι τα συστήματα αυτά είναι ευαίσθητα σε pH-ενεργά συστατικά του αναλυόμενου δείγματος και έτσι μπορούν να λειτουργήσουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις ρυθμιστικών διαλυμάτων, γεγονός όμως που δεν ωφελεί την απαιτούμενη ενεργότητα και σταθερότητα των ενζύμων που χρησιμοποιούνται.

Οι **αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες**, οι οποίοι είναι μια από τις πρώτες κατηγορίες ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων που χρησιμοποιήθηκαν, ελέγχουν τις διαδικασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων ή ιόντων. Σε αυτούς τους βιοαισθητήρες ένα ένζυμο βρίσκεται ακινητοποιημένο στην επιφάνεια ενός αμπερομετρικού ηλεκτροδίου και κατά την αντίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα, (όπως για παράδειγμα σάκχαρο ή φαινολικό συστατικό), παράγεται ρεύμα ανάλογο της συγκέντρωσης της αναλυτέας ουσίας. Το παραγόμενο σήμα προέρχεται από την ανταλλαγή ηλεκτρονίων μεταξύ του βιολογικού υλικού του ενεργού τμήματος ανίχνευσης του βιοαισθητήρα και του ηλεκτροδίου εργασίας. Η αλλαγή αυτή καταγράφεται, είναι ανάλογη ή αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της αναλυτέας ουσίας και το παραγόμενο ρεύμα, ύστερα από επεξεργασία δίνει πληροφορίες σχετικά με την σύσταση του δείγματος. Ο βιοαισθητήρας γλυκόζης των Clark και Lyons βασίζεται σε αυτή την αρχή λειτουργίας. Μειονέκτημα αυτών των συστημάτων αποτελεί η ευαισθησία τους σε ενδογενή συστατικά του προς ανάλυση δείγματος, όπως επίσης και ο κίνδυνος οξείδωσης ή αναγωγής συστατικών που εμπλέκονται στην διαδικασία αναγνώρισης (Keusgen 2002).

Οι **αγωγιμετρικοί βιοαισθητήρες** ανιχνεύουν την μεταβολή στον αριθμό των ιόντων, στο φορτίο τους ή στην κινητικότητα τους, που παρατηρείται κατά την βιολογική αναγνώριση. Όταν παραχθούν ηλεκτρόνια ή ιόντα κατά μια ηλεκτροχημική αντίδραση, τότε μεταβάλλεται η συνολική αγωγιμότητα ή η αντίσταση του διαλύματος. Οι μετρήσεις της αγωγιμότητας, παρουσιάζουν χαμηλή ευαισθησία.

Στους **οπτικούς βιοαισθητήρες** οι οποίοι είναι μαζί με τους ηλεκτροχημικούς, οι πιο ευρέως διαδεδομένοι, ανιχνεύεται αλλαγή στις οπτικές ιδιότητες είτε του βιολογικού μορίου παρουσία του αναλυτή, είτε της ίδιας της αναλυτέας ουσίας κατά την βιολογική αναγνώριση και αυτή η μεταβολή συσχετίζεται με την συγκέντρωση του

αναλυτή. Βασίζονται, κυρίως, σε αλλαγές στην απορρόφηση, ή στον φθορισμό μιας κατάλληλης ένωσης, που λειτουργεί ως δείκτης.

Οι **βαρυμετρικοί βιοαισθητήρες**, διαχωρίζονται στους πιεζοηλεκτρικούς, (Piezoelectric), οι οποίοι βασίζονται στην μέτρηση της μεταβολής της χαρακτηριστικής συχνότητας συντονισμού των κρυστάλλων από τους οποίους αποτελούνται, λόγω της μεταβολής της ολικής μάζας στην επιφάνεια του κρυστάλλου και στους ακουστικούς επιφανειακών κυμάτων, (Surface Acoustic Wave), στους οποίους η αλλαγή της μάζας των κρυστάλλων προκαλεί αλλαγές στην συχνότητα συντονισμού ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου κύματος το οποίο περνά δια μέσου της επιφάνειας τους. Οι βιοαισθητήρες αυτοί ουσιαστικά λειτουργούν ως αισθητήρες μάζας, κάτι που οφείλεται στην γραμμική σχέση που υπάρχει ανάμεσα στην αλλαγή της μάζας (ή κάτω από κατάλληλες συνθήκες του ιξώδους) στην επιφάνεια του κρυστάλλου και στην συχνότητα ταλάντωσης της

Οι **θερμομετρικοί, (θερμικοί), βιοαισθητήρες**, βασίζονται στην μέτρηση της μεταβολής της θερμοκρασίας, η οποία προκαλείται από την θερμότητα που εκλύεται ή απορροφάται κατά την βιολογική αναγνώριση της αναλυτέας ουσίας.

ii) Βιολογικό υλικό

➤ Με βάση την φύση των βιομορίων αναγνώρισης:

Οι βιοαισθητήρες κατατάσσονται ανάλογα με το είδος των βιομορίων αναγνώρισης που χρησιμοποιούν σε: α) ενζυμικούς βιοαισθητήρες, όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα είναι ένζυμο, β) ανοσοαισθητήρες, όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα είναι αντίσωμα ή αντιγόνο αντίστοιχα συζευγμένο με ένζυμο ή χρωστική, γ) DNA βιοαισθητήρες, όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα είναι κάποιο νουκλεϊκό οξύ, δ) κυτταρικούς βιοαισθητήρες / βιοαισθητήρες μικροοργανισμών, όπου το βιολογικό τμήμα μπορεί να είναι κύτταρο - ιστός / μικροοργανισμός και ε) βιομιμητικούς βιοαισθητήρες, όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα αποτελούν τεχνητές μεμβράνες, μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή, χημικά και γενετικά τροποποιημένα μόρια. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι στρωμάτων βιολογικής αναγνώρισης, ανάλογα με την φύση της αναλυτέας ουσίας, προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή επιλεκτικότητα.

Τα **ένζυμα** είναι το πιο διαδεδομένο είδος βιολογικών μορίων που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Πρόκειται για πρωτεΐνες

αποτελούμενες από μία ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες με συγκεκριμένη τρισδιάστατη διάταξη στο χώρο και δρουν καταλυτικά παρουσία κάποιων μορίων, που ονομάζονται συμπαράγοντες. Η αξιοσημείωτη επιλεκτικότητα, η μεγάλη καταλυτική δραστηριότητα καθώς και η γρήγορη κινητική των περισσότερων ενζύμων είναι τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που εστίασαν το ενδιαφέρον των ερευνητών στη χρήση ενζύμων στους βιοαισθητήρες. Από τα μειονεκτήματα ξεχωρίζουν το μεγάλο κόστος και η αστάθεια των περισσότερων ενζύμων.

Τα **αντισώματα** εμφανίζουν μεγάλη επιλεκτικότητα, εξαιρετική ευαισθησία, απουσία καταλυτικής δράσης και δημιουργία ισχυρών δεσμών. Η πολύ ισχυρή δέσμευση των αντισωμάτων με τα αντιγόνα, οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις μη αντιστρεπτές, με αποτέλεσμα οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες να είναι συνήθως μίας χρήσης. Πιο διαδεδομένη τεχνική είναι η επισήμανση των αντιγόνων με ένζυμα.

Τα **νουκλεϊκά οξέα** παρουσιάζουν παρόμοια δράση με εκείνη των αντισωμάτων. Οι DNA καθετήρες, (DNA probes), είναι μια κατηγορία αισθητήρων, οι οποίοι αναπτύσσονται βάσει των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βάσεων μίας αλληλουχίας νουκλεϊνικών οξέων και μορίων DNA και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση γενετικών ασθενειών και μολύνσεις από ιούς. Οι DNA βιοαισθητήρες δομής βασίζονται στην ακινητοποίηση διαφόρων μορφών DNA στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Η ακινητοποίηση αυτή έχει ως σκοπό το χαρακτηρισμό διαφόρων ενώσεων για πιθανή αντικαρκινική, ή τοξική δράση τους. Στους βιοαισθητήρες αυτούς μελετώνται φαινόμενα, όπως είναι η μεταβολή στο ηλεκτροχημικό σήμα των βάσεων του DNA. Η δέσμευση με το DNA έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊνικών οξέων.

Τα **κύτταρα, οι ιστοί και οι μικροοργανισμοί**, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή βιοαισθητήρων και χαρακτηρίζονται από το σημαντικό πλεονέκτημα ότι δεν χρειάζεται να γίνει απομόνωση και καθαρισμός ενζύμων. Οι βιοαισθητήρες μικροοργανισμών βασίζονται στη χρήση μικροοργανισμών ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης. Χρησιμοποιούνται κυρίως τρεις μηχανισμοί. Για τον πρώτο μηχανισμό, ο ρύπος λειτουργεί ως υπόστρωμα κατά την αναπνοή των μικροοργανισμών. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την παρεμπόδιση της αναπνευστικής διαδικασίας των μικροοργανισμών από την προς ανάλυση ένωση. Τέλος, ο τρίτος μηχανισμός, σχετίζεται με την χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών (genetically engineered microorganisms-GMOs) οι οποίοι αναγνωρίζουν και ανιχνεύουν την παρουσία συγκεκριμένων ρύπων.

➤ **Με βάση τον τρόπο δράσης του βιομορίου αναγνώρισης:**

Οι βιοαισθητήρες μπορούν να ταξινομηθούν βάσει του τρόπου δράσης του βιομορίου αναγνώρισης σε:

α) βιοκαταλυτικούς βιοαισθητήρες, στους οποίους ο υποδοχέας μπορεί να είναι ένζυμο, κύτταρο ή ιστός και

β) βιοαισθητήρες συγγένειας, όπου ο υποδοχέας μπορεί να είναι DNA, RNA, ή αντίσωμα. Οι βιοκαταλυτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται σε μία αντίδραση που καταλύεται από μακρομόρια, τα οποία είτε είναι παρόντα στον αρχικό βιολογικό περιβάλλον, είτε έχουν απομονωθεί ή παραχθεί προηγουμένως με κατάλληλο τρόπο, βασίζονται κυρίως στην ακινητοποίηση ενζύμων πάνω σε μία ηλεκτροδιακή επιφάνεια, τα οποία είναι εκλεκτικά σε συγκεκριμένες ενώσεις, που αποτελούν υποστρώματα τους. Τρία είδη βιοκαταλυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν:

·Ένζυμα (μόνο- ή πολύ- ένζυμα). Τα ένζυμα που συχνά ακινητοποιούνται είναι οι οξειδάσες και τελικά ανιχνεύεται το παραγόμενο υπεροξείδιο του υδρογόνου. Μπορούν όμως να ακινητοποιηθούν και δεϋδρογονάσες, οπότε τελικώς ανιχνεύεται το NADH.

·Ολόκληρα κύτταρα (μικροοργανισμοί, όπως βακτήρια, μύκητες, ευκαρυωτικά κύτταρα, ζυμομύκητες) ή οργανίδια των κυττάρων, ή συστατικά των κυττάρων (μιτοχόνδρια, κυτταρικά τοιχώματα).

· Ιστοί (φυτικοί ή ζωικοί). Οι βιοαισθητήρες συγγένειας, βασίζονται στην αλληλεπίδραση της προς ανάλυση ένωσης με μακρομόρια ή οργανωμένα συγκροτήματα μορίων, τα οποία είτε έχουν απομονωθεί από το βιολογικό τους περιβάλλον, είτε έχουν τροποποιηθεί προηγουμένως με κατάλληλο τρόπο. Κάποια χρονική στιγμή επέρχεται ισορροπία, δημιουργείται ένα σύμπλοκο και συνεπώς δεν παρατηρείται κατανάλωση της προς ανάλυση ένωσης από τον ακινητοποιημένο βιολογικό παράγοντα. Η αλληλεπίδραση που πραγματοποιείται, μπορεί να είναι αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου ή αλληλεπίδραση δέκτη-ανταγωνιστή.

iii) Τεχνικές ακινητοποίησης

Ακινητοποίηση ή καθήλωση ενζύμου, πολυενζυμικού συστήματος ή και ολόκληρων κυττάρων, είναι ο περιορισμός τους σε τεχνητή στερεά φάση, η οποία διακρίνεται από την κύρια υγρή φάση και με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ετερογενές σύστημα. Η στερεή φάση είναι καταλυτικά ενεργή και επιτρέπεται αμφίδρομη μεταφορά (υποστρώματος, προϊόντος, οξυγόνου κ.τ.λ.) μεταξύ στερεής φάσης και κύριας υγρής φάσης (Κλώνης 1997).

Η μέθοδος της ακινητοποίησης του βιολογικού συστατικού επηρεάζει σημαντικά τη σταθερότητα του. Αυτό έχει άμεση επίδραση στα χαρακτηριστικά λειτουργίας του βιοαισθητήρα (αποθήκευση, λειτουργική σταθερότητα). Η ακινητοποίηση βοηθάει όχι μόνο στη διαμόρφωση της απαιτούμενης εγγύτητας ανάμεσα στο βιολογικό υλικό και στον μετατροπέα, αλλά βοηθάει επίσης και στην σταθεροποίηση του συστήματος προκειμένου αυτό να ξαναχρησιμοποιηθεί.

Ανάλογα με την τεχνική ακινητοποίησης που μπορεί να είναι χημική ή φυσική έχουμε και τους ανάλογους βιοαισθητήρες. Στις χημικές τεχνικές ακινητοποίησης δημιουργείται ομοιοπολικός δεσμός (covalent binding). Η δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού είναι μια κοινή τεχνική ακινητοποίησης για τα ένζυμα και τα αντισώματα, δεν είναι όμως χρήσιμη για την ακινητοποίηση κυττάρων (Souza 2001). Στη περίπτωση των ενζύμων ο ομοιοπολικός δεσμός δημιουργείται είτε μεταξύ στερεάς φάσης (φορέα) και ενζύμου, είτε μεταξύ των ιδίων των μορίων του ενζύμου, τα οποία στην περίπτωση αυτή σχηματίζουν τη βιοκαταλυτική στερεά φάση το λεγόμενο διαμοριακό πλέγμα (cross-linking).

Στις φυσικές τεχνικές ακινητοποίησης διακρίνουμε την προσρόφηση (adsorption), τον εγκλωβισμό (entrapment) σε τεχνητό μικροπεριβάλλον π.χ. πλέγμα πολυμερούς και την εγκαψυλλίωση (encapsulation).

Ακινητοποίηση κυττάρων σε αλγινικό ασβέστιο

Αρκετά συνηθισμένη είναι η ακινητοποίηση των κυττάρων εντός πολυμερικού πλέγματος από αλγινικό ασβέστιο. Τα βιοπολυμερή γενικά επιτρέπουν τη διάχυση μορίων προς και από τα ακινητοποιημένα κύτταρα, είναι μη τοξικά, έχουν καλή μηχανική σταθερότητα και σχετικά σταθερή δομή. Το αλγινικό οξύ προέρχεται από κυανοφύκη και έχει ως δομικές μονάδες το β-D-μαννοπυρανοζυλο-ουρονικό οξύ και το α-L-γλυκοπυρανοζυλο-ουρονικό οξύ. Τα αλγινικά άλατα συνήθως είναι διαθέσιμα με τη μορφή υδατικού αλγινικού νατρίου και έχουν χρησιμοποιηθεί για πάνω από 65 χρόνια στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων ως παράγοντες πήξης, ως γαλακτωματοποιητές, για το σχηματισμό λεπτών μεμβρανών και γενικά ως παράγοντες σχηματισμού στερεού κολλοειδούς. Η προσθήκη διαλύματος αλγινικού οξέος σε διάλυμα ασβεστίου, έχει ως αποτέλεσμα τον άμεσου πολυμερισμό με την καθίζηση του αλγινικού ασβεστίου. Δημιουργείται έτσι μια στιγμιαία πηκτωματοποίηση καθώς τα ιόντα του ασβεστίου διαπερνούν το αλγινικό οξύ. Το πηγμα που προκύπτει είναι

βιοχημικά αδρανές και μηχανικά σταθερό, με πόρους που είναι κατάλληλοι για ακινητοποίηση κυττάρων (Bickerstaff 1997).

1.3.3. Χαρακτηριστικά βιοαισθητήρων

Ενας βιοαισθητήρας, όπως συμβαίνει γενικά με τους αισθητήρες, (Κεφάλαιο 1.1), προκειμένου να υπολογίσει μια φυσική ποσότητα, θα πρέπει να ικανοποιεί κάποιες προϋποθέσεις, οι οποίες θα υποδείξουν την αποδοτικότητα του. Όλες οι χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με κάποιο φυσικό μέγεθος, μπορούν να αποδοθούν από ένα βιοαισθητήρα, όταν αυτός παρέχει ένα σήμα το οποίο έχει μια άμεση σχέση με την υπό εξέταση ποσότητα (Argiriou 2004). Τα χαρακτηριστικά ενός βιοαισθητήρα καθορίζουν την απόδοση του, τη σταθερότητα της λειτουργίας του και την ταχύτητα της απόκρισης του στα ερεθίσματα που δέχεται. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να είναι είτε στατικά, είτε δυναμικά. Τα στατικά χαρακτηριστικά ενός βιοαισθητήρα καθορίζουν την απόδοση του σε μια σταθερή κατάσταση και είναι τα ακόλουθα:

✓ Ακρίβεια

Η ακρίβεια είναι η ικανότητα ενός συστήματος να δίνει αποτελέσματα ταυτόσημα με την πραγματική τιμή της μετρήσιμης ποσότητας. Ως ανακρίβεια ορίζεται η απόκλιση της μέτρησης του βιοαισθητήρα από την πραγματική τιμή του εξωτερικού ερεθίσματος. Είναι το αθροιστικό αποτέλεσμα άλλων χαρακτηριστικών, όπως της υστέρησης και των σφαλμάτων βαθμονόμησης. Μπορεί να εκφρασθεί σαν απόλυτη τιμή του σφάλματος μέτρησης, ποσοστό της κλίμακας εισόδου ή ποσοστό της κλίμακας εξόδου.

✓ Υστέρηση

Είναι η απόκλιση μεταξύ των μετρήσεων του βιοαισθητήρα, όταν η μετρήσιμη φυσική ποσότητα προσεγγίζεται από αντίθετες κατευθύνσεις.

✓ Σφάλματα βαθμονόμησης

Τα σφάλματα βαθμονόμησης οφείλονται στην κακή βαθμονόμηση του αισθητήρα. Έτσι αν η βαθμονόμηση δεν γίνει αναλυτικά, (για κάθε σημείο της συνάρτησης μεταφοράς), αλλά για λίγα μόνο αντιπροσωπευτικά σημεία, προκύπτει ένα συστηματικό σφάλμα. Τα σφάλματα βαθμονόμησης μπορεί επίσης να σχετίζονται με την ανακρίβεια στη γνώση της μετρήσιμης φυσικής ποσότητας κατά τη βαθμονόμηση ή την λανθασμένη καταγραφή της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην αλλαγή αυτής της ποσότητας.

✓ **Συστηματικά σφάλματα**

Τα συστηματικά σφάλματα είναι αποτέλεσμα διάφορων παραγόντων όπως, μεταβλητές που επηρεάζουν τη λειτουργία του βιοαισθητήρα, (π.χ. θερμοκρασία), αλλαγές στη χημική σύνθεση ή μηχανική τάση εξαρτημάτων του βιοαισθητήρα, επίδραση της μετρητικής διαδικασίας στη μετρήσιμη φυσική ποσότητα, φαινόμενα εξασθένησης του σήματος. Τα συστηματικά σφάλματα μπορούν να διορθωθούν με τεχνικές αντιστάθμισης όπως η ανάδραση και το φιλτράρισμα.

✓ **Τυχαία σφάλματα**

Τα τυχαία σφάλματα, γνωστά και ως "θόρυβος" είναι ένα σήμα που δε μεταφέρει δεδομένα. Πραγματικά τυχαία σφάλματα όπως ο "λευκός θόρυβος" περιγράφονται από μια γκαουσιανή κατανομή. Μπορεί να οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες ή να σχετίζονται με τη μετρητική διαδικασία και τη μετάδοση του σήματος. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις τους, θα πρέπει ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο να είναι πολύ μεγαλύτερος της μονάδας.

✓ **Πλήρης κλίμακα εισόδου**

Ορίζεται ως η μέγιστη μεταβολή της μετρήσιμης φυσικής ποσότητας, την οποία μπορεί να μετρήσει ο βιοαισθητήρας με σχετική ακρίβεια.

✓ **Πλήρης κλίμακα εξόδου**

Ορίζεται ως η αλγεβρική διαφορά μεταξύ των τιμών εξόδου ενός βιοαισθητήρα, που αντιστοιχούν στην μέγιστη και την ελάχιστη ανιχνεύσιμη τιμή της μετρήσιμης φυσικής ποσότητας.

✓ **Διακριτική Ικανότητα**

Ορίζεται ως η ελάχιστη μεταβολή της μετρήσιμης φυσικής ποσότητας που χρειάζεται για να παρατηρηθεί ανιχνεύσιμη μεταβολή στο σήμα εξόδου. Η ελάχιστη μεταβολή της μετρήσιμης ποσότητας από το μηδέν ορίζεται ως όριο της διακριτικής ικανότητας.

✓ **Επαναληψιμότητα, Ικανότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων**

Οι όροι επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα είναι ταυτόσημοι, χρησιμοποιούνται όμως ο καθένας σε διαφορετικές περιπτώσεις. Και οι δυο αναφέρονται στο πόσο κοντά είναι τα αποτελέσματα ενός βιοαισθητήρα που μετρά το ίδιο σταθερό μέγεθος, η μεν επαναληψιμότητα όταν οι συνθήκες μέτρησης είναι σταθερές, η δε αναπαραγωγιμότητα όταν οι συνθήκες μέτρησης μεταβάλλονται.

✓ **Επιλεκτικότητα**

Η επιλεκτικότητα ενός βιοαισθητήρα, είναι η ικανότητα του να αναγνωρίζει ένα μοναδικό συστατικό μεταξύ άλλων συστατικών του ίδιου δείγματος, κάτι το οποίο είναι σχεδόν αδύνατο να πραγματοποιηθεί. Ένας βιοαισθητήρας εμφανίζει τόσο μεγαλύτερη επιλεκτικότητα, όσο πιο μικρός είναι ο αριθμός των αναμιγνυόμενων σε ένα δείγμα συστατικών. Η επιλεκτικότητα ενός βιοαισθητήρα καθορίζεται, τόσο από το βιολογικό του τμήμα, όσο και από την μέθοδο με την οποία λειτουργεί ο μετατροπέας του.

✓ **Ευαισθησία**

Η ευαισθησία ενός βιοαισθητήρα είναι η παράγωγος της συνάρτησης μεταφοράς ως προς τη μετρήσιμη φυσική ποσότητα για μια ορισμένη τιμή της ποσότητας αυτής. Για μια γραμμική συνάρτηση μεταφοράς, η ευαισθησία του βιοαισθητήρα είναι γραμμική. Ένας βιοαισθητήρας με ιδανικά χαρακτηριστικά έχει μεγάλη και σταθερή ευαισθησία. Πιο αναλυτικά, το όριο ανίχνευσης ορίζεται αριθμητικά με το γινόμενο 3 επί του λόγου σήματος/θορύβου ($3X \text{ signal/noise}$).

✓ **Μονοτονικότητα**

Η μονοτονικότητα της συνάρτησης μεταφοράς ενός βιοαισθητήρα σημαίνει ότι η καμπύλη της συνάρτησης μεταφοράς είναι πάντα αύξουσα ή πάντα φθίνουσα ως προς την αύξηση της μετρήσιμης ποσότητας.

✓ **Σταθερότητα**

Η σταθερότητα του βιοαισθητήρα εξαρτάται κυρίως από το χρόνο ζωής του βιολογικού του μορίου. Όλοι οι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε απενεργοποίηση του βιολογικού μορίου, (θερμοκρασία, ακραία pH, αναστολείς κλπ), επηρεάζουν τη σταθερότητα του βιοαισθητήρα. Άλλοι παράγοντες που ελαττώνουν το χρόνο ζωής είναι οι οξειδωτικές αντιδράσεις στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, η προσρόφηση μορίων στο ενζυμικό στρώμα ή την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, οι συνθήκες λειτουργίας και η κακή ακινητοποίηση του βιολογικού μορίου. Η σταθερότητα ενός βιοαισθητήρα κατά την αποθήκευση, (storage stability) και κάτω από συνθήκες συνεχούς λειτουργίας, (operational stability), είναι δύο από τα σημαντικότερα ποιοτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα.

✓ **Εύρος συχνότητων**

Ο όρος εύρος συχνότητων, αναφέρεται στην μέγιστη και στην ελάχιστη τιμή του φυσικού μεγέθους που μπορεί να μετρήσει ο βιοαισθητήρας.

✓Χρόνος απόκρισης

Χρόνος απόκρισης ενός βιοαισθητήρα, είναι ο χρόνος που απαιτείται για να προσεγγιστεί το μέγιστο της συγκέντρωσης της αναλυτέας ουσίας. Ο χρόνος απόκρισης αποτελεί μέτρο υπολογισμού της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην μεταβολή της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας, όπως επίσης και της ελάχιστης εκείνης χρονικής καθυστέρησης που απαιτείται να παρέλθει προτού να συλλεχθούν οι πληροφορίες με απόλυτη ακρίβεια.

✓Γραμμική Απόκριση

Είναι γενικά επιθυμητό η απόκριση ενός βιοαισθητήρα να μεταβάλλεται γραμμικά με το μετρούμενο μέγεθος. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται η σχέση μεταξύ του σήματος εισόδου (οριζόντιος άξονας) και του σήματος εξόδου (κατακόρυφος άξονας). Η μη γραμμικότητα εκφράζεται ως η μέγιστη απόκλιση μεταξύ των σημείων και της γραμμής και συνήθως εκφράζεται ως η απόκλιση του εύρους του βιοαισθητήρα.

Εκτός από τα στατικά χαρακτηριστικά ενός βιοαισθητήρα, τα οποία αναφέρονται στην περίπτωση όπου έχει επέλθει ισορροπία μεταξύ σήματος εισόδου και βιοαισθητήρα, δηλαδή όταν πλέον τα σήματα εισόδου και εξόδου δεν μεταβάλλονται πλέον συναρτήσει του χρόνου, κάθε βιοαισθητήρας διαθέτει και δυναμικά χαρακτηριστικά. Τα δυναμικά χαρακτηριστικά περιγράφουν τη συμπεριφορά του αισθητήρα μεταξύ της στιγμής κατά την οποία το σήμα εισόδου μεταβάλλεται, έως την στιγμή κατά την οποία το σήμα εξόδου θα σταθεροποιηθεί εκ νέου. Τα δυναμικά χαρακτηριστικά ισχύουν, όπως και τα στατικά, εντός συγκεκριμένου εύρους συνθηκών λειτουργίας του βιοαισθητήρα. Εάν ο βιοαισθητήρας βρεθεί να λειτουργεί εκτός αυτού του εύρους, τότε τα δυναμικά χαρακτηριστικά αναμένεται να μεταβληθούν.

Σε ένα πραγματικό βιοαισθητήρα η συμπεριφορά και τα χαρακτηριστικά του πάντα αποκλίνουν από τον ιδανικό. Οι αιτίες είναι τόσο τα κατασκευαστικά προβλήματα που προκύπτουν όσο και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία του. Το ηλεκτρονικό κύκλωμα που συνοδεύει έναν βιοαισθητήρα μπορεί επίσης να επιβάλλει περιορισμούς στη λειτουργία του.

1.3.4. Πλεονεκτήματα βιοαισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες πλεονεκτούν ιδιαίτερα έναντι των κλασσικών αναλυτικών μεθόδων, όπως της αέριας και της υγρής χρωματογραφίας, (GC, LC) και της

φασματομετρίας μαζών, (MS), καθώς δεν ανιχνεύουν απλά την παρουσία μιας χημικής ουσίας, αλλά παρέχουν πληροφορίες και για την βιοδιαθεσιμότητα της ουσίας αυτής και για τις δυσμενείς επιπτώσεις που μπορεί να επιφέρει σε βιολογικά συστήματα. Επίσης, υπερτερούν και των συμβατικών χημικών βιοαισθητήρων (αναλυτική χημεία), χρησιμοποιούν βιολογικά συστήματα στην θέση χημικών συστημάτων, όπως κύτταρα, ένζυμα, αντισώματα και η παρακολούθηση των επιθυμητών παραμέτρων διεξάγεται *in vivo* (Mehrvan – Abdi 2004; Robbins et al. 2005).

Οι βιοαισθητήρες αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο στην επιστήμη των αισθητήρων καθώς:

- Τα στοιχεία τους παρουσιάζουν εκλεκτικότητα σε βιολογικά ενεργές ουσίες.
- Χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να αντιδρούν σε κάποιο ερέθισμα που προκαλεί η αναλυτέα ουσία με φυσιολογικό τρόπο.
- Διακρίνονται από υψηλή ευαισθησία και καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών.
- Δύνανται να παρέχουν λύσεις σε θέματα ελέγχου της συγκέντρωσης μιας αναλυτέας ουσίας, βασιζόμενοι σε μια ταχεία, ευαίσθητη, χαμηλού κόστους τεχνολογία.

Οι διατάξεις των βιοαισθητήρων πρέπει να χαρακτηρίζονται από εκλεκτικότητα και αξιοπιστία. Οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν ένα βιολογικό υλικό ως το αισθητήριο τμήμα και το σημαντικό πλεονέκτημα αυτών, είναι η αξιοσημείωτη ικανότητα τους να ξεχωρίζουν τον ενδιαφερόμενο και υπό ανίχνευση παράγοντα μεταξύ όμοιων του. Με τους βιοαισθητήρες επίσης είναι δυνατόν να μετρηθούν ειδικά συστατικά με μεγάλη ακρίβεια. Η μοναδικότητα τους βασίζεται στο ότι το αισθητήριο υλικό και ο μετατροπέας είναι ενοποιημένα σ' ένα μόνο αισθητήρα. Αυτή η ένωση δίνει τη δυνατότητα της μέτρησης των στοιχείων - στόχων, χωρίς τη χρησιμοποίηση αντιδραστηρίων.

Ενα άλλο επίσης πλεονέκτημα των βιοαισθητήρων σε σχέση με άλλες βιοαναλυτικές μεθόδους είναι ότι το ακινητοποιημένο βιολογικώς αναγνωρίσιμο στοιχείο μπορεί να αναπαραχθεί και να ξαναχρησιμοποιηθεί. Για τους ενζυμικούς βιοαισθητήρες, το ακινητοποιημένο ένζυμο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επανειλημμένες δοκιμές. Αυτή η ιδιαιτερότητα επιτρέπει τη χρησιμοποίηση των βιοαισθητήρων σε συνεχείς ή πολλαπλές δοκιμές. Αντίθετα, ανοσοδοκιμές περιλαμβανομένης και της μεθόδου ενζυμοσύνδετου ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), βασίζονται σε μη

αναστρέψιμη σύνδεση και σχηματισμό συμπλοκών, γι' αυτό και χρησιμοποιούνται μόνο μια φορά και μετά απορρίπτονται.

Παρ' όλα αυτά, έχουν και ορισμένους περιορισμούς, όπως είναι οι ηλεκτροχημικά ενεργές επιφάνειες των αναλυτέων ουσιών και η βραχυχρόνια σταθερότητα τους, καθώς όντας συστήματα που χρησιμοποιούν απομονωμένα βιολογικά συστατικά, αντιμετωπίζουν προβλήματα που αφορούν την σταθερότητα και τον χρόνο ζωής των βιολογικών αυτών συστατικών, (Mehrvan – Abdi 2004). Επίσης, υπάρχει η πιθανότητα να παρατηρηθούν σημαντικές αποκλίσεις στις αποκρίσεις των βιοαισθητήρων που χρησιμοποιούν κύτταρα ή οργανισμούς από διαφορετικές σειρές, κάτι που υποδεικνύει την ανάγκη για συνεχή και προσεκτικό έλεγχο των συνθηκών ανάπτυξης των διαφορετικών σειρών βιολογικού υλικού που χρησιμοποιείται, προκειμένου να απαλειφθούν τυχόν διαφοροποιήσεις μεταξύ τους. Η ηλικία, η θερμοκρασία, ο πληθυσμός και ο αερισμός μιας καλλιέργειας, είναι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απόκριση ενός βιοαισθητήρα (Ramakrishna et al.).

Συμπερασματικά οι βιοαισθητήρες χαρακτηρίζονται από εξειδίκευση, ταχύτητα, απλότητα στην εφαρμογή και δυνατότητα συνεχούς δοκιμής (Rogers and Gerlach 1996).

1.3.5. Εφαρμογές των βιοαισθητήρων

Τα βασικά χαρακτηριστικά των βιοαισθητήρων, τους καθιστούν δυναμικά και εφαρμόσιμα εργαλεία σε ποικίλα πεδία, όπως στη διαγνωστική, τη φαρμακευτική, τη βιοτεχνολογία και την περιβαλλοντική τεχνολογία, αλλά και σε χημικές βιομηχανίες και στη βιομηχανία τροφίμων. Η έρευνα και η ανάπτυξη των βιοαισθητήρων είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα του πώς η βασική έρευνα μπορεί να καθοδηγείται εν μέρει από την αγορά. Μπορεί η επίδραση της αγοράς να αποτελεί ένα μέρος μόνο των κινήτρων για την ανάπτυξη των βιοαισθητήρων, ωστόσο η έκταση των εν δυνάμει αγορών αντανακλά το εύρος των αναγκών και των δυνατών εφαρμογών. Συνοπτικά, οι εφαρμογές των βιοαισθητήρων θα μπορούσαν να κατηγοριοποιηθούν στους παρακάτω τομείς:

✓ Ιατρικοί - Φαρμακευτικοί - Διαγνωστικοί Ελεγχoi

Οι βιοαισθητήρες, χάρη στην υψηλή εξειδίκευση που τους χαρακτηρίζει, κάτι που οφείλεται στο βιολογικό τμήμα που εμπεριέχουν, βρίσκουν αρκετές εφαρμογές

στο πεδίο των κλινικών διαγνωστικών μελετών. Στην διαγνωστική χρησιμοποιούνται ως ολοκληρωμένα συστήματα αναλύσεων, στην φαρμακευτική εφαρμόζονται για την ανίχνευση και τον έλεγχο φαρμάκων και την ανακάλυψη καινούριων φαρμακευτικών ουσιών και στην ιατρική για την παροχή φαρμάκων και για διαγνωστικές *in vivo* εφαρμογές. Η ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη και την εμπορευματοποίηση καινούριων φαρμακευτικών σκευασμάτων, κάτι που αποτελεί την βάση για νέες θεραπείες. Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 70 και τις αρχές της δεκαετίας του '80, το πρωταρχικό εργαλείο για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων ήταν οι πληθυσμιακοί έλεγχοι, που βασίζονταν στην χρήση των ζώων και σε μεθόδους καλλιέργειας, κάτι που αργότερα αντικαταστάθηκε από την τεχνολογία της μοριακής βιολογίας. Στα μέσα της δεκαετίας του '80, επικράτησαν οι βιοτεχνολογικές μέθοδοι στον χώρο της ανακάλυψης νέων φαρμάκων, με την χρήση πρωτεϊνών, υποδοχέων και αντισωμάτων, προκειμένου να προβλεφθεί η δομή και η δράση των νέων αυτών φαρμακευτικών ουσιών. Αυτές οι μέθοδοι σχεδιασμού φαρμάκων, αποτέλεσαν τις βιοτεχνολογικές μεθόδους πρώτης γενιάς και οδήγησαν στην ανάπτυξη των μεθόδων δεύτερης γενιάς, που συνδυάζουν την μοριακή βιολογία με την τεχνολογία των αισθητήρων. Στα πεδία αυτά οι βιοαισθητήρες υπερέχουν από άλλες μεθόδους ανίχνευσης και ελέγχου, καθώς χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα εφαρμογών, ευκολία στην χρήση τους και στην μετακίνηση τους, παρέχουν ελέγχους πραγματικού χρόνου, για σχεδόν κάθε αναλυτέα ουσία, συμπεριλαμβανομένου των φαρμάκων, των τοξινών, των βακτηρίων και των ιών. Στη φαρμακολογία οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται κυρίως για τον προσδιορισμό της καθαρότητας φαρμάκων αφού παρέχουν τη δυνατότητα για ποσοτικό προσδιορισμό των διαφόρων εναντιομερών (Malhotra and Chaubey 2003).

✓ Περιβαλλοντικοί έλεγχοι

Οι βιοαισθητήρες βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή σε περιβαλλοντικούς ελέγχους, καθώς δύνανται να ανιχνεύσουν επικίνδυνες για το περιβάλλον ουσίες, όπως απόβλητα, ρυπαντικές ουσίες. Η ευκολία στην μεταφορά και την χρήση τους, οι ταχείες και οι συνεχείς έλεγχοι, οι επί τόπου αναλύσεις και το χαμηλό κόστος των βιοαισθητήρων, αποτελούν το κλειδί στην επιτυχή τους εφαρμογή στις περιβαλλοντικές αναλύσεις. Συγκριτικά με τις κλασσικές αναλυτικές μεθόδους, οι βιοαισθητήρες μπορούν να μειώσουν τον αριθμό των δειγμάτων που απαιτούν ακριβές εργαστηριακές αναλύσεις, αποκλείοντας από την διαδικασία, τα δείγματα εκείνα τα οποία δεν

περιέχουν την προς ανάλυση ουσία. Αντανακλώντας το εύρος των μολύνσεων οι βιοαισθητήρες που έχουν αναπτυχθεί για τη χρήση σε περιβαλλοντικές αναλύσεις καλύπτουν μεγάλο αριθμό ενώσεων από πολλές χημικές κατηγορίες, αλλά και μικροοργανισμών. Έτσι έχουν κατασκευαστεί βιοαισθητήρες για παρασιτοκτόνα, χλωροφαινόλες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, βαρέα μέταλλα, BOD (Biological Oxygen Demand), βακτήρια κλπ. (Rodriguez-Mozaz et al. 2004).

✓ **Βιομηχανικοί Ελεγχτοι**

Οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο σε βιομηχανίες παραγωγής και ζυμώσεων, προκειμένου να ελέγξουν την παραγωγή σακχάρων, αμινοξέων, αντιβιοτικών, ειδικευμένων χημικών ουσιών, συντηρητικών, αντιμικροβιακών ουσιών και μερικών γενετικά τροποποιημένων πρωτεϊνών. Επίσης ελέγχουν τις διαδικασίες παραγωγής, την ποιότητα των προϊόντων και χρησιμοποιούνται για την διεξαγωγή μετρήσεων των αποβλήτων των βιομηχανιών. Οι βιοαισθητήρες βρίσκουν εφαρμογή στους ποιοτικούς ελέγχους τροφίμων, που αποσκοπούν στον καθορισμό της ποιότητας και στην πιστοποίηση της συμμόρφωσης με την νομοθεσία. Η δυνατότητα συνεχούς παροχής δεδομένων ενός συγκεκριμένου αναλύτη είναι συχνά ανεκτίμητη για τον έλεγχο της διαδικασίας παρασκευής τροφίμων. Οι βιοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό σακχάρων (όπως γλυκόζη, φρουκτόζη), αιθανόλης σε ποτά τεχνητών αρωματικών και γλυκαντικών, αντιμικροβιακών παραγόντων, συντηρητικών, βιταμινών, τοξινών κλπ. (Alocilja and Radke 2003).

✓ **Γεωργικοί έλεγχτοι**

Με τους βιοαισθητήρες διεξάγονται διαγνωστικές αναλύσεις σε ζωικά και φυτικά δείγματα, καθώς εξετάζεται η καθαρότητα υδατικών και εδαφικών δειγμάτων, από ρυπογόνους παράγοντες, τοξικές χημικές ουσίες, παρασιτοκτόνα, φυτοφάρμακα, και μικρόβια. Στις συγκεκριμένες αναλύσεις οι βιοαισθητήρες πλεονεκτούν, καθότι εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση για τα παθογόνα κάτι που δεν χαρακτηρίζει άλλες αναλυτικές συσκευές που δεν εμπεριέχουν βιολογικό τμήμα.

✓ **Βιοτεχνολογικές διεργασίες**

Γενικά οι βιοτεχνολογικές διαδικασίες είναι πολύ πολύπλοκες και τα κύτταρα ή οι μικροοργανισμοί πρέπει να καλλιεργούνται κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Γι'

αυτό το λόγο ο ακριβής και άμεσος προσδιορισμός για τον έλεγχο των συνθηκών της ζύμωσης είναι απαραίτητος. Οι βιοαισθητήρες λόγω της δυνατότητας που προσφέρουν για αναλύσεις σε πραγματικό χρόνο, έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση τέτοιων διαδικασιών.

✓ Άλλες εφαρμογές

Οι βιοαισθητήρες βρίσκουν επίσης εφαρμογή στον τομέα της ρομποτικής, όπου μπορούν να αποτελέσουν το κλειδί για την ανάπτυξη του, όπως και σε στρατιωτικές αναλύσεις για την ανίχνευση χημικών, βιολογικών και τοξικών πολεμικών χημικών ουσιών.

1.4 Κυτταρικοί βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες είναι συστήματα μέτρησης η αποδοτικότητα των οποίων, όπως έχει προαναφερθεί, βασίζεται στην ευαισθησία του βιολογικού τμήματος ανίχνευσης, προκειμένου να ανιχνεύσουν βιολογικής φύσεως ουσίες. Μια σημαντική κατηγορία των βιοαισθητήρων είναι οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες, (Cell-Based Biosensors, CBBs), οι οποίοι χρησιμοποιούν ολόκληρα κύτταρα, ως βιολογικό τμήμα ανίχνευσης. Η κινητοποίηση γύρω από την ανάπτυξη των κυτταρικών βιοαισθητήρων, ξεκίνησε από την ανάγκη για την εκτενή μελέτη των φυσιολογικών επιδράσεων αναλυτέων ουσιών.

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μια ραγδαία αύξηση στον αριθμό των διαγνωστικών εφαρμογών που βασίζονται στους βιοαισθητήρες κυττάρων, ιστών, οργάνων ή ολόκληρων οργανισμών (Kintzios 2006). Ενας κυτταρικός βιοαισθητήρας, χρησιμοποιεί τις φυσιολογικές αποκρίσεις ζωντανών κυττάρων (όπως κατανάλωση οξυγόνου, επιφανειακό χημικό ή ηλεκτρικό δυναμικό, κινητικότητα ή γενετική ενέργεια) ως το αισθητήριο τμήμα. Ολόκληρα-ακέραια και ζωντανά κύτταρα παρέχουν το πλεονέκτημα της ύπαρξης πολλών καταλυτών, με πολλαπλούς ρόλους, ειδικά στις λειτουργίες εκείνες που απαιτούν τη συμμετοχή ενζύμων σε σειρά. Έτσι, η χρήση κυττάρων ως πηγή ενδοκυτταρικών ενζύμων, είναι συχνά καλύτερη εναλλακτική λύση σε πολλές βιομηχανικές διαδικασίες - δεν χρειάζεται να γίνει η απομόνωση και ο καθαρισμός των αντιστοιχών ενζύμων - από ότι η χρησιμοποίηση διαλυμένων ενζύμων (Bickerstaff 1997, Souza 1999). Ταυτόχρονα, επειδή τα ένζυμα βρίσκονται στο φυσικό

τους περιβάλλον, οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες είναι πιθανό να έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής.

Στόχος των κυτταρικών βιοαισθητήρων είναι να παρέχουν ποσοτικές και ποιοτικές αναλυτικές πληροφορίες, παρουσία κάποιας βιολογικά ενεργής αναλυτέας ουσίας. Χρησιμοποιούν κύτταρα σε συνθήκες *in vitro*, προκειμένου να ανιχνεύσουν και να ταξινομήσουν αναλυτέες ουσίες με βάση την επίδραση τους στην δραστηριότητα των κυττάρων. Αυτή η πολυπλοκότητα καθιστά δύσκολη την πρόβλεψη των επιδράσεων κάποιας άγνωστης βιολογικής ουσίας, σε ένα κύτταρο και αυτό απαιτεί την διενέργεια της διαδικασίας, απευθείας, σε άθικτα και λειτουργικά κύτταρα.

Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες αποτελούνται από τα ίδια τμήματα που απαρτίζουν τους βιοαισθητήρες γενικά, (Κεφάλαιο 1.3.1). Στους κυτταρικούς βιοαισθητήρες η διαδικασία μεταγωγής σημάτων διεξάγεται σε δυο στάδια. Τα κύτταρα λειτουργούν ως πρωταρχικοί μεταγωγείς, "μετατρέποντας" την ανιχνεύσιμη ουσία σε κυτταρικό σήμα. Ένας δευτερεύων μεταγωγέας σήματος απαιτείται για την μετατροπή της κυτταρικής /βιοχημικής απόκρισης σε ανιχνεύσιμο σήμα, προκειμένου να αναλυθεί, (Σχήμα 1.3). Ο τύπος του δευτερεύοντα μεταγωγέα σήματος που θα χρησιμοποιηθεί, εξαρτάται από τον τύπο του κυτταρικού σήματος που θα εξεταστεί (Bedioui 1999).

Υπάρχουν πολλοί λόγοι για τους οποίους τα ζωντανά κύτταρα είναι κατάλληλα για τις διαδικασίες ανίχνευσης. Παρόλο που τα κύτταρα είναι οι μικρότερες δομικές μονάδες όλων των οργανισμών, πέραν των ιών και των prions, διαθέτουν υψηλά εξελιγμένα βιοχημικά μονοπάτια, γεγονός που τους παρέχει μεγάλη ευαισθησία σε μεγάλο εύρος βιοχημικών ερεθισμάτων. Καθώς οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες κάνουν χρήση απευθείας μετρήσεων της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων και των μεταβολών που υποκινούνται στα κύτταρα από τοξικές ουσίες, (μεταβολή ηλεκτροχημικής κυτταρικής απόκρισης), παρέχουν την δυνατότητα ανίχνευσης άγνωστων ουσιών. Αυτές οι ιδιότητες διαχωρίζουν τους κυτταρικούς βιοαισθητήρες από τους μοριακούς βιοαισθητήρες, οι οποίοι βασίζονται στην εξέταση άλλων γεγονότων. Οι ανοσοαισθητήρες ή οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες, ανιχνεύουν την δημιουργία δεσμών μεταξύ συγκεκριμένων δομικών μονάδων. Η δημιουργία δεσμού, όμως, δεν παρέχει πληροφορίες για την φυσιολογική επίδραση μιας αναλυτέας ουσίας. Επίσης, οι ανοσοαισθητήρες και οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες περιορίζονται στην ανίχνευση συγκεκριμένων, ήδη αναγνωρισμένων ουσιών. Αντιθέτως, οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτενή μελέτη ουσιών με άγνωστη βιοχημική

δομή (Hulanicki et al. 1991). Δυνητικές εφαρμογές, οι οποίες θα μπορούσαν να επωφεληθούν από την εκτενή μελέτη της λειτουργικότητας κάποιων ουσιών, είναι η φαρμακολογία, η κυτταρική βιολογία, η τοξικολογία και περιβαλλοντικοί έλεγχοι (Bedioui 1999).

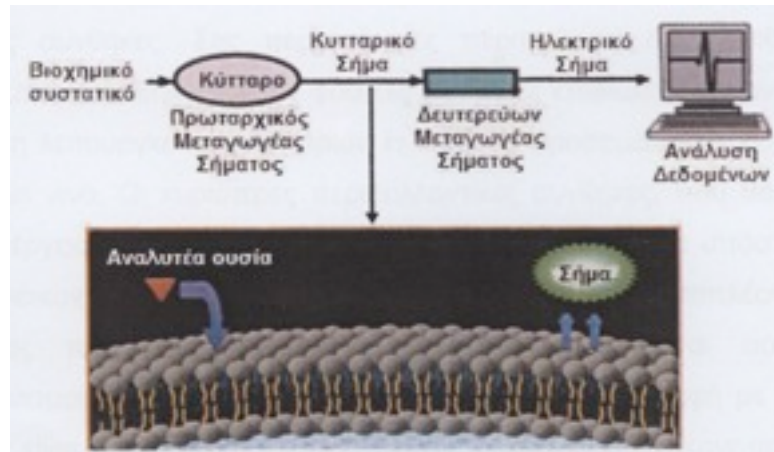
Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες έχουν το πλεονέκτημα της αυξημένης σταθερότητας, της μεγάλης βιοκαταλυτικής δραστηριότητας, ενώ το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να παρέχουν σχετικές κυτταρικές πληροφορίες σε απόκριση με το δείγμα και να μετρούν την δραστικότητά του. Με άλλα λόγια οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι εκτελούν λειτουργίες όπως τα κύτταρα, όχι μόνο ανιχνεύουν την παρουσία ενός στοιχείου, αλλά είναι ακόμη ικανοί να αποκρίνονται με έναν τρόπο που προσφέρει επίγνωση της φυσιολογικής επίδρασης του δείγματος στα κύτταρα (Gilchrist et al. 2001, Stenger et al. 2001). Επιπλέον η ανάγκη για βιοαισθητήρες με χρόνο ζωής εβδομάδων ή μηνών αποκλείει τη χρήση ηλικιωμένων κυττάρων, κάτι που απαιτεί κατανάλωση χρόνου για συλλογή και προετοιμασία των κυττάρων. Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες επίσης παρέχουν ένα περισσότερο πολύπλοκο – σύνθετο αισθητήριο σύστημα το οποίο περιλαμβάνει πολλαπλά ολοκληρωμένα μοριακά συστατικά και έχουν το πλεονέκτημα της οικονομικής βιομηχανοποίησής τους.

Ενα από τα γνωρίσματα που κάνουν τους κυτταρικούς βιοαισθητήρες ελκυστικούς ως αναλυτικό εργαλείο είναι η μεγάλη ευαισθησία τους, η οποία υποτίθεται ότι επιτρέπει, σε ορισμένες περιπτώσεις, τη δυνατότητα να ανιχνεύει ένα μόνο μόριο-στόχο (Kintzios 2007).

Παρόλα αυτά, όπως και με άλλους βιοαισθητήρες, η ευαισθησία και η αξιοπιστία αυτών των αισθητήρων είναι συχνά περιορισμένη λόγω των μη εξειδικευμένων παρεμβάσεων οφειλόμενων στο δείγμα και στις εξωτερικές, περιβαλλοντικές μεταβολές (όπως το pH και η θερμοκρασία). Παρουσιάζουν επίσης φτωχή επιλεκτικότητα επειδή οι ιστοί περιέχουν πολλά διαφορετικά ένζυμα και υποδοχείς και ο βιοαισθητήρας μπορεί να αποκρίνεται και σε άλλες ουσίες εκτός της επιθυμητής. Ενα ακόμη μειονέκτημά των βιοαισθητήρων που βασίζονται σε φυτικά κύτταρα ή σε κύτταρα μικροοργανισμών είναι η διάχυση του δείγματος και των προϊόντων δια μέσου του κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα την αργή απόκριση σε αντίθεση με τους ενζυμικούς βιοαισθητήρες όπου η απόκριση είναι άμεση (Rainina 1996). Με άλλα λόγια αυξάνεται ο χρόνος που χρειάζεται ο βιοαισθητήρας για να

αποκριθεί, αφού η προς ανάλυση ουσία πρέπει να διαχυθεί διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών για να γίνει η κατάλυση από τα αντίστοιχα ένζυμα.

Ωστόσο οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες σήμερα χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο σε εφαρμογές όπως ο προσδιορισμός παραγόντων μόλυνσης για παράδειγμα βιομηχανικά απόβλητα, βαρέα μέταλλα, ζιζάνια κ.τ.λ.



Σχήμα 1.3 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος σε ένα κυτταρικό βιοαισθητήρα (Fraden 2004, DeBusschere 2002).

1.4.1 Σχεδιασμός κυτταρικού βιοαισθητήρα

Κατά την ανάπτυξη ενός συστήματος ελέγχου του εξωκυττάριου δυναμικού δράσης, είναι απαραίτητη η ικανοποίηση κάποιων καθοριστικών κριτηρίων, για την ορθή λειτουργία του συστήματος. Ο επιτυχής σχεδιασμός ενός κυτταρικού βιοαισθητήρα γίνεται με βάση την επιλογή του κατάλληλου τύπου κυττάρων, την εφαρμογή των κατάλληλων για τα κύτταρα περιβαλλοντικών συνθηκών και την χρησιμοποίηση του κατάλληλου δευτερεύοντα μεταγωγέα σημάτων.

Κατά τον σχεδιασμό ενός κυτταρικού βιοαισθητήρα πρέπει να γίνει επιλογή του κατάλληλου τύπου κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν. Θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από την δυνατότητα παροχής αναπαραγωγίσιμης και μετρήσιμης απόκρισης στην εκάστοτε βιολογική αναλυτέα ουσία. Υπάρχουν ορισμένα επιπρόσθετα επιθυμητά, αλλά όχι τόσο καθοριστικά, τα οποία θα μπορούσαν να απλοποιήσουν την πρακτική εφαρμογή των κυττάρων σε έναν κυτταρικό βιοαισθητήρα. Αυτά είναι η πηγή προέλευσης των κυττάρων, (ευκολία απομόνωσης και προετοιμασίας), η φύση και τα χαρακτηριστικά του παραγόμενου σήματος, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις μπορούν να βελτιωθούν με γενετικούς χειρισμούς. Στην πραγματικότητα κάθε τύπος κυττάρου

μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ενός κυτταρικού βιοαισθητήρα. Ο πιο κοινός τύπος κυττάρων που χρησιμοποιούν οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες είναι τα βακτηριακά κύτταρα και οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες είναι οι μικροβιακοί βιοαισθητήρες. Λιγότερο συχνά, χρησιμοποιούνται κύτταρα ανωτέρων φυτών και ζώων στους λεγόμενους βιοαισθητήρες ιστών (tissue biosensors).

Ο σχεδιασμός των κυτταρικών βιοαισθητήρων περιορίζεται σημαντικά από τις φυσιολογικές απαιτήσεις των ζωντανών κυττάρων που χρησιμοποιούνται ως κύριοι μετατροπείς των σημάτων. Τα κύτταρα, γενικά, απαιτούν την ύπαρξη ενός ισορροπημένου φυσικοχημικού περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα θηλαστικών, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να επιβιώσουν και να μπορέσουν να "ανταποκριθούν", με αναπαραγωγίσιμο τρόπο, σε κάποια βιολογική ουσία θα πρέπει να βρεθούν υπό ορισμένες κατάλληλες συνθήκες. Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι επιθυμητός ο σχεδιασμός πανομοιότυπων συνθηκών με τις φυσικές συνθήκες επιβίωσης και ανάπτυξης των κυττάρων, έτσι ώστε η λειτουργία των κυττάρων *in vitro* να προσομοιάζει της τυπικής απόκρισης των κυττάρων *in vivo*. Οι κυριότερες περιβαλλοντικές συνθήκες, που θα πρέπει να ρυθμιστούν στην καλλιέργεια κυττάρων, είναι η θερμοκρασία επώασης, το υπόστρωμα της καλλιέργειας και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του μέσου ανάπτυξης. Επιπλέον, το περιβάλλον της καλλιέργειας των κυττάρων αυτών θα πρέπει να είναι ασηπτικό, καθαρό από μικροοργανισμούς και όλα τα υλικά τα οποία έρχονται σε επαφή με το μέσο ανάπτυξης, θα πρέπει να είναι μη-κυτταροτοξικά. Η βέλτιστη θερμοκρασία ικανοποιητικής ανάπτυξης των κυττάρων αυτών υπολογίζεται στους 37°C, ενώ η υπερθέρμανση τους οδηγεί την θανάτωσή τους. Επίσης, ένα τυπικό μέσο ανάπτυξης των κυττάρων αυτών θα πρέπει να εμπεριέχει άλατα, γλυκόζη, αμινοξέα και βιταμίνες. Κάποιες κυτταρικές σειρές απαιτούν την προσθήκη ορού, ο οποίος περιέχει παράγοντες αύξησης πολυπεπτιδίων και προσκολλητικούς παράγοντες, υποβοηθώντας έτσι την ανάπτυξη και την διαίρεση των κυττάρων. Παρόλα αυτά, η προσθήκη ορού έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη και άλλων άγνωστων συστατικών στο μίγμα, επηρεάζοντας έτσι με ένα μη προβλέψιμο τρόπο την ανίχνευση της προς ανάλυσης ουσίας. Τέλος, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των κυττάρων θηλαστικών, παίζει η τιμή του pH του μέσου ανάπτυξης. Ο μεταβολισμός και η ηλεκτροφυσιολογία των κυττάρων είναι ευαίσθητα στις μεταβολές του pH.

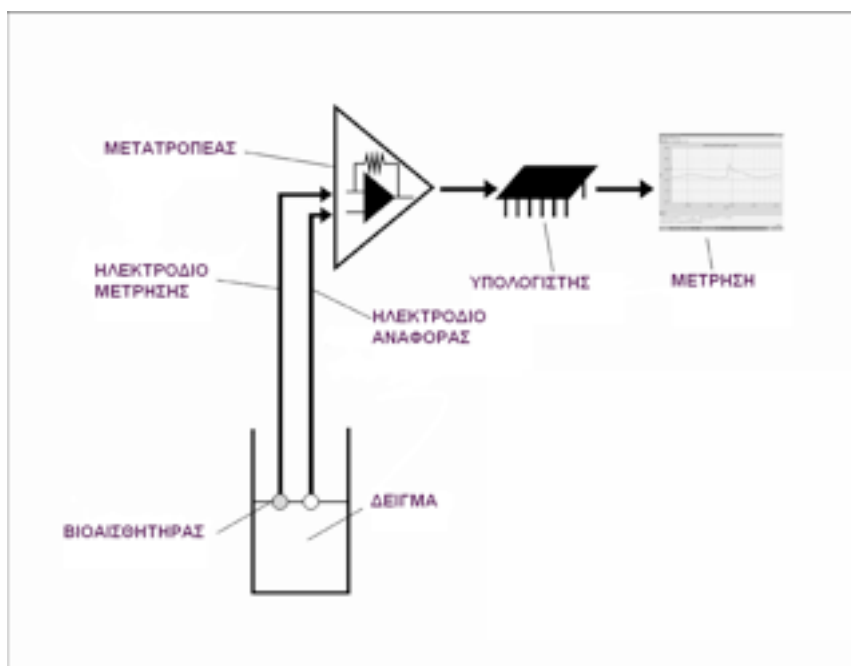
Ενα άλλο στοιχείο που πρέπει να εξεταστεί κατά τον σχεδιασμό ενός κυτταρικού βιοαισθητήρα είναι ο τύπος του δευτερεύοντα μετατροπέα σήματος που

θα επιλεγεί. Το κατάλληλο κυτταρικό σήμα που θα μελετηθεί και αντίστοιχα ο κατάλληλος μετατροπέας σήματος που θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε έναν κυτταρικό βιοαισθητήρα, εξαρτάται από την εφαρμογή για την οποία θα χρησιμοποιηθεί ο βιοαισθητήρας. Η βέλτιστη επιλογή ενός μετατροπέα σήματος σχετίζεται άμεσα με τον τύπο των κυττάρων που έχουν επιλεγεί για τον συγκεκριμένο κυτταρικό βιοαισθητήρα και η επιθυμητή μέθοδος του δευτερεύοντος μεταγωγέα σήματος θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από την εξαγωγή ερμηνεύσιμων αποτελεσμάτων και από την διεξαγωγή των αναλύσεων σε πραγματικό χρόνο (Borkholder 1998; DeBusschere 2002). Σε προσπάθειες ανάπτυξης κυτταρικών βιοαισθητήρων, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τύποι μετατροπέων σήματος, προκειμένου να εξεταστεί και να επεξεργαστεί η ανταπόκριση των κυττάρων και η παραγωγή του κατάλληλου σήματος. Υπάρχουν διάφοροι τύποι κυτταρικών σημάτων, τα οποία θα μπορούσαν να εξεταστούν, ως αποτέλεσμα των κυτταρικών αντιδράσεων και να δώσουν τις επιθυμητές πληροφορίες. Μια κατηγορία σημάτων αφορά τον έλεγχο των ενδοκυτταρικών διεργασιών, όπως την μελέτη των διαδικασιών αντιγραφής και μετάφρασης του DNA ή της πρωτεϊνσύνθεσης. Άλλοι τύποι κυτταρικών μηνυμάτων είναι οι μεταβολές στον μεταβολισμό των κυττάρων ή η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Μια άλλη πηγή κυτταρικών πληροφοριών, είναι η μέτρηση της μεταβολής του ηλεκτρικού δυναμικού του κυττάρου, δηλαδή της μεμβρανικής ηλεκτρικής δραστηριότητας μερικών τύπων ηλεκτρικά ενεργών κυττάρων, μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Επειδή το ηλεκτρικό δυναμικό των κυττάρων επηρεάζεται από πολυάριθμες κυτταρικές βιοχημικές διεργασίες, οι κυτταρικοί αισθητήρες που βασίζονται στην ηλεκτρική δραστηριότητα των κυττάρων, επωφελούνται από την υψηλή ευαισθησία των κυττάρων που χρησιμοποιούν. Στην περίπτωση μέτρησης του κυτταρικού δυναμικού, οι δευτερεύοντες μεταγωγείς σημάτων μπορεί να είναι εξωκυτταρικά μικροηλεκτρόδια (Σχήμα 1.4). Η επιλογή της μεθόδου μέτρησης και εξέτασης του εξωκυτταρικού δυναμικού, ως μηχανισμού κύριας μεταγωγής σήματος από το κύτταρο, περιορίζει αυτομάτως τον αριθμό των πιθανών κυτταρικών τύπων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, σε εκείνα τα οποία είναι ηλεκτρικά ενεργά και παράγουν μετρήσιμο εξωκυτταρικό δυναμικό, καθώς έτσι γίνεται δυνατός ο προσδιορισμός τοξικών, φαρμακευτικών και άλλων ουσιών που επηρεάζουν την ηλεκτρική δραστηριότητα των κυττάρων και μια κατηγορία τέτοιων κυττάρων είναι τα νευρικά κύτταρα, για τα οποία γίνεται εκτενής αναφορά παρακάτω. Η πολυπλοκότητα των μονοπατιών σηματοδότησης των κυττάρων, καθιστά ικανή την

οποιαδήποτε αναλυτέα ουσία να παράγει κάποιον συνδυασμό των προαναφερθέντων τύπων κυτταρικών σημάτων.

Επιπλέον κατά την επιλογή του κατάλληλου μετατροπέα σήματος, πρέπει να εξασφαλιστεί ότι το παραγόμενο σήμα θα είναι δυνατόν να επεξεργαστεί και να αναλυθεί κατά ένα ερμηνεύσιμο τρόπο και οι αναλύσεις που θα διεξαχθούν θα πρέπει να είναι αναλύσεις πραγματικού χρόνου, ιδιαίτερα στην περίπτωση τοξικολογικών ελέγχων. Παράλληλα, είναι επιθυμητή η μέγιστη δυνατή αυτοματοποίηση του συστήματος και η διεξαγωγή των ελάχιστων δυνατών πειραματικών χειρισμών, που θα οδηγήσουν στην απόκτηση στατιστικά έγκυρων αποτελεσμάτων.

Τέλος το σήμα που παράγεται από τον δευτερεύοντα μεταγωγέα, θα πρέπει να είναι ηλεκτρονικά επεξεργάσιμο και στις περισσότερες περιπτώσεις να είναι μετατρέψιμο σε δεδομένα ψηφιακής μορφής, προκειμένου να αναλυθεί με την χρήση κατάλληλων λογισμικών προγραμμάτων (DeBusschere 2002).



Σχήμα 1.4 Διάταξη κυτταρικού βιοαισθητήρα (Moschoroulou et al. 2008)

1.4.2 Ηλεκτροφυσιολογικές μέθοδοι μέτρησης – Εφαρμογές

Ηλεκτρικά ενεργά κύτταρα ή ιστοί, μπορούν να διασυνδεθούν με μικροηλεκτροδια που επιτρέπουν τη σύλληψη εξωκυτταρικών σημάτων συσχετιζόμενων με την κυτταρική απόκριση ή την απόκριση ολόκληρου ιστού. Η αλληλεπίδραση αυτή αναφέρεται σε συστατικά που μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες:

- Άμεση αλληλεπίδραση των μικροηλεκτροδίων με την κυτταρική μεμβράνη
- Αλληλεπίδραση με στοιχεία-αναλύτες παρόντα στο εξωκυτταρικό μικροπεριβάλλον
- Αλληλεπίδραση με άλλα μέρη του στόχου, όπως το στερεό

κολλοειδές και το διάλυμα που είναι συγκεντρωμένο στους πόρους της μήτρας (ακινητοποιημένοι κυτταρικοί βιοαισθητήρες) ή με το διάλυμα καλλιέργειας (εναιώρημα κυτταρικών βιοαισθητήρων).

Υπάρχει ήδη ένας αξιοσημείωτος αριθμός βιοαισθητηριακών μεθόδων που βασίζονται σε ηλεκτροφυσιολογικές επιδράσεις. Μερικές από αυτές χρησιμοποιούν κύτταρα, άλλες χρησιμοποιούν αναλύσεις ηλεκτρικών ιδιοτήτων ή ακινητοποιημένα στοιχεία. Η πιο στοιχειώδης εκδοχή και η συνηθέστερη ηλεκτροφυσιολογική μέθοδος μέτρησης αλληλεπιδράσεων είναι αυτή, όπου ο βιοαισθητήρας περιλαμβάνει το κυτταρικό μέρος, που συνδέεται με το άκρο ενός μικροηλεκτροδίου και επικοινωνεί με ένα μετασχηματιστή που μετρά ηλεκτρικό ρεύμα σε picoampere. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο (patch-clamp) ένα μόνο κύτταρο ή μέρος της κυτταρικής μεμβράνης, έρχεται σε άμεση επαφή με μια μορφή ηλεκτροδίου. Συνήθως εφαρμόζεται τάση στο τμήμα αυτό και στη συνέχεια αποτιμάται η μεταβολή στη τιμή του μεμβρανικού ρεύματος-picoampere (Pantoja et al. 2004).

Η γενική αρχή λειτουργίας των μεθόδων που βασίζονται σε ηλεκτρόδιο είναι η εξής: κατασκευάζεται ένα ηλεκτρόδιο το οποίο αποτελείται από αγωγίμο σύρμα (π.χ. άργυρο, χρυσό ή πλατίνα) τοποθετημένο σε πιπέττα γεμάτη από ηλεκτρολυτικό διάλυμα. Με το σύστημα αυτό, όταν η άκρη της πιπέττας έρθει σε επαφή με το βιολογικό υλικό, δημιουργείται μια αγωγίμη γέφυρα, μέσα από την οποία μπορεί να συνδεθεί μια συσκευή καταγραφής ρεύματος ή δυναμικού. Εκτός από το ηλεκτρόδιο μέτρησης υπάρχει και το ηλεκτρόδιο αναφοράς σε μια σταθερή τιμή ρεύματος ή δυναμικού. Συνήθως χρησιμοποιείται σύστημα δυο ζευγών ηλεκτροδίων (μέτρησης – αναφοράς) έτσι ώστε, να είναι δυνατή η μέτρηση του ρεύματος ή του δυναμικού μετά από εξωγενή εφαρμογή ρεύματος ή δυναμικού (αμπερομετρία – βολταμετρία) (Guilbault 1991).

Προηγμένη τεχνολογία ποτενσιομετρικών βιοαισθητήρων αποτελούν οι μικρο-βιοαισθητήρες με τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων ή **ISEs (Ion selective electrons)** και οι βιοαισθητήρες επαγόμενου πεδίου ή **FETs (Field effect transistors)**.

Στα ISEs καταγράφεται το δυναμικό που αναπτύσσεται στην επιφάνεια μιας μεμβράνης (στερεής ή υγρής) συναρτήσει ενός συστήματος αναφοράς (Ημιστοιχείο με γνωστό και σταθερό δυναμικό). Συνήθως στη επιφάνεια της μεμβράνης /διαλύματος λαμβάνει χώρα μια ισορροπία ανταλλαγής ή ιοανταλλαγής. Το δυναμικό που αναπτύσσεται εξαρτάται κυρίως από τη μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια που σχετίζεται με τη μεταφορά μάζας διαμέσου της επιφάνειας μεμβράνης/διαλύματος ανάλυσης. Η λειτουργία των βιοαισθητήρων επαγόμενου πεδίου βασίζεται στην επιλεκτική αλληλεπίδραση μιας επιφάνειας με ιόντα που βρίσκονται στο διάλυμα. Αυτή η αλληλεπίδραση αλλάζει το δυναμικό της επιφάνειας και μέσω φαινομένων επαγόμενου πεδίου, επηρεάζεται η αντίσταση ενός ημιαγωγού που βρίσκεται σε κοντινή απόσταση με την επιφάνεια. Το μέγεθος της αλλαγής στην αντίσταση του ημιαγωγού υπολογίζεται από το δυναμικό που χρειάζεται να εφαρμοστεί κατά μήκος του αγωγού για τη διέλευση σταθερής έντασης ρεύματος.

Στα FETs έχουμε την ικανότητα να μετράμε μεταβολές της συσσώρευσης φορτίων στην επιφάνεια του. Συνεπώς, εάν η επιφάνεια τροποποιηθεί με ειδικά εκλεκτικά υλικά, το FET μετατρέπεται σε διάταξη ευαίσθητη στις μεταβολές της συσσώρευσης πρωτονίων ή άλλων ιόντων. Δηλαδή, το FET είναι δυνατόν να μετατραπεί σε **ISFET (Ion-selective FET)**. Το αναπτυσσόμενο δυναμικό είναι ανάλογο προς τη συγκέντρωση των εξωτερικών ιόντων ή, γενικότερα των φορτισμένων μορίων έναντι των οποίων το συγκεκριμένο ISFET είναι εκλεκτικό (Martinoia et al., 2005). Η επικάλυψη ενός ISFET (π.χ. πρωτονιο-εκλεκτικού FET) με ανθεκτική λεπτή μεμβράνη, η οποία φέρει ακινητοποιημένο το κατάλληλο ένζυμο και η οποία έρχεται σε επαφή με το προς ανάλυση δείγμα αποτελεί εξελιγμένο ενζυμικό μικρο-βιοαισθητήρα τύπου **ENFET (Enzyme field effect transistor)**. Η μεταβολή της συγκεντρώσεως ιόντων (π.χ. πρωτονίων) στην επιφάνεια του ENFET, λόγω της ενζυμικής αντιδράσεως, επηρεάζει το αναπτυσσόμενο δυναμικό, φαινόμενο το οποίο τελικώς μετριέται (Xi-Liang Luo et al. 2004). Τέτοιες διατάξεις εμφανίζουν αξιοπιστία και ανθεκτικότητα, ταχεία απόκριση λόγω της λεπτής επιφάνειας ανιχνεύσεως (μεμβράνης) και ευκολία μαζικής παραγωγής (Κλώνης 1997).

1.4.3 Μέθοδος Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης, BERA

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε ένα σύστημα μέτρησης της μεταβολής του ηλεκτρικού δυναμικού (ή άλλων ηλεκτρικών ιδιοτήτων) (Kintzios et al. 2001a,b) όχι ενός μεμονωμένου τμήματος της κυτταρικής μεμβράνης ή ενός μόνο κυττάρου, αλλά σε επίπεδο ιστού. Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση κυτταρικών βιοαισθητήρων, βασιζόμενων στη **μέθοδο Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (Bioelectric Recognition Assay, BERA)** και είναι μια μέθοδος ανίχνευσης ιών και άλλων βιοενεργών ουσιών (π.χ. φυτοφάρμακα), η οποία βασίζεται στη μέτρηση μεταβολών των ηλεκτρικών ιδιοτήτων ομάδας κυττάρων κατάλληλα ακινητοποιημένων εντός πηγματος, έτσι ώστε να διατηρούνται οι φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες κατά την αλληλεπίδραση με τους υπό ανίχνευση ιούς. Τα κύτταρα που επιλέγονται ως βιολογικό υλικό, πρέπει να αλληλεπιδρούν εξειδικευμένα με τα προς ανάλυση συστατικά, προκειμένου να υπάρξει μεταβολή στο ηλεκτρικό τους δυναμικό και να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση. Είναι εφικτή η ανίχνευση ανθρώπινων και φυτικών ιών με τρόπο εξειδικευμένο, γρήγορο (1-5 min), υψηλής ευαισθησίας (της τάξης των femtomol), αξιοσημείωτα αναπαραγωγίμο και οικονομικό. Η ευαισθησία της ανίχνευσης με BERA (0,001-0,1ng) είναι ανάλογη με προηγμένες ανοσολογικές, κυτταρολογικές και μοριακές τεχνικές.

Ειδικότερα, σε αυτές τις περιπτώσεις έχουν εφαρμοσθεί και Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (Artificial Neural Networks) σε συνδυασμό με την ανάπτυξη του βιοαισθητήρα BERA για την αναγνώριση ιών των φυτών (Frossyniotis et al. 2006, 2008).

Επιπροσθέτως, έχει χρησιμοποιηθεί η μέθοδος BERA για την ανίχνευση παρουσίας ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και την επίδραση που μπορεί να έχουν στην κυτταρική διαίρεση των φύλλων στο φυτό *Spirodela polyrrchiza* (Moschoroulou et al. 2007).

1.4.4 Γενιές Κυτταρικών Βιοαισθητήρων

Εως σήμερα έχουν αναπτυχθεί έξι γενιές κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA και στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται η 5^η γενιά με δύο διαφορετικές μεθόδους. Επιγραμματικά, στην 1^η γενιά ο βιοαισθητήρας περιείχε ακινητοποιημένα κύτταρα σε 0,8% αγαρόζη και είχε την μορφή σωλήνα 15 ml. Η 2^η γενιά είχε, επίσης, την μορφή σωλήνα και τα κύτταρα ήταν ακινητοποιημένα σε αγαρόζη, με την διαφορά ότι είχε

πολύ μικρότερο όγκο (1 ml), οπότε απαιτούσε μικρότερη ποσότητα υλικών (Kintzios et al. 2001a,b, 2003, Pistola 2003). Η 3^η και 4^η γενιά κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA (Kintzios et al. 2006, Marinopoulou 2005) είχαν την μορφή επίπεδης στοιβάδας και στην μεν 3^η γενιά τα κύτταρα ήταν ακινητοποιημένα σε «φλούδα» αλγινικού ασβεστίου, στην δε 4^η γενιά δημιουργήθηκε ένα αγωγίμο πλέγμα αλγινικού ασβεστίου με πηγαδάκια στον πυθμένα των οποίων υπήρχαν τα ηλεκτρόδια και γινόταν εφαρμογή των κυττάρων μέσα σε αυτά τα πηγαδάκια. Οι βιοαισθητήρες BERA 3^{ης} γενιάς είναι κατάλληλοι για την μελέτη της κυτταροδιαίρεσης και της 4^{ης} γενιάς για την μελέτη επικοινωνίας των κυττάρων και αλληλεπίδρασης με διάφορες ουσίες. Η 5^η γενιά αισθητήρων έχει μορφή σφαιριδίου αποτελούμενου από κύτταρα ακινητοποιημένα σε πήγμα αλγινικού ασβεστίου, διαμέτρου μόλις 2 χιλιοστών. Η 6^η γενιά είναι σχηματικά όμοια με την 5^η, με τη διαφορά ότι τα κύτταρα έχουν τροποποιηθεί («μιμητικά κύτταρα») έτσι ώστε να φέρουν στην επιφάνεια τους υποδοχείς (αντισώματα ή ένζυμα) ικανούς να αντιδράσουν εκλεκτικά με τα υπό ανίχνευση μόρια. Οι Moschoroulou and Kintzios (2006) ανέπτυξαν έναν υβριδικό τύπο βιοαισθητήρα BERA (αισθητήρας 6^{ης} γενιάς), βασισμένο σε θηλαστικά κύτταρα τα οποία είχαν τροποποιηθεί μεμβρανικώς με SOD (δισμουτάση του O_2^-). Ακόμη, έχουν χρησιμοποιηθεί κύτταρα των οποίων η μεμβράνη τροποποιήθηκε με ειδικά αντισώματα για την ανίχνευση του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς (Moschoroulou et al. 2008).

1.4.5 Θεωρία κυτταρικής λειτουργίας και απόκρισης

Καθώς τα κύτταρα αποτελούν τους πρωταρχικούς μεταγωγείς σημάτων των κυτταρικών βιοαισθητήρων, είναι απαραίτητη η γνώση της δομής και της ηλεκτροφυσιολογίας τους, προκειμένου να γίνει αντιληπτή η διαδικασία παραγωγής σημάτων από αυτά και οι περιορισμοί που εμπλέκονται στον σχεδιασμό των κυτταρικών βιοαισθητήρων.

Οι κυτταρικές μεμβράνες συμμετέχουν σε όλες τις διεργασίες που σχετίζονται με την επιβίωση, αναπαραγωγή και λειτουργικότητα των κυττάρων όπως:

Διαμερισματοποίηση: είναι προφανές ότι η πλασματική μεμβράνη διαχωρίζει το κύτταρο από το περιβάλλον και οι ενδοκυτταρικές μεμβράνες διαμερισματοποιούν το κυτταρόπλασμα.

Ελεγχος της διαμετακίνησης των βιομορίων: οι μεμβράνες ελέγχουν τη διαμετακίνηση των βιομορίων από το περιβάλλον στο κύτταρο και αντιστρόφως, αλλά και στα κυτταρικά οργανίδια. Με τους μηχανισμούς αυτούς επιτυγχάνεται η διαφορική συγκέντρωση των βιομορίων στα διάφορα κυτταρικά οργανίδια.

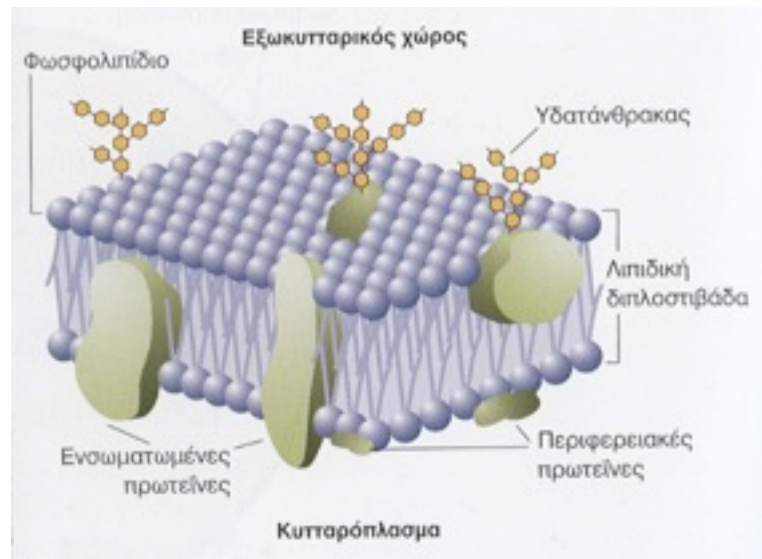
Δέκτες εξωτερικών ερεθισμάτων: η μεμβράνη έχει βασικό ρόλο στη μεταγωγή μηνυμάτων (signal transduction), δηλαδή στην απόκριση του κυττάρου σε ένα εξωτερικό σήμα. Οι μεμβράνες έχουν υποδοχείς (receptors), οι οποίοι δεσμεύουν ειδικά διάφορα μόρια, όπως ορμόνες, παράγοντες αύξησης κ.α. Η αλληλεπίδραση των μορίων αυτών προκαλεί τη δημιουργία ενός νέου μηνύματος στο εσωτερικό του κυττάρου, που είναι υπεύθυνο για κάποια αλλαγή, όπως τη σύνθεση γλυκογόνου, την έκφραση του DNA κ.α.

Διακυτταρική επικοινωνία: η πλασματική μεμβράνη συμβάλλει στη διασύνδεση και στην επικοινωνία ενός κυττάρου με ένα άλλο κύτταρο ενός ιστού με ειδικές διασυνδέσεις. Ακόμη συμβάλλει στην αναγνώριση άλλων κυττάρων, στην προσκόλλησή τους και στην ανταλλαγή υλικών και πληροφοριών.

Θέσεις βιοχημικής δραστηριότητας: στις διάφορες μεμβράνες συσσωρεύονται ένζυμα και μεταβολίτες για εξειδικευμένες αντιδράσεις.

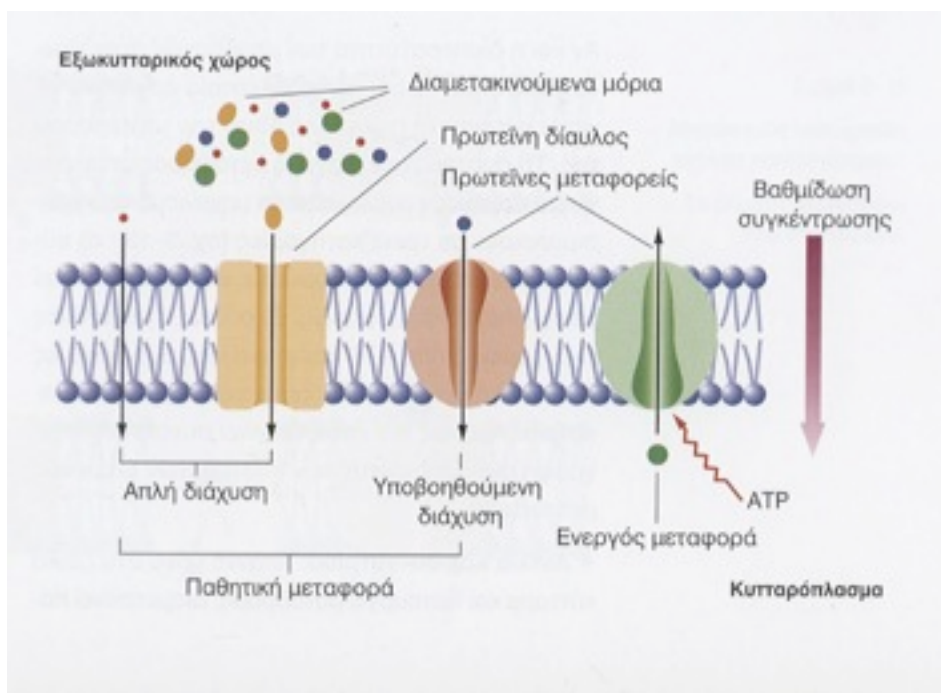
Ταυτόχρονα, αποτελούν συνήθως και τον πρωταρχικό στόχο στην εισβολή βακτηρίων και ιών, στη δράση χημικών και φαρμακευτικών ουσιών, καθώς και στην έκθεση σε φυσικούς παράγοντες του περιβάλλοντος. Συνοπτικά, ο ρόλος τους είναι ιδιαίτερα σημαντικός στις εξής τέσσερις κύριες διεργασίες: 1) Μετατροπή ενέργειας, 2) Μεταφορά ύλης, 3) Αισθητήρια μεταγωγή και μετάδοση σήματος, δηλαδή ανίχνευση των μεταβολών των περιβαλλοντικών συνθηκών και αντίστοιχη επαγωγή της κυτταρικής αντίδρασης σε αυτές και 4) Επεξεργασία πληροφορίας. Στη σύνθεση όλων των κυτταρικών μεμβρανών συμμετέχουν σε διαφορετικό ποσοστό, τα εξής κύρια συστατικά: πρωτεΐνες, (διαμεμβρανικές / επιφανειακές), λιπίδια, υδρογονάνθρακες, γλυκοπρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες, ιόντα και νερό. Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από δύο στρώματα, το στρώμα των φωσfolιπιδίων και το στρώμα των πρωτεϊνικών μορίων που περιτυλίγουν το κύτταρο (σχήμα 1.5). Οι πρωτεΐνες που απαντώνται στο διπλό στρώμα είναι: πρωτεΐνες-υποδοχείς, (receptor proteins) και πρωτεΐνες-προσκόλλησης (adhesion proteins), οι οποίες εξετάζουν την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων και είναι σημαντικές για την συμπεριφορά των κυττάρων και την οργάνωση τους σε ιστούς, πρωτεΐνες αναγνώρισης και πρωτεΐνες-μεταφορείς που ρυθμίζουν τη μετακίνηση του νερού και των διαλυτών μορίων μέσω της μεμβράνης. Πολλές

σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η μεταφορά ηλεκτρονίων, πραγματοποιούνται με ένζυμα συνδεδεμένα με επιφάνειες μεμβρανών. Η κυτταρική μεμβράνη είναι επιλεκτικά διαπερατή και εμπλέκεται στην διαδικασία της όσμωσης και της ενεργούς πρόσληψης ιόντων και μορίων. Οι ουσίες που εισέρχονται στο κύτταρο είναι συγκεκριμένες και αυτό επιτρέπει στα κύτταρα να ελέγχουν την εσωτερική τους σύνθεση (Bedioui 1999).



Σχήμα 1.5 Σχηματική απεικόνιση μεμβράνης σύμφωνα με το μοντέλο ρευστού μωσαϊκού
(Μαρμάρας, Λαμπροπούλου-Μαρμάρα 2005)

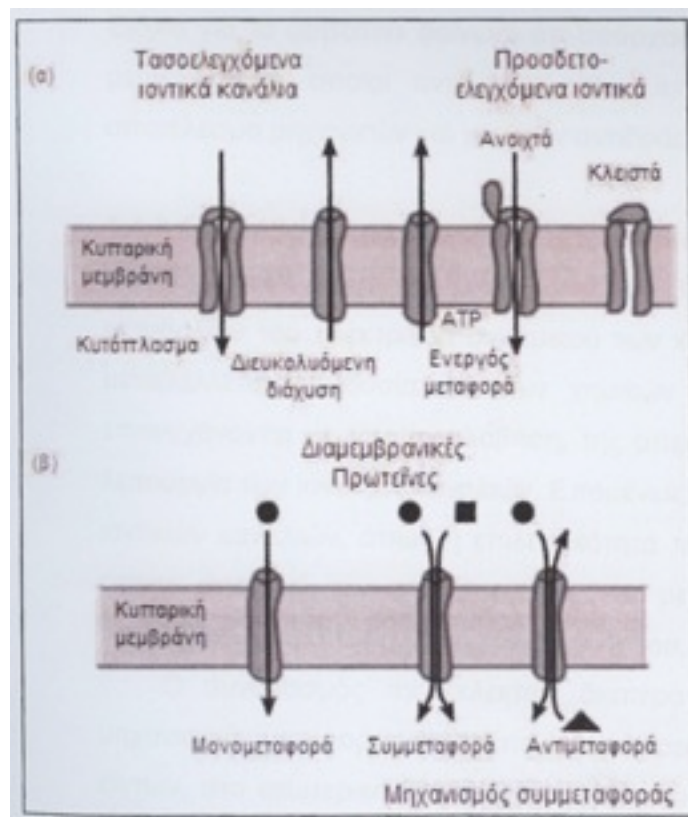
Στο κύτταρο η μεταφορά συστατικών μέσω της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις τρόπους, με απλή διάχυση, με παθητική μεταφορά και με ενεργό μεταφορά (Σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6 Συστήματα μεταφοράς μορίων διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης
(Μαρμάρας, Λαμπροπούλου-Μαρμάρα 2005)

Γενικά, υπάρχουν τρεις τύποι μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς, οι οποίες δημιουργούν σύμπλοκο με το ιόν ή μόριο το οποίο περνά μέσα από την μεμβράνη (Assmann et al. 1996): οι πρωτεΐνες - μεταφορείς για την μεταγωγή σημάτων (carriers), οι αντλίες ιόντων (ion pumps) και οι δίαυλοι - κανάλια ιόντων (ion channels) (Σχήμα 1.7). Η ταχύτητα μεταφοράς μορίων για τις αντλίες ιόντων είναι χαμηλή, (<500 μόρια/sec), για τους φορείς είναι μέση, (500-10000 μόρια/sec) και για τις διόδους ιόντων είναι ταχύτατη, (10000-πολλά εκατομ. μόρια/sec). Οι κατηγορίες αυτές διαφέρουν ως προς την μορφή της ενέργειας που χρησιμοποιούν. Οι αντλίες ιόντων χρησιμοποιούν χημική, από την υδρόλυση του ATP ή φωτεινή ενέργεια, ενώ οι μεταφορείς και οι δίαυλοι ιόντων βασίζονται κυρίως σε ηλεκτροχημικές διαβαθμίσεις ιόντων. Στην παθητική μεταφορά, (διευκολυνόμενη διάχυση), εμπλέκονται πρωτεϊνικοί μεταφορείς, και κανάλια ιόντων και η μεταφορά των συγκεκριμένων ιόντων γίνεται ενάντια στην κλίση του ηλεκτρικού δυναμικού. Στην ενεργό μεταφορά εμπλέκονται πρωτεϊνικοί μεταφορείς και αντλίες ιόντων και τα ιόντα κινούνται αντίθετα προς την ηλεκτροχημική βαθμίδα. Η ενεργός μεταφορά κινεί τα μόρια ενάντια στο δυναμικό συγκέντρωσης και χρειάζεται ενέργεια υπό μορφή ATP η οποία προσφέρεται από τις ειδικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, για την κίνηση των ιόντων προς εξισορρόπηση της συγκέντρωσης τους μέσα και έξω από το κύτταρο. Στην παθητική μεταφορά τα μόρια

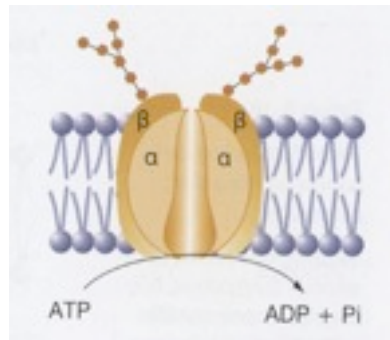
κινούνται χρησιμοποιώντας το δυναμικό συγκέντρωσης, δεν απαιτείται ενέργεια και διαμεσολαβούν οι πρωτεΐνες καναλιών ιόντων.



Σχήμα 1.7 Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς. α) Κανάλια ιόντων και αντλίες ιόντων, β) Πρωτεΐνες μεταφορείς (Borkholder 1998)

Η αντλία νατρίου-καλίου, (σχήμα 1.8), η οποία αποτελεί το πιο κλασσικό παράδειγμα πρωτεΐνης-φορέα ενεργού μεταφοράς, κινεί ενεργά το Na^+ έξω από το κύτταρο ενάντια στο απότομο ηλεκτροχημικό του δυναμικό και κινεί το K^+ μέσα σε αυτό. Η αντλία αυτή αποτελείται κατά βάση από μια ATP-άση, η οποία είναι ειδικό ένζυμο αποφωσφορυλίωσης του ATP. Οι ATP-άσες τροφοδοτούν το κύτταρο με ιόντα και 'ενεργοποιούν' την κυτταρική μεμβράνη δημιουργώντας ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό, κάτι που εξασφαλίζει την λειτουργία των μεταφορέων και των ιοντικών καναλιών. Σχεδόν το ένα τρίτο της ενέργειας που χρειάζεται ένα απλό ζωικό κύτταρο καταναλώνεται στην τροφοδότηση αυτής της αντλίας, ενώ αγγίζει τα δύο τρίτα στις περιπτώσεις των νευρικών κυττάρων. Επειδή η αντλία υδρολύει το ATP (Na^+ έξω και K^+ μέσα), είναι επίσης γνωστή και ως $\text{ATPase Na}^+-\text{K}^+$. Οι αντλίες ιόντων μπορούν να συνδεθούν με μια πηγή ενέργειας, όπως στην περίπτωση της αντλίας Na^+-K^+ , για να καταλύσουν την ενεργό μεταφορά. Οι αντλίες ιόντων, οι οποίες συμμετέχουν στην

ενεργό μεταφορά, χρησιμοποιούν ενέργεια, μεταβολική ή ηλεκτροχημική, για να κινήσουν τις διαλυτές ουσίες ακόμα κι ενάντια στο ηλεκτροχημικό τους δυναμικό. Εάν αυτή η αντλία σταματήσει να λειτουργεί ή εάν παρεμποδιστεί η λειτουργία της, τότε συσσωρεύεται Na^+ μέσα στο κύτταρο ενώ η συγκέντρωση του K^+ μέσα στο κύτταρο μειώνεται.



Σχήμα 1.8 Μοντέλο της αντλίας νατρίου-καλίου
(Μαρμάρας, Λαμπροπούλου-Μαρμάρα 2005)

Οι διάφοροι μεμβρανικοί πρωτεϊνικοί φορείς αντιδρούν σε εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα, απευθείας ή με την μεσολάβηση κάποιου υποδοχέα. Μετά την επίδραση κάποιου σήματος σε έναν υποδοχέα ή σε ένα φορέα, μπορεί να δημιουργηθεί από αυτόν ένα δευτερεύων σήμα, δηλαδή μια χημική ουσία ή αντίδραση, η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί ή καταλύει αντιδράσεις μέσα στο κύτταρο. Δυο πολύ σημαντικά είδη δευτερευόντων σημάτων είναι οι μεταβολές στο pH και στην συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου. Ειδικά για το ασβέστιο φαίνεται ότι υπάρχουν εξειδικευμένοι δίαυλοι - δίοδοι στην κυτταρική μεμβράνη, οι οποίοι αντιδρούν στην μεταβολή της συγκέντρωσης του ασβεστίου ως αποτέλεσμα μηχανικών και χημικών αντιδράσεων στην κυτταρική μεμβράνη.

Η αντλία ασβεστίου απαντά στην πλασματική μεμβράνη και στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (Ε.Δ.). Χρησιμεύει για τη διακίνηση ιόντων ασβεστίου στον εξωκυτταρικό χώρο ή στον αυλό του Ε.Δ. Όπως και η αντλία νατρίου-καλίου, η αντλία Ca^{2+} είναι μια ATP-άση, η οποία φωσφορυλιώνεται και απόφωσφορυλιώνεται κατά τη διαμετακίνηση των ιόντων. Είναι γνωστό ότι τα Ca^{2+} παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μυϊκής συστολής. Όταν ένα κύτταρο διεγείρεται από ένα νευρικό παλμό, ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα ασβέστιο, προκαλώντας τη μυϊκή συστολή. Καθώς το κύτταρο επανέρχεται στην κατάσταση ηρεμίας, τα ιόντα Ca^{2+} επιστρέφουν

γρήγορα στο σαρκοπλασματικό δίκτυο με τη βοήθεια της αντλίας ασβεστίου. Η έξοδος των ιόντων Ca^{2+} είναι υποχρεωτικά συζευγμένη με την είσοδο ιόντων Na^+ και στην περίπτωση αυτή η κατευθυντήρια δύναμη του συστήματος οφείλεται στην είσοδο των ιόντων Na^+ , τα οποία διατηρούν τη βαθμίδωση συγκέντρωσης με το σύστημα $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ΑΤΡάσης.

1.4.5.1 Μετάδοση σημάτων στους κυτταρικούς βιοαισθητήρες - Ιοντικά Κανάλια

Η βασική αρχή για έναν κυτταρικό βιοαισθητήρα που βασίζεται σε μετρήσεις των μεταβολών του ηλεκτρικού δυναμικού των κυττάρων είναι ότι το δυναμικό αυτό μπορεί να μεταβάλλεται παρουσία κάποιων χημικών συστατικών. Στην ουσία αυτές οι μεταβολές επιτυγχάνονται με την μεσολάβηση, της απευθείας ή όχι, μεταβολής που δημιουργείται στην λειτουργία των ιοντικών καναλιών. Επομένως, είναι απαραίτητη η μελέτη των μηχανισμών των ιοντικών καναλιών, όπως η επιλεκτικότητά τους και η παρεμπόδιση της λειτουργίας τους, η οποία αποτελεί τον πιο άμεσο τρόπο μεταβολής του μεμβρανικού δυναμικού, καθώς υπάρχουν και τρόποι έμμεσης μεταβολής του, μέσω περίπλοκων κυτταρικών μονοπατιών. Ο συνδυασμός της εκλεκτικά διαπερατής κυτταρικής μεμβράνης και των σύνθετων μηχανισμών μεταφοράς, επιτρέπει στο κύτταρο να διατηρεί πολύ διαφορετικές συγκεντρώσεις ιόντων, στο εσωτερικό και στο εξωτερικό του, οι οποίες οδηγούν σε μια διαφορά δυναμικού μέσα και έξω από την κυτταρική μεμβράνη. Μια ισορροπία δυναμικού (resting potential) επιτυγχάνεται με την ισορροπία των χημικών και ηλεκτρικών δυνάμεων επί των ιόντων. Στην κατάσταση αυτή δεν παρατηρείται ροή ιόντων και το διαμεμβρανικό δυναμικό παραμένει σταθερό. Η κατανομή των ιόντων εντός και εκτός του κυττάρου καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά διαπερατότητας της λιπιδιακής διπλοστιβάδας και από την δραστηριότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς.

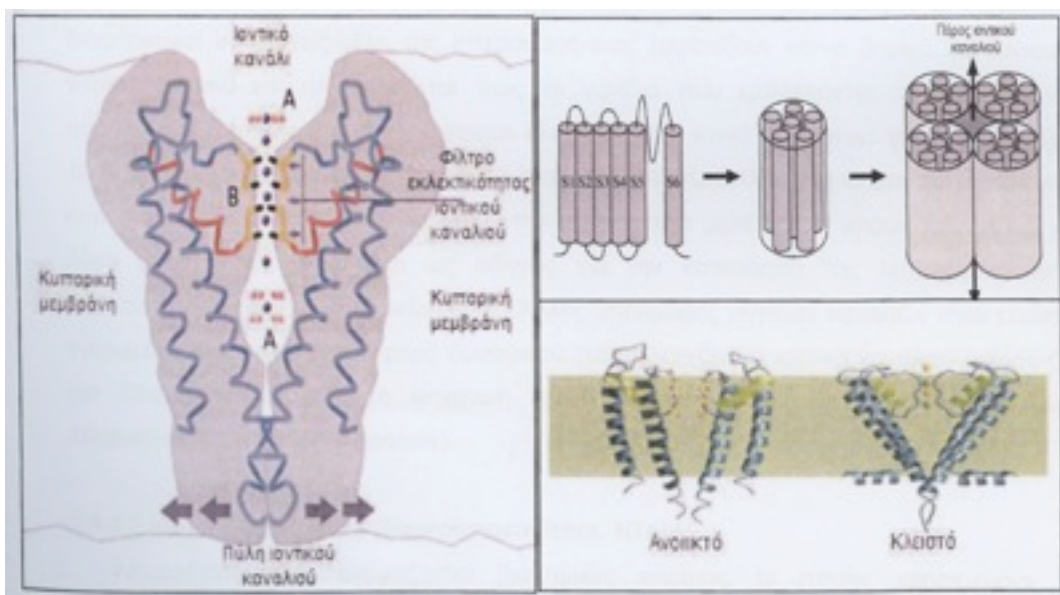
Η κίνηση των ιόντων μέσα και έξω από το κύτταρο, αποτελεί την βάση για την ηλεκτρική δραστηριότητα των κυττάρων και η αναγκαιότητα διακίνησης τους εξυπηρετείται από την ύπαρξη των ιοντικών καναλιών, των οποίων ο ρόλος έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς το διπλό στρώμα της κυτταρικής μεμβράνης δεν είναι περατό για τα ιόντα. Η λειτουργία των ιοντικών καναλιών είναι να επιτρέπει σε συγκεκριμένα ανόργανα ιόντα, πρωτίστως Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ή Cl^- , να περάσουν γρήγορα κάτω από τα ηλεκτροχημικά τους δυναμικά τους, πέρα από το διπλό λιπιδιακό

στρώμα. Αυτή η δυνατότητα να ελέγχονται οι ιοντικές ροές μέσω αυτών των καναλιών είναι ουσιαστική για πολλές λειτουργίες των κυττάρων. Τα γενικά δομικά χαρακτηριστικά των ιοντικών καναλιών, η θέση τους στο κύτταρο και ο σημαντικός λειτουργικός τους ρόλος τα καθιστούν στόχους για την ανάπτυξη φαρμακευτικών ουσιών.

Τα ιοντικά κανάλια, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες-μεταφορείς, διαμορφώνουν υδρόφιλους πόρους που εκτείνονται διαμεμβρανικά, οι οποίοι μόλις ανοίξουν, επιτρέπουν στις διαλυτές ουσίες να περάσουν μέσα από αυτούς. Η κατευθυντήρια δύναμη για τη μεταφορά αυτή παρέχεται από το ηλεκτροχημικό δυναμικό της διαλυτής ουσίας μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού του κυττάρου. Τα περισσότερα ιοντικά κανάλια έχουν στενούς πόρους και που μπορούν να ανοίγουν και να κλείνουν. Το πιο στενό σημείο αυτών των ιδιαίτερα εκλεκτικών πόρων, αποτελεί το φίλτρο εκλεκτικότητας τους, του οποίου το μέγεθος και η μοριακή σύνθεση είναι υπεύθυνα για τον καθορισμό των ιόντων που θα διαπεράσουν το ιοντικό κανάλι. Δύο σημαντικές ιδιότητες διαχωρίζουν τα ιοντικά κανάλια από τους απλούς υδάτινους πόρους. Κατά πρώτον, εμφανίζουν ιοντική επιλεκτικότητα, επιτρέποντας έτσι σε κάποια ανόργανα ιόντα να περάσουν και σε κάποια άλλα όχι. Αυτό δείχνει πως οι πόροι τους πρέπει να είναι αρκετά στενοί σε συγκεκριμένα σημεία ώστε να εξαναγκάζουν τα ιόντα να έρθουν σε επαφή με τα τοιχώματά τους και τελικά μόνο ιόντα συγκεκριμένου μεγέθους και φορτίου να είναι σε θέση να τα διαπεράσουν. Η υψηλή τους εκλεκτικότητα δεν βασίζεται μόνο στο μέγεθος των ιόντων, αλλά και σε μια σειρά περίπλοκων μοριακών αλληλεπιδράσεων. Κατά δεύτερον, τα ιοντικά κανάλια δεν παραμένουν συνέχεια ανοιχτά. Αντί αυτού, δρουν σαν πύλες οι οποίες ανοίγουν για λίγο και ύστερα κλείνουν ξανά. Τα κανάλια ιόντων εμφανίζουν τρεις λειτουργικές καταστάσεις: α) βρίσκονται εν ηρεμία, δηλαδή είναι κλειστά και ικανά να ενεργοποιηθούν, β) είναι ενεργά, ανοιχτά και γ) βρίσκονται σε κατάσταση ανερεθιστότητας, δηλαδή είναι κλειστά και ανίκανα να ενεργοποιηθούν. Τις περισσότερες φορές η πύλη ανοίγει αντιδρώντας σε κάποιο συγκεκριμένο ερέθισμα. (Stein 1990).

Για την κατανόηση των ιδιοτήτων των ιοντικών καναλιών είναι απαραίτητη η γνώση της γενικής δομής τους (Σχήμα 1.9). Η κοινή δομή τους περιλαμβάνει έναν κεντρικό υδατοπληρούμενο πόρο διαμέσου του οποίου διακινούνται τα ιόντα. Ο πόρος σχηματίζεται συνήθως από τέσσερις έως πέντε υψηλής ομολογίας διαμεμβρανικές δομές α-έλικας, οι οποίες μπορεί να ανήκουν και σε διαφορετικές

υπομονάδες. Η κάθε περιοχή από αυτές, αποτελείται από έξι διαμεμβρανικά χάσματα (S1- S6) και σε κάθε περιοχή υπάρχει μια θηλιά μεταξύ των τμημάτων πέντε και έξι. Πιστεύεται ότι το φίλτρο εκλεκτικότητας του ιοντικού καναλιού αποτελείται από τέσσερα αμινοξέα. Στα κανάλια ασβεστίου αυτό αποτελείται από τέσσερις γλουταμινικές περιοχές, ενώ στα κανάλια νατρίου υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές αμινοξικές περιοχές, ασπαρτικού οξέος, γλυκίνης, λυσίνης και αλανίνης. Η αντικατάσταση των τεσσάρων αυτών αμινοξέων με γλουταμινικά, θα καταστήσει τα κανάλια νατρίου εκλεκτικά στο ασβέστιο. Τα τασοελεγχόμενα ιοντικά κανάλια για να λειτουργήσουν, απαιτούν την ύπαρξη μιας περιοχής ανίχνευσης του δυναμικού. Στα ιοντικά κανάλια νατρίου και ασβεστίου αυτή η περιοχή απαντάται στο διαμεμβρανικό χάσμα S4, το οποίο κινείται ανταποκρινόμενο σε κάποιο ανάλογο σήμα και προκαλεί έτσι κάποια διαφορά δυναμικού.



Σχήμα 1.6 Δομή ιοντικών καναλιών και απεικόνιση κλειστών και ανοιχτών ιοντικών καναλιών

(Gilchrist 2003)

Γενικά η λειτουργία των ιοντικών καναλιών μπορεί να ρυθμιστεί με άμεσο τρόπο από συστατικά τα οποία συνδέονται απευθείας με αυτά και στην περίπτωση αυτή τα ιοντικά κανάλια λειτουργούν ως υποδοχείς και για το βιοχημικό συστατικό και για τον λειτουργικό στόχο. Υπάρχει όμως μεγάλο εύρος συστατικών, τα οποία τροποποιούν την λειτουργία των ιοντικών καναλιών με έμμεσο τρόπο, ενεργοποιώντας μια σειρά περίπλοκων βιοχημικών μονοπατιών. Το μονοπάτι μετάδοσης σημάτων περιγράφει μια σειρά ενδιάμεσων αντιδράσεων, μεταξύ της πρόσδεσης κάποιας

τοξικής ουσίας στον υποδοχέα και της τελικής φυσιολογικής επίδρασης. Αυτά τα μονοπάτια συνήθως εμπεριέχουν την χρήση κάποιων δευτερευόντων διαβιβαστών, μορίων δηλαδή τα οποία μπορούν να διαχυθούν διαμέσου του κυττάρου και να μεταφέρουν πληροφορίες από τον υποδοχέα σε ποικίλους άλλους στόχους. Επειδή τα μονοπάτια αυτά είναι αρκετά περίπλοκα, οι κυτταρικές αποκρίσεις σε διάφορα συστατικά είναι πολύ δύσκολο να προβλεφθούν και γι' αυτό το λόγο η απευθείας μελέτη τους με την χρήση κυττάρων αποτελεί ένα δυναμικό εργαλείο. Τα ιοντικά κανάλια χωρίζονται σε ομάδες, ανάλογα με τον τρόπο ενεργοποίησής τους. Μια υποομάδα των ιοντικών καναλιών είναι εκείνα τα οποία μεταφέρουν ιόντα με την επίδραση χημικών μορίων-νευροδιαβιβαστών (προσδετο-ελεγχόμενα ιοντικά κανάλια-Ligand-Gated Ion Channels-LGICs). Το ειδικό αυτό μόριο πρόσδεσης μπορεί να είναι είτε ένας εξωκυττάριος μεσολαβητής, όπως για παράδειγμα ένας νευροδιαβιβαστής (transmitter gated channel) ή ένας ενδοκυτταρικός μεσολαβητής, όπως ένα ιόν (ion-gated channel) ή ένα νουκλεοτίδιο (nucleotide gated channel). Κοινό δομικό χαρακτηριστικό τους αποτελεί η ύπαρξη θέσεων ικανών να δεσμεύουν σηματοδοτικά χημικά μόρια. Στην παραπάνω υπεροικογένεια ανήκουν οι υποδοχείς της 5-υδρόξυτρυπταμίνης (5-HT) ή σεροτονίνης, της γλυκίνης (Gly), του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (Gamma-aminobutyric acid, GABA) και οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (ACh), οι οποίοι αναλύονται παρακάτω. Οι διαφορετικοί υποδοχείς-μέλη της υπεροικογένειας εμφανίζουν κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά και υποστηρίζεται πως τα γονίδια που εμπλέκονται στην κωδικοποίηση ομόλογων περιοχών τους, προέρχονται όλα τους από κοινό προγονικό γονίδιο. Μεταξύ των ιοντικών καναλιών που ενεργοποιούνται από χημικούς προσδέτες, οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, (nAChRs), αποτελούν την εκτενέστερα μελετημένη υποοικογένεια και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ως οδηγός για την κατανόηση της λειτουργίας και των υπόλοιπων μελών της υπεροικογένειας. Άλλες υποομάδες ιοντικών καναλιών είναι εκείνα που ενεργοποιούνται από τη διαφορά δυναμικού (τασσελεγχόμενα ιοντικά κανάλια-Voltage-Gated Ion Channels) και από τη μηχανική πίεση (μηχανο-ενεργοποιούμενα ιοντικά κανάλια-Mechanically-Gated Ion Channels).

1.4.5.2 Νευροδιαβιβαστές (Neurotransmitters, NTs)

Νευροδιαβιβαστές ονομάζονται βιοχημικές ενώσεις, οι οποίες χρησιμεύουν στην μεταβίβαση πληροφοριών από ένα νευρώνα στον επόμενο. Στα νευρικό σύστημα

υπάρχουν δεκάδες διαφορετικοί νευροδιαβιβαστές (NTs, neurotransmitters), οι οποίοι δύνανται να έχουν διεγερτική ή ανασταλτική δράση. Κάθε νευρικό κύτταρο συνθέτει και απελευθερώνει ένα συγκεκριμένο νευροδιαβιβαστή. Οι κυριότεροι νευροδιαβιβαστές είναι η ακετυλοχολίνη, η ντοπαμίνη, η νορεπινεφρίνη, η σεροτονίνη, οι οποίοι ανήκουν στην ομάδα των βιολογικών αμινών και τα αμινοξέα γ-αμινοβουτυρικό οξύ και γλυκίνη. (Beadle 1999). Η ηλεκτρική διέγερση που φτάνει στο νευράξονα οδηγεί στην απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή από τον προσυναπτικό νευρώνα στο συναπτικό κενό, όπου μπορεί να δράσει στους ανάλογους υποδοχείς που βρίσκονται στο μετασυναπτικό νευρώνα. Με αυτόν τον τρόπο η ηλεκτρική ώση μετατρέπεται σε χημική. Η αντίδραση του μετασυναπτικού κυττάρου στο νευροδιαβιβαστή εξαρτάται από τους υποδοχείς που υπάρχουν στη μεμβράνη του. Οι νευροδιαβιβαστές παράγονται από τους ίδιους τους νευρώνες με τη βοήθεια ενζύμων και συγκεντρώνονται σε συναπτικά κυστίδια, από τα οποία απελευθερώνονται μέσω εξωκυττάρωσης.

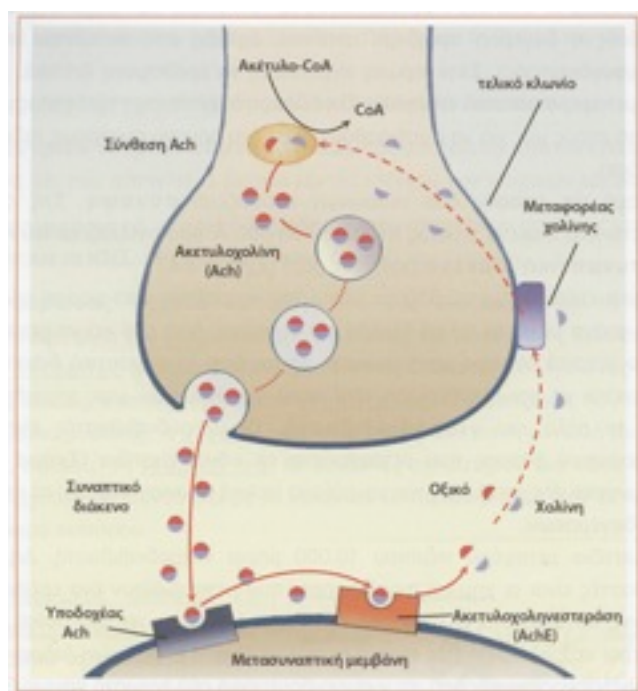
Μια κατηγορία νευροδιαβιβαστών είναι το αμινοξύ γ-αμινοβουτυρικό οξύ, (Gamma-aminobutyric acid, GABA). Αποτελεί τον βασικότερο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή του κεντρικού νευρικού συστήματος των θηλαστικών. Προσδένεται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς των προσυναπτικών και των μετασυναπτικών κυττάρων και προκαλεί αρνητική μεταβολή του διαμεμβρανικού δυναμικού (υπερπόλωση), επιτρέποντας είτε την είσοδο αρνητικά φορτισμένων ιόντων χλωρίου στο κύτταρο είτε την έξοδο θετικά φορτισμένων ιόντων καλίου. Οι αβερμεκτίνες αποτελούν ανταγωνιστές των GABA νευροδιαβιβαστών.

1.4.5.3 Ακετυλοχολίνη και ακετυλοχολινεστεράση

Η ακετυλοχολίνη, (Acetylcholine-ACh), το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση, (εστεράση της χολίνης-Acetylcholinesterase, AChE), είναι γνωστό ως ο κύριος μεταβιβαστής των ερεθισμάτων κατά μήκος των συνάψεων μεταξύ γειτονικών άκρων νευρών και κατά μήκος των νευρομυϊκών συνδέσμων συγκεκριμένων νευρώνων του αυτόνομου νευρικού συστήματος, όπως επίσης και πολλών νευρώνων του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η ακετυλοχολίνη συντίθεται στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων, με την καταλυτική δράση του ενζύμου ακετυλο-τρανσφεράση της χολίνης, (Choline Acetyl Transferase, Chat), από τη χολίνη και το ακετυλοσυνένζυμο Α,

(ακετυλ-CoA), το οποίο χρησιμεύει ως δότης της ακετυλικής ομάδας. Από τις δύο αυτές ουσίες, το ακετυλ-CoA συντίθεται στα μιτοχόνδρια, που αφθονούν στις νευρικές απολήξεις, ενώ η χολίνη προσλαμβάνεται στη νευρική απόληξη από τον εξωκυτταρικό χώρο με τη μεσολάβηση μιας νατριοεξααρτώμενης πρωτεΐνης-μεταφορέα (Corbett et al. 1984).

Μετά τη σύνθεση της, μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα σε ειδικά κυστίδια, τα λεγόμενα συναπτικά κυστίδια, (10^3 - 10^4 μόρια/κυστίδια) όπου και εναποθηκεύεται και από όπου εκκρίνεται στην συναπτική σχισμή. Κατά την αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και την ανάπτυξη του δυναμικού δράσης, ελευθερώνονται ιόντα Ca^{2+} , που αντιδρούν με μια πρωτεΐνη της μεμβράνης των αποθηκευτικών κυστιδίων, τη συναπτοταγμίνη, αποσταθεροποιώντας την και απελευθερώνοντας έτσι την ACh από την προσυναπτική μεμβράνη με τον μηχανισμό της εξωκύττωσης. Μετά την απελευθέρωση της, η ACh διανύει τη συναπτική σχισμή και διεγείρει τους υποδοχείς της στη μετασυναπτική μεμβράνη. Εν συνεχεία, διασπάται με υδρόλυση, στο συναπτικό χάσμα, καταλυόμενη από το ένζυμο AChE, προς χολίνη και οξικό οξύ, τα οποία είναι αδρανή προϊόντα, (Σχήμα 1.10). Τα προϊόντα υδρόλυσης της ACh, προσλαμβάνονται με ενεργητική μεταφορά από το προσυναπτικό κύτταρο για την εκ νέου σύνθεση της. Παρεμπόδιση της ακετυλοχολινεστεράσης, σημαίνει ότι η ακετυλοχολίνη παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, δηλαδή συσσωρεύεται στα άκρα των νευρών, οι λειτουργίες των οποίων διαταράσσονται και η βλάβη αυτή μπορεί να προκαλέσει τον θάνατο. Συνήθως στα ασπώνδυλα η διαταραχή αυτή προκαλεί παράλυση του αναπνευστικού συστήματος.



Σχήμα 1.10 Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της ακετυλοχολίνης σε μία χολινεργική σύναψη
(Ζιώγας, Μαρκόγλου 2007)

Η ακετυλοχολινεστεράση, είναι ένα ένζυμο απαραίτητο για την ορθή μετάδοση των μηνυμάτων στο νευρικό σύστημα, καθώς η παρεμπόδιση της λειτουργίας της σε κάποιο οργανισμό, μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο του. Ρόλος του ενζύμου, είναι η απομάκρυνση του νευροδιαβιβαστή ACh από τον υποδοχέα του προσυναπτικού κυττάρου και η επακόλουθη υδρόλυση του. Είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση της συγκέντρωσης της ακετυλοχολίνης, κατά την διάρκεια της νευροδιαβίβασης. Το ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης αποτελείται από δυο υπομονάδες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την διάσπαση της ακετυλοχολίνης. Το ανιονικό τμήμα είναι υπεύθυνο για την δέσμευση του νευροδιαβιβαστή στο ένζυμο. Μόλις πραγματοποιηθεί η δέσμευση αυτή, η ακετυλοχολινεστεράση υδρολύει την ακετυλοχολίνη, διαδικασία που πραγματοποιείται στην δεύτερη υπομονάδα του ενεργού κέντρου του ενζύμου, με την ακετυλίωση της σερίνης και την απελευθέρωση χολίνης. Το μεγαλύτερο μέρος της χολίνης που προέρχεται από την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, δεσμεύεται εκ νέου από τον μεταφορέα της χολίνης, προς την προσυναπτική απώληση. Έτσι το ένζυμο μπορεί να δεσμεύσει και να υδρολύσει τα επόμενα μόρια της ακετυλοχολίνης.

1.4.5.4 Υποδοχέας της ακετυλοχολίνης

Οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (Acetylcholine-Receptors/AChRs), οι οποίοι ονομάζονται χολινεργικοί υποδοχείς, είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αποκρινόμενες στη δέσμευση της ACh, η οποία συντίθεται, αποθηκεύεται και εκκρίνεται από τους χολινεργικούς νευρώνες. Οι AChRs, όπως άλλωστε και άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, ταξινομούνται με κριτήρια όπως η χημική συγγένεια που εμφανίζουν για σηματοδοτικά μόρια και οι φαρμακολογικές τους ιδιότητες, σε υποομάδες και πιο συγκεκριμένα:

α) στην ομάδα των νικοτινικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης (nAChRs), μόρια με υψηλή ευαισθησία απόκρισης στη νικοτίνη, τα οποία απαντώνται στις νευρομυϊκές συνάψεις και

β) στην ομάδα των μουςκαρινικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης (mAChRs), μόρια με αυξημένη ευαισθησία απόκρισης στη μουςκαρίνη. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούν μέλη της υπεροικογένειας μεμβρανικών πρωτεϊνών που συνδέονται με G-πρωτεΐνες.

1.4.6 Βελτίωση κυτταρικών βιοαισθητήρων

Αναμφίβολα, η αποτελεσματικότητα ενός κυτταρικού βιοαισθητήρα αυξάνεται με την εξειδίκευση και την ευαισθησία του κυτταρικού υλικού ανίχνευσης. Ωστόσο, η ευρείας κλίμακας ευαισθησία που χαρακτηρίζει τα κύτταρα στα βιολογικά ενεργά στοιχεία και η ευαισθησία τους στις μεταβολές του φυσικοχημικού περιβάλλοντος, προκαλεί προβλήματα στην απαιτούμενη από το σύστημα εξειδίκευση και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Ενα ζωντανό κύτταρο είναι ένα σύνολο εκατοντάδων βιοχημικών μονοπατιών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Η οποιαδήποτε μεταβολή στο ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό δυναμικό, θα μπορούσε να επηρεάσει την φυσιολογία του κυττάρου, καθώς το κύτταρο αντιδρά ταυτόχρονα σε όλα αυτά τα σήματα. Επιπλέον παρατηρείται ευαισθησία των κυττάρων σε εξωτερικούς φυσικοχημικούς παράγοντες, όπως είναι τα θρεπτικά στοιχεία, το pH και η θερμοκρασία (DeBusschere 2002). Συνεπώς η απόκριση-στόχος επηρεάζεται συγχρόνως από το ερέθισμα-στόχο και από άλλα μη ειδικά ερεθίσματα. Σε αντίθεση με άλλους βιοαισθητήρες, οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες δεν εμφανίζουν εξειδίκευση προς κάποιες συγκεκριμένες ουσίες, αλλά παρουσιάζουν εξειδίκευση προς ένα ευρύ φάσμα βιολογικά ενεργών ουσιών. Επομένως είναι αναγκαίο να γίνουν κάποιες προσπάθειες

βελτίωσης της ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας τους ως προς μια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία. Παρακάτω παρατίθενται ορισμένες μέθοδοι επίτευξης αυτού του στόχου:

- Χρησιμοποιώντας κύτταρα που εμφανίζουν εξειδικευμένη απόκριση με φυσικό τρόπο. Αυτή η προσέγγιση, όμως, βασίζεται στην διαθεσιμότητα τέτοιων κυτταρικών συστημάτων.
- Επιλέγοντας κύτταρα (συνήθως *in vitro*), που χαρακτηρίζονται από αποκρίσεις βελτιωμένης εκλεκτικότητας και ευαισθησίας ως προς κάποια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία. Ωστόσο, οι κυτταρικές αυτές καλλιέργειες τείνουν να παραλλάσσονται σημαντικά ύστερα από επαναλαμβανόμενες υποκαλλιέργειες, χάνοντας έτσι με το χρόνο ένα τμήμα της εξειδίκευσής τους.
- Παρεμποδίζοντας ορισμένα ανεπιθύμητα μεταβολικά μονοπάτια ή συστήματα μεταφοράς.
- Χρησιμοποιώντας περισσότερους από ένα μεταβολικούς τύπους κυττάρων.
- Μετασχηματίζοντας τα κύτταρα, έτσι ώστε να εκφράζεται ένας υποδοχέας στην επιφάνειά τους, εξειδικευμένο ως προς την αναλυτέα ουσία ή να εκφράζεται κάποιο συστατικό του μεταβολισμού, εξειδικευμένο ως προς την επιθυμητή αναλυτέα ουσία. Οι εξελίξεις που σημειώνονται στον τομέα της γενετικής μηχανικής, θα επιτρέψουν τον σχεδιασμό κυτταρικών βιοαισθητήρων υψηλής εξειδίκευσης και επιλεκτικότητας, υπό ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες.
- Τέλος, μια προσέγγιση που θα μπορούσε να μειώσει την επίδραση του περιβαλλοντικού αυτού "θορύβου", είναι η χρήση ενός ελεγχόμενου κυτταρικού πληθυσμού, ο οποίος θα είναι εκτεθειμένος στις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες με τα κύτταρα εκείνα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο, με τη διαφορά ότι θα απουσιάζει η έκθεση τους σε κάποιο δείγμα. Η χρήση ταυτόχρονων διαφορετικών μετρήσεων κυτταρικών σημάτων, μπορεί να επιτρέψει την εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών για τα κυτταρικά σήματα παρουσία περιβαλλοντικών μεταβολών. Κάθε περιβαλλοντική αλλαγή θα έχει ως αποτέλεσμα μια απόκριση κοινότυπου χαρακτήρα η οποία θα μπορεί να απορριφθεί, αφού τα επιθυμητά σήματα θα προκαλέσουν μια διαφορετική απόκριση. Παρόλα αυτά υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί στην συγκεκριμένη προσέγγιση, καθώς τα κύτταρα δεν παρουσιάζουν τέλεια ομοιομορφία και μπορεί να αντιδράσουν με διαφορετικό τρόπο στο ίδιο περιβαλλοντικό ερέθισμα.

1.4.7 Ανίχνευση τοξικών ουσιών με τη χρήση κυτταρικών βιοαισθητήρων

Μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις που έχει να αντιμετωπίσει η τεχνολογία των βιοαναλυτικών συστημάτων, είναι η επιτυχής ανίχνευση και ο προσδιορισμός πολυάριθμων τοξικών ουσιών, σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, με μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία και σε σύντομο χρονικό διάστημα. Αρκετές προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ανταποκρίνονται σε ένα ευρύ φάσμα χημικών και βιολογικών τοξικών ουσιών, σε σχετικές συγκεντρώσεις και σε πραγματικό χρόνο. Η χρήση ζωντανών κυττάρων ως συστατικά ανίχνευσης σε τέτοια συστήματα, αποτελεί μια προσέγγιση η οποία έχει αρχίσει να αναπτύσσεται σημαντικά την τελευταία δεκαετία. Σε αυτό τον τύπο βιοαισθητήρων, υπολογίζεται η βιολογική κυτταρική αντίδραση, από την έκθεση των κυττάρων σε κάποια τοξική ουσία. Η προσέγγιση αυτή προβάλλει σημαντικά πλεονεκτήματα των κυτταρικών βιοαισθητήρων έναντι άλλων συστημάτων ανίχνευσης, όπως αναλυτικών χημικών μεθόδων, μοριακών αισθητήρων και ανοσοαισθητήρων, καθώς οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες έχουν την δυνατότητα αντίδρασης με πολλά, βιολογικά ενεργά, συστατικά. Η επίδραση των φαρμακευτικών και τοξικών ουσιών στην χημειοτακτική απόκριση και στην ηλεκτροφυσιολογία των κυττάρων, μπορεί να μελετηθεί και να μετρηθεί με την χρήση των κυτταρικών βιοαισθητήρων. Ιδιαίτερα με την χρήση νευρικών κυττάρων, δύναται να πραγματοποιηθούν αναλύσεις και ανίχνευση νευροτοξικών ουσιών, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, που δρουν ως ανταγωνιστές ή παρεμποδιστές ιοντικών καναλιών, με την μελέτη των εξωκυτταρικών δυναμικών των κυττάρων (Zieziulewicz et al. 2003). Τέτοια δράση παρουσιάζουν οι φυτοπροστατευτικές ουσίες, όπως τα οργανοφωσφορικά, τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα, κ.α., τα οποία αποτελούν απειλή για την υγεία του ανθρώπου και η αποτελεσματική ανίχνευση των οποίων είναι, αδιαμφισβήτητη, επιτακτική ανάγκη.

Με τη μέθοδο της βιοηλεκτρικής αναγνώρισης (BERA), που εφαρμόστηκε και στην παρούσα εργασία, έγινε δυνατή η ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε δείγματα γεωργικών προϊόντων. Πιο αναλυτικά, ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις ακόμη και τάξης του 1 ppb των δραστικών ουσιών chlorpyrifos (οργανοφωσφορικό) και carbaryl (καρβαμιδικό) σε φύλλα καπνού (Mavrikou et al. 2008), χρησιμοποιώντας ως κυτταρικούς βιοαισθητήρες τροποποιημένα μεμβρανικά κύτταρα

νευροβλαστώματος N2a που μπόρεσαν να ανιχνεύσουν την παρουσία φυτοφαρμάκων μετρώντας τον βαθμό αναστολής της δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE). Προσφάτως και με παρόμοιο τρόπο, έγινε χρήση δύο διαφορετικών κυττάρων, N2a και Vero (νεφρικά κύτταρα πράσινου πιθήκου), για την ανίχνευση διαφόρων φυτοφαρμάκων (εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα) σε δείγματα ντομάτας (Flamprouri et al. 2009).

1.5 Εισαγωγή στα φυτοφάρμακα

Από τις αρχές του 20ού αιώνα, όταν γινόταν χρήση αρσενικούχων ενώσεων στη γεωργία και μετά την ευρεία χρήση του DDT στις δεκαετίες του '40 και του '50, σήμερα πλέον στην γεωργία χρησιμοποιείται ένα ευρύ φάσμα εντομοκτόνων ουσιών για την καταπολέμηση επιβλαβών εντόμων. Από όλους τους τρόπους καταπολέμησης ασθενειών και προστασίας των φυτών, η χρησιμοποίηση χημικών ενώσεων που μπορούν να θανατώσουν το παθογόνο ή να παρεμποδίσουν ή επιβραδύνουν την ανάπτυξη του, είναι ο συνηθέστερος, τουλάχιστον στις περιοχές με ανεπτυγμένη γεωργία. Οπωσδήποτε, η χρήση χημικών μέσων για την καταπολέμηση παθογόνων μυκήτων ή βακτηρίων απαιτεί διεθνώς μικρότερη δαπάνη από ότι για την καταπολέμηση εντόμων ή ζιζανίων και αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην επιτυχή χρησιμοποίηση ανθεκτικών στις ασθένειες ποικιλιών. Η σημασία, όμως, της φυτοπροστασίας για την αύξηση της γεωργικής παραγωγής προς αντιμετώπιση του προβλήματος της διατροφής του διαρκώς αυξανόμενου πληθυσμού, απασχολεί όλο και περισσότερο την επιστημονική κοινότητα.

Το θέμα των υπολειμμάτων προϊόντων φυτοπροστασίας στα τρόφιμα, είναι εξόχως αντιφατικό και άκρως πολύπλοκο. Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στα τρόφιμα γνώρισε αλματώδη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια. Καθώς έχει πολυάριθμες σοβαρές επιπτώσεις, (οικονομικές, υγειονομικές), αποτελεί αντικείμενο ειδικών μελετών στις ανεπτυγμένες χώρες, βάσει των οποίων προβαίνουν σε ρυθμίσεις για την προστασία του καταναλωτή. Οι ρυθμίσεις αυτές απορρέουν από μελέτη των ιδιοτήτων, (τοξικολογικών, βιολογικών, κ.α.), κάθε ουσίας που προτείνεται σαν προϊόν φυτοπροστασίας και συνήθως καθορίζονται με την διαδικασία έγκρισης ή επανέγκρισής της. Η καλύτερη γνώση της τοξικολογίας των διαφόρων ουσιών και οι πιέσεις των καταναλωτών και των οικολογικών οργανώσεων προς τις κυβερνήσεις των προηγμένων χωρών και τους αρμόδιους φορείς ελέγχου,

είχαν σαν συνέπεια οι αναλυτικές δυνατότητες να διευρυνθούν και τα κατώτατα όρια προσδιορισμού να μειωθούν σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα, σε σχέση με παλαιότερα. Οι προηγμένες Ευρωπαϊκές χώρες έχουν καθορίσει «Ανώτατα Όρια Υπολειμμάτων», σε εθνικό επίπεδο και έχουν θέσει σε ισχύ νομοθετικά μέτρα με τα οποία ορίζεται ότι γεωργικά προϊόντα, εγχώρια ή εισαγόμενα, δεν επιτρέπεται να τεθούν σε κυκλοφορία, εάν οι δειγματοληπτικοί έλεγχοι δείξουν ότι η περιεκτικότητά τους σε υπολείμματα φυτοφαρμάκων τα υπερβαίνει. Ως Εθνικά Ανώτατα Όρια Υπολειμμάτων, (Maximum Residue Levels, MRLs), στις Ευρωπαϊκές χώρες ορίζονται τα ανώτατα νόμιμα όρια συγκέντρωσης υπολειμμάτων ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος, εντός ή επί τροφίμων ή ζωοτροφών, το οποίο ορίζεται στη νομοθεσία και βασίζεται στην Ορθή Γεωργική Πρακτική και στη χαμηλότερη απαιτούμενη έκθεση του καταναλωτή για την προστασία των ευάλωτων ομάδων καταναλωτών. Τα κοινοτικά MRLs αποτελούν το μέσο για να ελεγχθεί η ορθή, εγκεκριμένη και συνιστώμενη χρήση των φυτοπροστατευτικών ουσιών. Η Ορθή Γεωργική Πρακτική, αποτελεί την, σε εθνικό επίπεδο, εγκεκριμένη, ασφαλή και αποτελεσματική χρήση των φυτοπροστατευτικών ουσιών, υπό πραγματικές συνθήκες, σε οποιοδήποτε στάδιο παραγωγής τροφίμων και ζωοτροφών. Επομένως, για να εξασφαλιστεί η ασφάλεια των τροφίμων και συνεπώς, η προστασία του καταναλωτή, είναι απαραίτητος ο επίσημος έλεγχος των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε προϊόντα φυτικής προέλευσης και δυναμικό εργαλείο των ελέγχων αυτών, αποτελεί η χρήση των κυτταρικών βιοαισθητήρων, οι οποίοι δύνανται να παρέχουν αξιόπιστες αναλύσεις στον τομέα αυτό.

1.5.1 Ταξινόμηση γεωργικών φαρμάκων-Τρόπος δράσης κυριότερων ομάδων εντομοκτόνων

Η γνώση της ταξινόμησης των γεωργικών φαρμάκων είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς ανάλογα με την κατηγορία μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τον τρόπο δράσης, αλλά και για τις διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες ενός γεωργικού φαρμάκου. Παράλληλα συμβάλλει στο σωστό σχεδιασμό και εφαρμογή του προγράμματος ψεκασμών, στην αποφυγή ζημιάς στη φυτική παραγωγή λόγω ανεπιτυχούς αντιμετώπισης του προβλήματος ή από φυτοτοξικότητα λόγω λανθασμένης επιλογής γεωργικού φαρμάκου, όπως επίσης και στην σωστή ενημέρωση σχετικά με τα νέες μεθόδους φυτοπροστασίας. Γενικά τα φυτοφάρμακα μπορούν να

ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους, όπως με βάση την χρήση τους, την χημική σύνθεση τους, τον τρόπο δράσης τους, κ.α.

•Σύμφωνα με τον **τρόπο δράσης** τους, διακρίνονται σε **διασυστηματικά** και σε **επαφής**.

Τα **διασυστηματικά** γεωργικά φάρμακα, τα οποία εμφανίζουν εξειδικευμένη δράση, προσλαμβάνονται από τα φύλλα ή τις ρίζες και μετακινούνται μέσα στο φυτό σε αντίθεση με τα επαφής που δεν μετακινούνται στο φυτό. Επιπλέον, ορισμένα έχουν διεισδυτική δράση εντός των ιστών των φυτών (συνήθως στην επιδερμίδα) αλλά δεν διακινούνται με τους χυμούς. Τα εντομοκτόνα διακρίνονται επίσης, σε στομάχου, τα οποία που πρέπει να καταποθούν από το έντομο για να είναι αποτελεσματικά (π.χ. σκευάσματα βακίλου), σε επαφής, που πρέπει να έρθουν σε επαφή με το έντομο και δρουν αφού διαπεράσουν τον εξωσκελετό του εντόμου και σε καπνιστικά ή μέσω αναπνοής, που εισέρχονται στο έντομο μέσω του αναπνευστικού του συστήματος. Τα μυκητοκτόνα, μπορούν να διακριθούν σε προστατευτικά (με προφυλακτική δράση), που πρέπει να καλύπτουν όλη την επιφάνεια του φυτού και το προστατεύουν από πιθανή προσβολή από μύκητες π.χ. mancozeb και chlorothalonil και σε θεραπευτικά, που μετακινούνται μέσα στο φυτό και καταπολεμούν τον υπό ανάπτυξη μύκητα π.χ. myclobutanil, tebuconazole. Τέλος τα ζιζανιοκτόνα διακρίνονται επίσης ανάλογα με τον τρόπο δράσης σε εκλεκτικά, που μπορούν να καταπολεμήσουν ένα τύπο φυτών χωρίς να κάνουν ζημιά σε άλλο τύπο π.χ. το 2,4-D που καταπολεμεί εκλεκτικά τα πλατύφυλλα ζιζάνια σε στενόφυλλες καλλιέργειες (π.χ. σιτηρά), σε μη-εκλεκτικά, που είναι τοξικά σε όλους τους τύπους φυτών και άρα και στην καλλιέργεια π.χ. paraquat και diquat, σε προσπαρτικά ή προφυτευτικά, που εφαρμόζονται στο έδαφος πριν τη σπορά / εγκατάσταση της καλλιέργειας, σε προφυτρωτικά, που εφαρμόζονται μετά τη σπορά / εγκατάσταση της καλλιέργειας, αλλά πριν τη βλάστηση της καλλιέργειας ή των ζιζανίων και σε μεταφυτρωτικά, που εφαρμόζονται μετά τη βλάστηση της καλλιέργειας ή των ζιζανίων (Cremlyn 1991).

•Σύμφωνα με την **χημική τους σύνθεση**, τα γεωργικά φάρμακα διακρίνονται σε **ανόργανα**, στα οποία ανήκουν τα παλαιότερα φυτοφάρμακα, (χαλκούχα, θειάφι), σε **οργανικά**, στα οποία ανήκουν τα σύγχρονα φυτοφάρμακα, σε **φυσικά - βοτανικά**, όπως είναι το πύρεθρο, η ροτενόνη, η νικοτίνη, κ.α. και σε συνθετικά.

•Σύμφωνα με την **χρήση τους**, τα γεωργικά φάρμακα ταξινομούνται σε:

Εντομοκτόνα - Ακαρεοκτόνα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση επιβλαβών για τα φυτά εντόμων και ακάρεων.

Μυκητοκτόνα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση επιβλαβών για τα φυτά μυκήτων. Τα μυκητοκτόνα θεωρούνται γενικώς μικρής ή ασήμαντης τοξικότητας στα έντομα. Παρόλα αυτά όμως περιλαμβάνουν ουσίες οι οποίες είναι πολύ τοξικές και χρόνια τοξικές στον άνθρωπο, στα θηλαστικά και τα πουλιά. Περισσότερες έρευνες χρειάζονται για να συμπληρωθεί η εικόνα των επιδράσεων τους στα έντομα επικονιαστές. Τα μυκητοκτόνα χωρίζονται σε δύο τύπους μη συστηματικά και συστηματικά. Τα πρώτα είναι αυτά που παραμένουν στην περιοχή που εναποτέθηκαν, ενώ τα δεύτερα εισέρχονται στο φυτό και μεταφέρονται στα φύλλα ή τον φλοιό. Ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση, διαχωρίζονται σε ανόργανα, (θειάφι, χαλκούχα - βορδιγάλειος πολτός), σε διμέθυλο-διθειοκαρβαμιδικά, (ferbam, thiram, ziram), σε αιθυλενο-δις- διθειοκαρβαμιδικά, (maneb, mancozeb, metiram, propineb), και σε βενζιμιδαζολικά, (carbendazim, thiabendazole, thiophanate-methyl).

Ζιζανιοκτόνα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση ζιζανίων. Κάποια από αυτά παρεμποδίζουν τη δράση συγκεκριμένων ενζύμων και τα φυτά πεθαίνουν, κάποια άλλα παρεμποδίζουν τη φωτοσύνθεση και κάποια άλλα την παραγωγή πρωτεϊνών. Αν και τα περισσότερα δεν προκαλούν οξεία τοξικότητα όπως τα εντομοκτόνα, θεωρούνται όμως ως πιθανά για ανθρώπινη καρκινογένεση. Κάποια από αυτά επίσης ενοχοποιούνται και για ενδοκρινικές διαταραχές. Υπάρχει ακόμα μεγάλη έλλειψη γνώσης στις επιδράσεις των ζιζανιοκτόνων. Η γνωστότερη επίδραση τους στα ωφέλιμα έντομα και τους επικονιαστές είναι η διαταραχές στο οικοσύστημα και τις συνθήκες διαβίωσης των εντόμων. Επιπλέον, υπάρχουν νηματωδοκτόνα (καταπολεμούν νηματώδεις), βακτηριοκτόνα, (καταπολεμούν βακτήρια), κ.α. Τα ζιζανιοκτόνα διακρίνονται σε επιλεκτικά και μη επιλεκτικά ανάλογα με την εξειδίκευση που τα χαρακτηρίζει. Ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση, διαχωρίζονται σε διάφορες ομάδες, όπως είναι τα φαινοξυοξέα, τα οποία είναι διασυστηματικά και δρουν στη σύνθεση και δράση των αυξινών, τα παράγωγα ουρίας, τα οποία είναι εκλεκτικά ζιζανιοκτόνα σε χαμηλές δόσεις, είναι διασυστηματικά, προσλαμβάνονται κυρίως από τις ρίζες, κινούνται προς τα φύλλα και δρουν εμποδίζοντας τη φωτοσύνθεση των φυτών, οι τριαζίνες, οι οποίες έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και γι' αυτό χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την αμειψισπορά με ευαίσθητες καλλιέργειες και δρουν εμποδίζοντας τη φωτοσύνθεση των φυτών, τα διπυριδίλια, τα οποία δρουν εμποδίζοντας τη φωτοσύνθεση των φυτών, οι δινιτροανιλίνες, που δρουν

παρεμποδίζοντας την κυτταροδιαίρεση και οι κυκλοεξανδιόνες, οι οποίες δρουν εμποδίζοντας τη βιοσύνθεση των λιπιδίων.

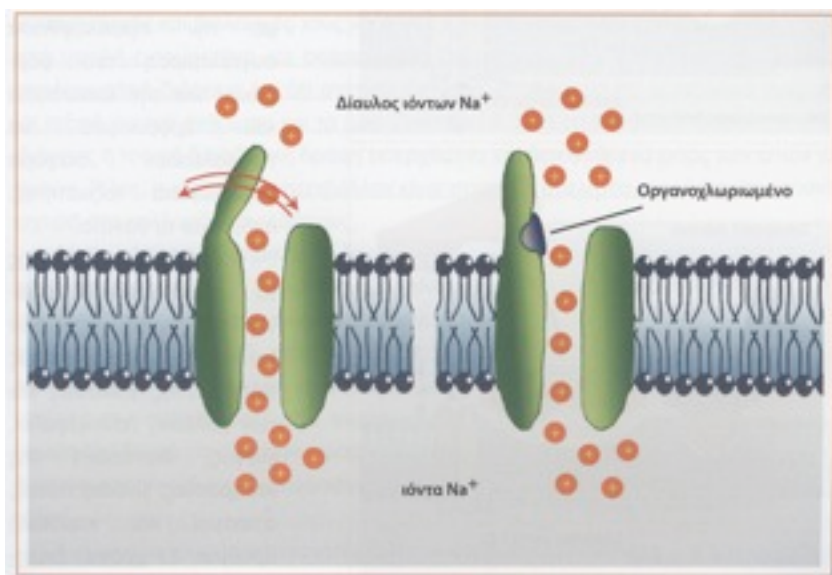
Πιο αναλυτικά, τα εντομοκτόνα, τα οποία συνιστούν τουλάχιστον το 25% των φυτοπροστατευτικών ουσιών, διακρίνονται ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση σε:

✓ **Οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα (orgnchlorines)**

Είναι από τις παλαιότερες συνθετικές οργανικές ενώσεις, που έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην προστασία της γεωργικής παραγωγής και της δημόσιας υγείας μετά τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο. Αυτή η κατηγορία εντομοκτόνων άρχισε να αναπτύσσεται ουσιαστικά με την ανακάλυψη του DDT, το οποίο θεωρείται και ο θεμέλιος λίθος της σύγχρονης χημικής αντιμετώπισης των ζωικών εχθρών των καλλιεργειών. Πρόκειται για παράγωγα οργανοχλωριωμένων υδρογονανθράκων, μεγάλης εντομοτοξικής δράσης και διάρκειας που προσλαμβάνονται ταχύτατα από την επιδερμίδα των εντόμων λόγω της μεγάλης λιποδιαλυτότητάς τους.

Με την πάροδο όμως του χρόνου διαπιστώθηκαν σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον, από τη χρήση των εντομοκτόνων αυτών, λόγω της μεγάλης σταθερότητάς τους και του φαινομένου της βιοσυσσώρευσης. Το μεγάλο μειονέκτημά των ενώσεων αυτών είναι ότι δεν αποδομούνται εύκολα, συσσωρεύονται στον λιπώδη ιστό, περνούν στο γάλα και τα αυγά και εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα των ζώων και του ανθρώπου. Έτσι στη δεκαετία του '70 απαγορεύθηκε η χρήση των περισσότερων οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων σε όλες σχεδόν τις ανεπτυγμένες χώρες.

Με βάση τη χημική δομή τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα κατατάσσονται σε τέσσερις υποομάδες: α) την υποομάδα του DDT και των παραγώγων του, β) την υποομάδα του εξαχλωροκυκλοεξανίου, γ) των κυκλοδιενίων και δ) των πολυχλωροτερπενίων.



Σχήμα 1.11 Παρατεταγμένο άνοιγμα των διαύλων Na^+ στις προσυναπτικές μεμβράνες των νευρικών κυττάρων (Ζιώγας, Μαρκόγλου 2007)

Σχετικά με την εντομοτοξική δράση τους, έχει διαπιστωθεί ότι παρεμποδίζουν την αξονική μετάδοση των νευρικών σημάτων, προκαλώντας πολλαπλές εκφορτίσεις, μεγάλη νευρική διέγερση, σπασμούς και τελικά το θάνατο. Ειδικότερα, για το βιοχημικό μηχανισμό δράσης των εντομοκτόνων αυτών, υποστηρίζεται ότι κρατούν ανοικτές τις διαύλους των ιόντων νατρίου Na^+ στις προσυναπτικές μεμβράνες των νευρικών κυττάρων του περιφερειακού νευρικού συστήματος με προσκόλληση στις πρωτεϊνικές τους υπομονάδες (Σχήμα 1.11). Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι η διατάραξη της ευαίσθητης ισορροπίας ηλεκτρολυτών K^+ και Na^+ στο περιβάλλον του νευράξονα (Stenersen 2004).

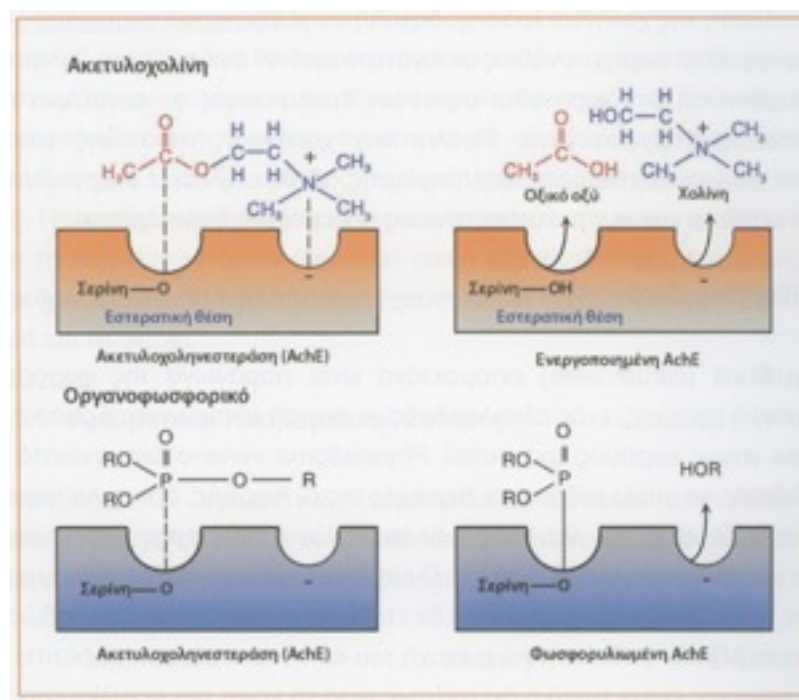
✓ **Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (organophosphates)**

Αποτελούν την πλέον πολυπληθή ομάδα συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων με ευρύ φάσμα δράσης κατά πολλών εντόμων. Η ευρεία εφαρμογή των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων, τα οποία αντικατέστησαν πλήρως τα οργανοχλωριωμένα, οφείλεται κυρίως στις φυσικοχημικές και βιολογικές τους ιδιότητες. Σε γενικές γραμμές χαρακτηρίζονται από υψηλή εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο δράση, έχουν ευρύ φάσμα δράσης, μικρή υπολειμματική διάρκεια και σχετικά γρήγορη αποδόμηση σε μεταβολικά προϊόντα μη τοξικά για τον άνθρωπο και τα ζώα. Πολλά από αυτά επιδεικνύουν διασυστηματικές ιδιότητες ή τοπική διεισδυτική δράση εισερχόμενα και διακινούμενα εντός των ιστών των φυτών. Τέλος, η κίνηση στο

περιβάλλον είναι πρακτικά αμελητέα, αφού προσροφούνται ισχυρά στα κολλοειδή του εδάφους.

Από άποψη χημικής δομής οι οργανοφωσφορικές ενώσεις είναι προϊόντα του πεντασθενούς τετραεδρικού φωσφόρου και ταξινομούνται σε τρεις κύριες υποομάδες: α) τα αλειφατικά παράγωγα, β) τα αρωματικά και γ) τα ετεροκυκλικά παράγωγα.

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα δρουν στις χολινεργικές συνάψεις, δηλαδή στις συνάψεις που νευροδιαβιβαστής είναι η ακετυλοχολίνη. Ειδικότερα, ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης τους είναι η μη αναστρέψιμη παρεμπόδιση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Για τη δράση αυτή είναι απαραίτητη η ύπαρξη της ομάδας P=O (phosphoryl) στο μόριο τους, ενώ για τα οργανοφωσφορικά με ομάδα P=S (ή άλλο) πρέπει να γίνει μετατροπή της ομάδας αυτής, στο φυτό ή στο έντομο, σε P=O. Σε κατάσταση φυσιολογικής λειτουργίας η συγκέντρωση της ακετυλοχολίνης στο συναπτικό διάκενο ελέγχεται άμεσα από την ακετυλοχολινεστεράση, η οποία μετά τη μεταβίβαση του νευρικού σήματος, υδρολύει την ακετυλοχολίνη σε οξικό οξύ και χολίνη που είναι φυσιολογικά αδρανής και έτσι η σύναψη αποφορτίζεται. Το οξικό οξύ και η χολίνη απομακρύνονται από το ένζυμο το οποίο στη συνέχεια δέχεται άλλο μόριο ακετυλοχολίνης κ.ο.κ. (Chambers 1992).



Σχήμα 1.12 Υδρόλυση της ακετυλοχολίνης από την ακετυλοχολινεστεράση
(Ζιώγας, Μαρκόγλου 2007)

Όταν όμως εισέλθει στον οργανισμό του εντόμου κάποιος οργανοφωσφορικός εστέρας τότε γίνεται φωσφορυλίωση της χοληνεστεράσης, με προσκόλληση στη σερίνη της εστερατικής θέσης του ενζύμου (Σχήμα 1.12)

Η φωσφορική ομάδα παραμένει προσκολλημένη στο ένζυμο παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του με αποτέλεσμα την υπέρμετρη συσσώρευση της ακετυλοχολίνης. Η υπέρμετρη συσσώρευση του νευροδιαβιβαστή έχει ως αποτέλεσμα τη “βραχυκύκλωση” του συστήματος μετάδοσης των νευρικών μηνυμάτων, προκαλώντας πληθώρα νευρομεταδόσεων στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος, με αποτέλεσμα υπερδιέγερση, μεγάλη κινητικότητα, τρόμο, σπασμούς, παράλυση και τελικά θάνατο.

✓ **Καρβαμιδικά εντομοκτόνα (carbamates)**

Είναι παράγωγα της φυσοστιγμίνης (physostigmine) ή εσερίνης, ενός αλκαλοειδούς με ισχυρή αντιχοληνεστερασική δράση, που βρίσκεται στους καρπούς του φυτού *Physostigma venenosum*, γνωστό και ως κύαμο του Calabar (Cupta 2005).

Οι καρβαμιδικές ενώσεις είναι νεότερης γενιάς εντομοκτόνα από τα οργανοχλωριωμένα και τα οργανοφωσφορικά. Πρόκειται για παράγωγα του καρβαμιδικού οξέος (NH_2COOH) που έχουν τον γενικό τύπο $[\text{RO-CO-NR}^2]$ και διακρίνονται σε τρεις κύριες υποομάδες: α) τους αρωματικούς καρβαμιδικούς εστέρες, β) τους ετεροκυκλικούς καρβαμιδικούς εστέρες και γ) τα καρβαμιδικά παράγωγα οξιμών.

Γενικά τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα-ακαρεοκτόνα χαρακτηρίζονται από δράση ανάλογη των οργανοφωσφορικών. Έχουν υψηλή δραστικότητα δρώντας κατά κανόνα ως εντομοκτόνα επαφής και στομάχου, ενώ τα περισσότερα έχουν διασυστηματική κίνηση. Δεν έχουν ευρύ φάσμα δράσης, ενώ χαρακτηρίζονται και από ακαρεοκτόνες ιδιότητες. Παρουσιάζουν άμεση δράση στο νευρικό σύστημα και προκαλούν ταχεία και απότομη πτώση των εντόμων και έχουν οξεία τοξικότητα για τα θηλαστικά.

Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης των καρβαμιδικών εντομοκτόνων είναι ανάλογος των οργανοφωσφορικών, με δράση στην ακετυλοχολινεστεράση. Όμως, η παρεμπόδιση της χοληνεστεράσης από τα καρβαμιδικά είναι αναστρέψιμη. Η προσκόλληση του καρβαμιδικού μέρους στην σερίνη της εστερατικής θέσης του ενζύμου και η παρεμπόδιση της δράσης του, λόγω καρβαμυλίωσης, διαρκεί συνήθως λίγες ώρες.

✓ Πυρεθρινοειδή (pyrethroids)

Αποτελούν την τέταρτη γενιά συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων και πρόκειται για ενώσεις παράγωγα της φυσικής πυρεθρίνης I που παραλαμβάνεται από τις ταξιανθίες του φυτού *Tanacetum (Chrysanthemum, Pyrethrum) cinerariaefolium*, γνωστό ως “πύρεθρο” (Leahey 1985).

Τα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα χαρακτηρίζονται από τις καλές ιδιότητες (φυσικές, χημικές, βιολογικές και τοξικολογικές) των φυσικών πυρεθρινών και επιπλέον παρουσιάζουν μεγαλύτερη φωτοσταθερότητα, ιδιότητα που τους προσδίδει ικανή υπολειμματική διάρκεια. Έχουν πολύ μεγαλύτερη εντομοτοξική δράση, ιδιότητα που τους επιτρέπει τη μείωση των δόσεων και του αριθμού των επεμβάσεων. Στον άνθρωπο διασπώνται πολύ σύντομα προς μη τοξικά παράγωγα και έτσι είναι πρακτικά ακίνδυνα. Διακρίνονται από μεγάλη λιποδιαλυτότητα και είναι σχεδόν αδιάλυτα στο νερό.

Είναι εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα επαφής και στομάχου, ενώ μερικά από αυτά δρουν και ως ασφυκτικά. Χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα δράσης εναντίον πολλών ειδών εντόμων και ακάρεων. Από άποψη χημικής δομής πρόκειται για εστέρες του χρυσανθεμικού οξέος, κύριου συστατικού των φυσικών πυρεθρινών I και II, ή παραγώγων του με διάφορες αλκοόλες.

Τα πυρεθρινοειδή προσκολλώνται στις πρωτεϊνικές υπομονάδες των διαύλων ιόντων νατρίου (Na^+), στις μεμβράνες των τελικών κλωνίων του νευράξονα και προκαλούν παρατεταμένο άνοιγμα των διαύλων. Όμως φαίνεται ότι επηρεάζουν και άλλες διαύλους ιόντων, όπως τις διαύλους των ιόντων χλωρίου Cl^- , που ενεργοποιούνται από τον νευροδιαβιβαστή GABA, και τις διαύλους ιόντων ασβεστίου.

✓ Εντομοκτόνα φυτικής προέλευσης

Αποτελούνται από ουσίες εκχυλισμένες από τα φυτά. Σε αυτά ανήκουν τα έλαια εσπεριδοειδών (λεμονένια), η νικοτίνη, η πυρεθρίνη, η αζαντιραχτίνη, κ.α. (Addor et al. 1995). Οι πυρεθρίνες, οι οποίες ανήκουν στα βοτανικά εντομοκτόνα και έχουν αναπτυχθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια, είναι φυτικές ουσίες που εκχυλίζονται από τα άνθη του φυτού *Chrysanthemum cinerariaefolium*, της οικογένειας Compositae (Σύνθετα). Όλες, σχεδόν, οι πυρεθρίνες είναι εντομοκτόνα επαφής και στομάχου χωρίς καπνογόνο εντομοτοξικότητα. Είναι μίγμα από τέσσερις ενεργές ουσίες, (πυρεθρίνη I και II και σινερίνη I και II) και χαρακτηρίζονται από μια πολύ σύνθετη δομή. Οι πυρεθρίνες I και II και οι σινερίνες I και II, είναι εστερικές ενώσεις

που συνδέουν ένα οξύ με τριγωνικό δακτύλιο υδρογονάνθρακα, με έναν πενταμελή δακτύλιο αλκοόλης. Οι πυρεθροειδείς εστέρες είναι έλαια διαλυτά σε αλκοόλες, ακετόνη και πετρελαιοειδή αλλά αδιάλυτα στο νερό. Υδρολύονται εύκολα από ένζυμα με αποτέλεσμα να μην μπορούν να θανατώσουν τα έντομα σαν στομαχικά δηλητήρια, αλλά να δρουν σαν εφήμερα δηλητήρια επαφής. Σπουδαία ιδιότητα των πυρεθρινών, ως εντομοκτόνων, είναι η μεγάλη ταχύτητα με την οποία παραλύουν το έντομο και ότι ο συνδυασμός της πρόκλησης αναισθησίας στα έντομα με την πολύ χαμηλή τοξικότητα τους τα κάνουν ιδανικά οικιακά παρασιτοκτόνα, παρόλο που η αναισθησία στα έντομα δεν σημαίνει και θάνατο. Η υπολειμματική τους διάρκεια είναι 2-4 εβδομάδες. Συνήθως χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με κάποιο άλλο εντομοκτόνο, (οργανοφωσφορικά, καρβαμικά), για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Οι συνθετικές πυρεθρίνες, τα λεγόμενα πυρεθροειδή, είναι συνθετικά χημικά συστατικά, παράγωγα των πυρεθρινών. Μπορούν να διαχωριστούν σε δυο τύπους, (Type I, II), ανάλογα με την χημική τους δομή και με τις βιολογικές τους παρενέργειες. Στα πυρεθροειδή τύπου I, (bifenthrin, S-bioalletrin, permethrin, resmethrin, tefluthrin), απουσιάζει από το μόριο τους η α-κυανοομάδα, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα τοξικά και προκαλούν διαφορετικά συμπτώματα στους οργανισμούς, σε σχέση με τα πυρεθροειδή τύπου II, (β-cyfluthrin, λ-cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, esfenvalerate) τα οποία φέρουν την α-κυανοομάδα στο μόριο τους. Τα συνθετικά πυρεθροειδή, τείνουν να είναι περισσότερο αποτελεσματικά από τις φυσικές πυρεθρίνες. Περιέχουν χλώριο, το οποίο συμβάλλει στην διατήρηση τους στο περιβάλλον. Πρόσφατα έγινε δυνατή η βιομηχανική σύνθεση και παραγωγή πυρεθροειδών ουσιών, που χημικά και ως προς την εντομοτοξικότητα μοιάζουν με τις πυρεθρίνες. Είναι αβλαβείς στα θηλαστικά, έχουν όμως πιο σταθερό μόριο στην φωτόλυση ή υδρόλυση από ό,τι οι φυσικές πυρεθρίνες. Τα πυρεθροειδή είναι ιδιαίτερα τοξικά τόσο για μέλισσες όσο και για τα ψάρια. Στα πυρεθροειδή αποδίδονται ενδοκρινικές διαταραχές και ενώ αναφέρονται ως μέσου τύπου τοξικότητας για τα θηλαστικά και τα πτηνά, θεωρούνται πολύ τοξικά για τα έντομα και τα ψάρια. Η μικρή τους τοξικότητα, στα θερμόαιμα και η μικρή υπολειμματική τους διάρκεια οφείλεται στην ευκολία με την οποία αποσυντίθεται το μόριο τους από το φως και τα γαστρικά υγρά.

✓ **Βιολογικά εντομοκτόνα**

Αποτελούνται από μικροοργανισμούς, όπως ιούς, βακτήρια, πρωτόζωα και νηματώδη και η δράση τους προκαλεί ασθένειες στα έντομα και τα θανατώνει.

✓ **Αντιβιοτικά εντομοκτόνα.**

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι αβερμεκτίνες, οι οποίες είναι ουσίες με εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο δράση. Είναι μακρολακτόνες, με κύριο αντιπρόσωπο την δραστική ουσία abamectin. Οι αβερμεκτίνες προέρχονται από το βακτήριο *Streptomyces avermitilis*, που βρίσκεται στο έδαφος. Οι αβερμεκτίνες έχουν δράση αντιτροφική και επηρεάζουν και την λειτουργία του νευρικού συστήματος των εντόμων που προσβάλλουν.

✓ **Διάφορα εντομοκτόνα**, τα νεότερα εντομοκτόνα / ακαρεοκτόνα

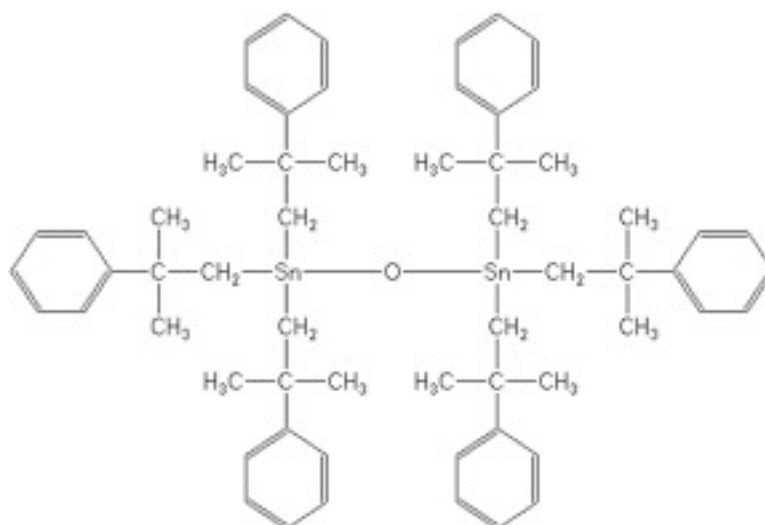
κατατάσσονται σε ειδικές ομάδες που δεν έχουν χημική συγγένεια μεταξύ τους.

1.5.2 Φυτοπροστατευτικές ουσίες οι οποίες μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Οι δραστικές ουσίες που αποτέλεσαν το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας είναι οι εξής:

Fenbutatin oxide. Hexakis (2-methyl-2-phenylpropyl)distannoxane

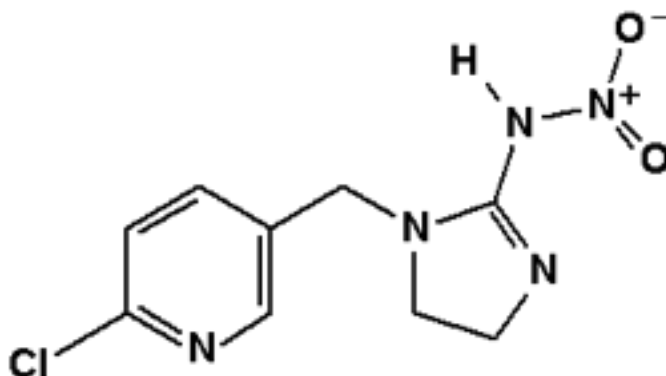
Πρόκειται για μη διασυστηματικό ακαρεοκτόνο επαφής και δευτερευόντως στομάχου. Είναι συνθετική οργανική ένωση που δρα ως παρεμποδιστής της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και συγκεκριμένα της συνθετάσης του ATP, δηλαδή του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή του ADP σε ATP.



Εφαρμόζεται με ψεκασμό φυλλώματος. Μπορεί να προκαλέσει ανθεκτικότητα στα ακάρεα γι' αυτό αν παρατηρηθεί δεν πρέπει να αυξηθούν οι δόσεις αλλά να χρησιμοποιηθεί σκεύασμα με άλλη δραστική ουσία. Προκαλεί φυτοτοξικότητα σε τριανταφυλλιές και γαριφαλιές, αλλά δεν είναι φυτοτοξικό στις υπόλοιπες συνιστώμενες καλλιέργειες, για τις συνιστώμενες δόσεις και στις ελληνικές εδαφοκλιματικές συνθήκες, εφόσον τηρούνται οι οδηγίες της ετικέτας. Είναι πολύ τοξικό όταν εισπνέεται και ερεθίζει τα μάτια και το δέρμα. Το fenbutatin oxide είναι σχετικά μη τοξικό για τις μέλισσες και πολύ τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς ενώ μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνιες επιπτώσεις στο υδάτινο περιβάλλον. Είναι επίσης βλαβερό για τα άγρια ζώα και τα πουλιά (Jacobson et al. 1999).

Imidacloprid. (N-[1-[(6-Chloro-3-pyridyl)methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl]nitramide)

Είναι διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου και ήταν το πρώτο νεονικοτινοειδές που εισήχθηκε στη γεωργική πράξη στις αρχές της δεκαετίας του '90. Απορροφάται εύκολα από τα φυτά, χαρακτηρίζεται από διελασματική κίνηση και μετακινείται εντός του φυτού αποπλαστικά. Είναι αποτελεσματικό εναντίον μυζητικών εντόμων όπως αφίδες, θρίπες, αλευρώδεις και μερικών μασητικών, όπως για παράδειγμα στο δορυφόρο της πατάτας, καθώς και εναντίον εντόμων εδάφους, τερμιτών, αλλά και για ψύλλους οικόσιτων ζώων.



Η δράση του οφείλεται στη δέσμευση των μετασυναπτικών (νικοτινικών) υποδοχέων της ακετυλοχολίνης στο περιφερειακό νευρικό σύστημα των εντόμων, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της φυσιολογικής μετάδοσης των νευρικών σημάτων μεταξύ των νευρικών κυττάρων, η διαρκής υπερδιέγερση, η πρόκληση νευρικών σπασμών, η παράλυση και τελικά ο θάνατος του εντόμου (Yamamoto et al. 1999).

Σε αντίθεση δηλαδή με τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμικά εντομοκτόνα, τα νεονικοτινοειδή δεν παρεμποδίζουν την ακετυλοχολινεστεράση, η οποία ελέγχει τη συγκέντρωση της ακετυλοχολίνης στο συναπτικό διάκενο.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτοφάρμακα

Στην παρούσα εργασία τα δύο φυτοφάρμακα που μελετήθηκαν είναι τα εξής: Vendex 55 (δραστική ουσία fenbutatin oxide 55% w/v) και Confidor Forte 200 SL (δραστική ουσία imidacloprid 20.6% w/v).

2.2 Βιολογικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικοί βιοαισθητήρες BERA 5^η γενιάς (δηλαδή χωρίς τροποποιημένα κύτταρα) από τρεις κυτταρικές σειρές:

i) Πρωτοπλάστες, δηλαδή φυτικά κύτταρα χωρίς κυτταρικό τοίχωμα, από φύλλα καπνού (*nicotiana tabacum*) ποικιλίας *Samsun*. Συγκεκριμένα, έγινε προπλάσμούση 0,5 g από φύλλα καπνού σε 20 ml διαλύματος CPW (βλέπε πίνακα 1) συμπληρωμένο με 0,7 M μαννιτόλη για μία ώρα και στη συνέχεια επώαστηκαν για 20 ώρες σε 20 ml του ίδιου διαλύματος στο οποίο είχαν προστεθεί 3 mg πεκτινάσης και 2 mg σελλουλάσης.

Πίνακας 1. Ρυθμιστικό διάλυμα CPW

Συστατικά	Συγκέντρωση (mg/l)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1480
KH ₂ PO ₄	27.2
KNO ₃	101
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
KI	0.16

ii) Κύτταρα N2a (καρκινικά κύτταρα νευροβλαστώματος) και

iii) Κύτταρα VERO (νεφρικά κύτταρα πράσινου πιθήκου-ινοβλάστες)

Οι δύο αυτές (ii και iii) κυτταρικές σειρές προέρχονται από την ATCC, (American Tissue Culture Collection) και από μορφολογική σκοπιά περιέχουν κυκλικά ή επιμήκη κύτταρα, προσκολλημένα σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), εμπλουτισμένο με 10% β/ο ορό εμβρύου μόσχου (fetal calf serum-FCS), διάλυμα αντιβιοτικών (στρεπτομυκίνη) και 10% ο/ο L – γλουταμίνη, σε θερμοκρασία 37 °C και σε αέρα κορεσμένο σε υγρασία.

2.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός

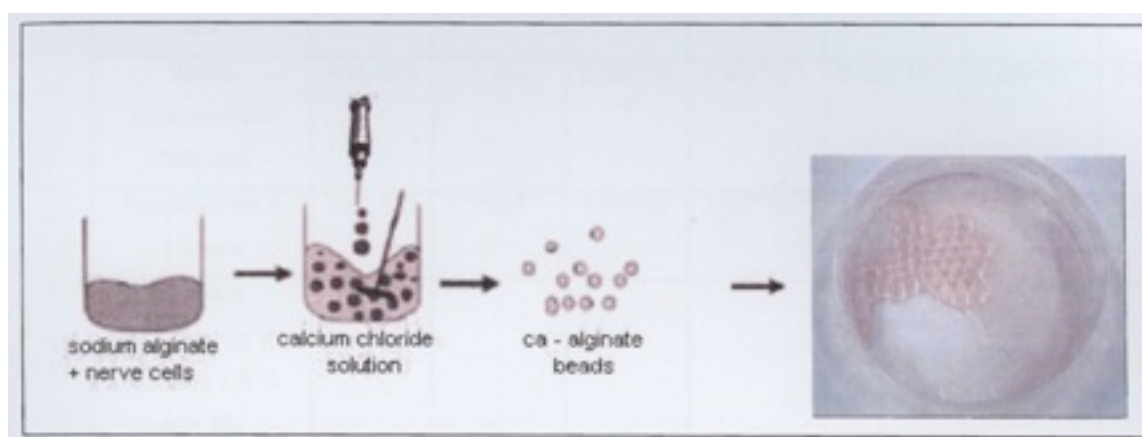
Για το διαχωρισμό στερεών-υγρών καθώς και για τη συλλογή κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η φυγόκεντρος Heraeus Instruments Biofuge 28RS. Τα pH των διαφόρων διαλυμάτων ρυθμίστηκαν σε πεχάμετρο CONSORT C830. Οι μετρήσεις με την τροποποιημένη μέθοδο BERA 5^{ης} γενιάς έγιναν σε σταθερή θερμοκρασία 37 °C, με την χρήση του Block Heater, Stuart Scientific (230V, 50Hz). Η κάρτα μετατροπής του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό ήταν τύπου PMD-1608FS A/D (Measurement Computing), ενώ το λογισμικό που είναι υπεύθυνο για την καταγραφή του σήματος και την επεξεργασία των δεδομένων είναι το InstaCal (Measurement Computing Data Acquisition).

2.4 Κατασκευή κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς

2.4.1 Βιοαισθητήρες με τη μορφή σφαιριδίων

Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες BERA 5^{ης} γενιάς που χρησιμοποιήθηκαν, εμπεριείχαν 1 ml κυττάρων, πυκνότητας 250×10^4 κύτταρα/ml. Η μέτρηση της πυκνότητας των παραληφθέντων κυττάρων έγινε σε πλάκα Neubauer. Εάν η συνολική πυκνότητα των διαθέσιμων κυττάρων ήταν μικρότερη από την επιθυμητή, ακολουθούσε φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων, προκειμένου να

παραληφθεί η επιθυμητή ποσότητα. Στη συνέχεια, το εναιώρημα των κυττάρων έπρεπε να ακινητοποιηθεί και να πάρει τη μορφή σφαιριδίου. Η ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1 ml κυττάρων με την επιθυμητή συγκέντρωση σε 2 ml 4% αλγινικού νατρίου, το οποίο βρισκόταν υπό ανάδευση. Στην συνέχεια, με την βοήθεια σύριγγας προστέθηκαν σταγόνες του μίγματος σε διάλυμα 0.8 M CaCl_2 , με αποτέλεσμα την άμεση ακινητοποίηση των κυττάρων σε αλγινικό ασβέστιο, σε σφαιρικό σχήμα. Τα 35, περίπου, σχηματισθέντα σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου, τα οποία εμπεριείχαν ακινητοποιημένα κύτταρα, τοποθετήθηκαν μέσα σε τρυβλία Petri με 5 ml θρεπτικό υλικό DMEM, το οποίο φιλτράρεται με ηθμό, κλείστηκαν με Parafilm® και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C, όπου με εβδομαδιαία ανανέωση του θρεπτικού υλικού, τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν έως και τέσσερις μήνες (Σχήμα 2.1). Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή των κυτταρικών βιοαισθητήρων είχαν αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο.



Σχήμα 2.1 Παρασκευή κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς σε σφαιρίδια (Μπλούχος 2009)

2.4.2 Βιοαισθητήρες σε πλακίδιο τύπου ELISA

Το πλακίδιο ELISA αποτελείται από 8 σειρές με 12 «πηγαδάκια» η κάθε μία (συνολικά 96 «πηγαδάκια») και το «πηγαδάκι» φέρει στον πυθμένα του τυπωμένα μικροηλεκτρόδια άνθρακα. Επομένως κατασκευάζονται έως και 96 κυτταρικοί βιοαισθητήρες στο πλακίδιο άρα και εκτέλεση ισάριθμων δοκιμών. Ακολουθείται η ίδια μέθοδος, όπως περιγράφηκε παραπάνω, για τη μέτρηση της πυκνότητας των κυττάρων. Τα κύτταρα ακινητοποιούνται με την προσθήκη αγαρόζης (agarose) 1.2% στο κυτταρικό διάλυμα (σε αναλογία 1:5) στο ένα ηλεκτρόδιο της βάσης του πλακιδίου

συνολικής ποσότητας 50 ml και στο υπόλοιπο μέρος προστέθηκαν 100 ml θρεπτικού υλικού DMEM ή CPW με μαννιτόλη (για τα φυτικά κύτταρα), και τοποθετήθηκαν στον ειδικά διαμορφωμένο θάλαμο αποθήκευσης (Σχήμα 2.2).

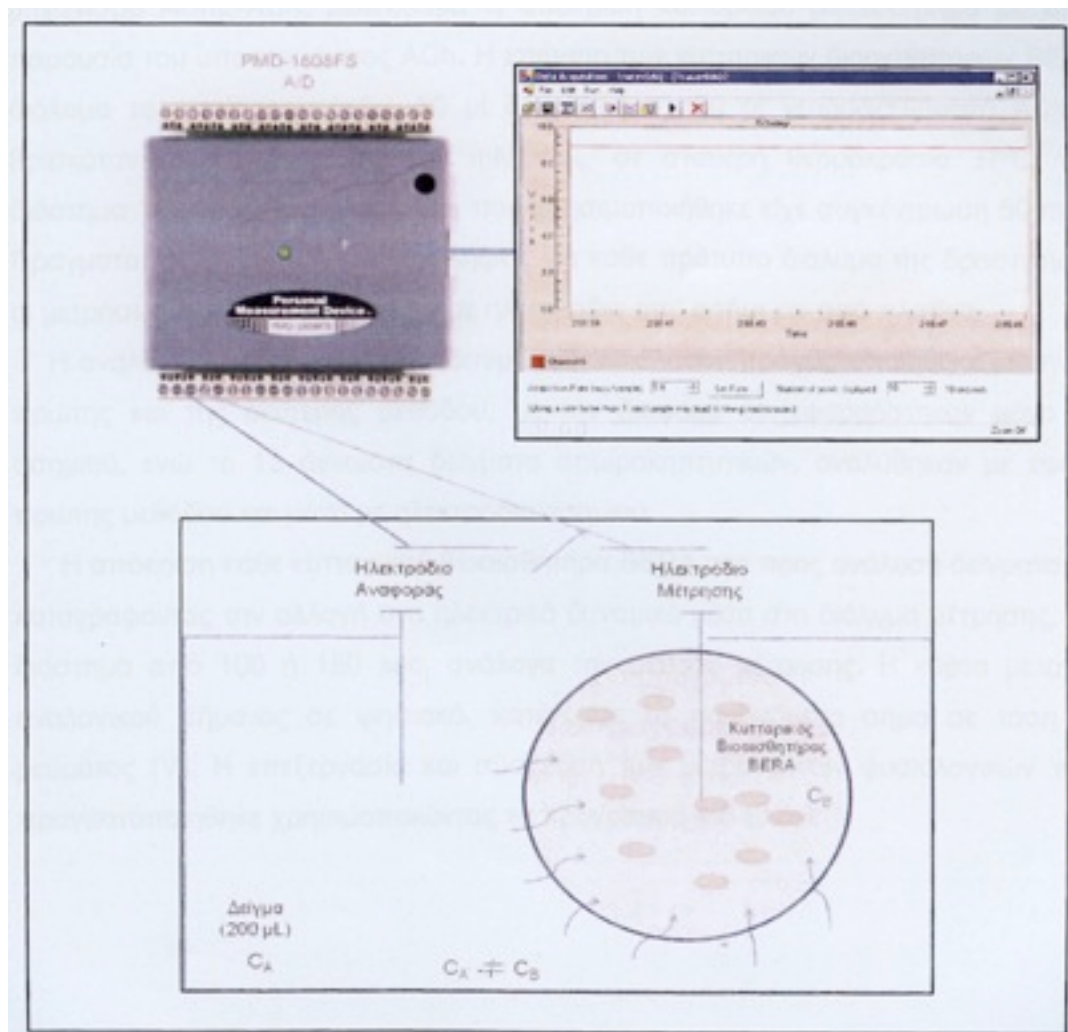


Σχήμα 2.2 Παρασκευή κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς σε πλακίδιο τύπου ELISA

2.5 Διάταξη κυτταρικού βιοαισθητήρα

2.5.1 Βιοαισθητήρας με τη μορφή σφαιριδίου

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της απόκρισης των κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA στα προς ανάλυση δείγματα, απαρτιζόταν από το διάλυμα μέσα στο οποίο γινόταν η επώαση των κυτταρικών βιοαισθητήρων και από την συσκευή καταγραφής δεδομένων, τύπου PMD-1608FS A/D, η οποία ήταν συνδεδεμένη σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και περιελάμβανε κάρτα μετατροπής του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (Σχήμα 2.3). Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν δυο ηλεκτρόδια (αναφοράς και μέτρησης) διαμέτρου 0,2mm και επενδυμένα με μια στρώση χλωριούχου αργύρου (AgCl). Η σύνδεση των ηλεκτροδίων με την συσκευή καταγραφής, έγινε δια μέσου ομοαξονικών καλωδίων προς απαλοιφή ηλεκτροστατικών φορτίων. Το λογισμικό που ήταν υπεύθυνο για την καταγραφή του σήματος και την επεξεργασία των δεδομένων είναι το InstaCal (Measurement Computing, TracerDAQ).



Σχήμα 2.3 Διάταξη συστήματος κυτταρικού βιοαισθητήρα BERA (σφαιρίδιο)

2.5.2 Βιοαισθητήρας σε πλακίδιο τύπου ELISA

Το πλακίδιο με τους κυτταρικούς αισθητήρες και τα υπό ανάλυση δείγματα, τοποθετείται πάνω σε ειδική βάση με συνδέσεις για κάθε ζεύγος ηλεκτροδίων (από τα 96 συνολικά όσα και τα «πηγαδάκια») και στερεώνεται εκεί με τη βοήθεια ειδικού μοχλού (Σχήμα 2.4). Στο πίσω μέρος της συσκευής υπάρχουν 12 απολήξεις-PIN που η κάθε μία απόληξη επικοινωνεί με τα ηλεκτρόδια 8 πηγαδιών του βιοαισθητήρα και συνδέεται με την κάρτα μετατροπής σήματος A/D που με τη σειρά της συνδέεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Επομένως απαιτούνται 12 κάρτες για την ταυτόχρονη μέτρηση σημάτων και από τα 96 πηγαδάκια του βιοαισθητήρα. Για την καταγραφή του σήματος στην οθόνη του υπολογιστή και την επεξεργασία των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε το ίδιο λογισμικό InstaCal.



Σχήμα 2.4 Σύνδεση του βιοαισθητήρα BERA τύπου πλακιδίου ELISA με την ειδική βάση μέτρησης

2.6 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων φυτοφαρμάκων

Πραγματοποιήθηκαν 5 διαδοχικές αραιώσεις, καθενός εκ των δύο φυτοφαρμάκων, προκειμένου να παραληφθούν 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις των δραστικών τους ουσιών και να παρασκευαστούν έτσι τα πρότυπα διαλύματά τους. Στην πυκνότερη αραιώση, των φυτοφαρμάκων, η επιθυμητή ποσότητα της δραστικής ουσίας ήταν σε συγκέντρωση της τάξης του 1 ppm, η μικρότερη 1 ppb και ενδιάμεσα σε συγκεντρώσεις 500 ppb, 100 ppb και 10 ppb. Οι αραιώσεις γίνονταν κάθε φορά με το θρεπτικό διάλυμα (ή CPW με μαννιτόλη) από τη μεγαλύτερη προς τη μικρότερη συγκέντρωση.

2.7 Μέθοδοι ανάλυσης δειγμάτων

2.7.1 Βιοαισθητήρας με τη μορφή σφαιριδίου

Κάθε κυτταρικός βιοαισθητήρας BERA συνδέθηκε με το ηλεκτρόδιο μέτρησης και τοποθετήθηκε στο ειδικά διαμορφωμένο πηγαδάκι, μέσα στο οποίο εγχύθηκε το διάλυμα που περιείχε το προς ανάλυση δείγμα.

Η μέτρηση της απόκρισης των κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA στις πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων των δύο φυτοφαρμάκων, έγινε και με τα τρία διαφορετικά είδη κυττάρων, VERO (νεφρικά κύτταρα πράσινου πιθήκου – ινοβλάστες), N2a (καρκινικά κύτταρα νευροβλαστώματος) και πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού. Και στις τρεις περιπτώσεις στους κυτταρικούς βιοαισθητήρες BERA, εγχύθηκαν 200 μl δείγματος και μετρήθηκε η αντίδρασή τους για 100 sec σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις της μεθόδου για κάθε πρότυπο διάλυμα και κάθε τύπο κυττάρου με την χρήση ηλεκτροδίων αργύρου (AU).

2.7.2 Βιοαισθητήρας σε πλακίδιο τύπου ELISA

Το πλακίδιο ELISA τοποθετείται στη συσκευή BERA όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.5.2 και σε κάθε «πηγαδάκι» στο ένα ηλεκτρόδιο είναι ακινητοποιημένα τα κύτταρα και στο άλλο εγχύθηκαν 100 ml δείγματος υπό ανάλυση και μετράται η απόκριση τους για 100 sec. Κάθε φορά παίρνεται μέτρηση για κάθε μία στήλη (αποτελούμενη από 8 πηγαδάκια και 12 στήλες συνολικά) και στην οθόνη εμφανίζονται 8 διαφορετικά διαγράμματα για κάθε μία συγκέντρωση από τις 5 του προτύπου διαλύματος φυτοφαρμάκου. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις της μεθόδου (δύο πλακίδια για κάθε συγκέντρωση φυτοφαρμάκου) και για κάθε τύπο κυτταρικής σειράς (3 είδη κυττάρων).

Σε κάθε μέτρηση (και για τα δύο είδη κυτταρικού αισθητήρα) υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών του ηλεκτρικού δυναμικού, ο οποίος και αποτέλεσε την τελική τιμή του ηλεκτρικού δυναμικού (V) του βιοαισθητήρα για κάθε δείγμα.

Η επεξεργασία και συσχέτιση των μετρούμενων φυσιολογικών παραμέτρων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MS Excel.

B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

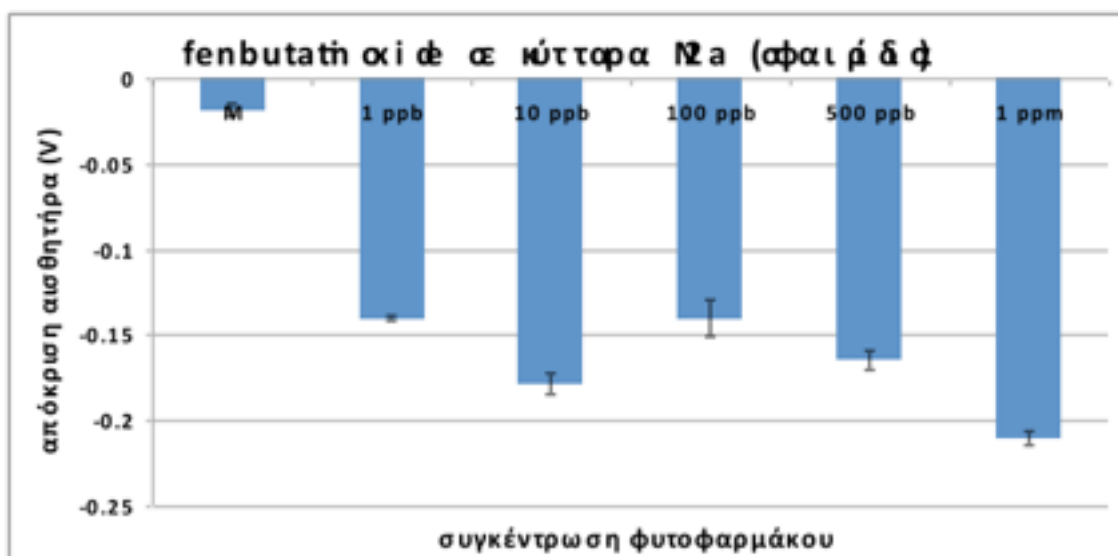
2.8 Απόκριση κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA στα προς ανάλυση δείγματα

Στη συνέχεια, παρατίθενται τα διαγράμματα, όπως αυτά προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων και αφορούν την απόκριση των κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς, συναρτήσει των συγκεντρώσεων των δραστικών ουσιών των προτύπων διαλυμάτων των δύο φυτοφαρμάκων. Η απόκριση αυτή εκφράζεται ως η μεταβολή στο διαμεμβρανικό δυναμικό των ακινητοποιημένων κυττάρων. Στην μελέτη κάθε δραστικής ουσίας, σε κάθε μέθοδο που εφαρμόστηκε, χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικοί βιοαισθητήρες (5 επαναλήψεις) με τη μορφή σφαιριδίων και 2 επαναλήψεις για τους βιοαισθητήρες τύπου ELISA. Οι γραμμές σφάλματος των επαναλήψεων, αντιστοιχούν στα τυπικά σφάλματα απόκλισης από την τιμή του μέσου όρου των επαναλήψεων.

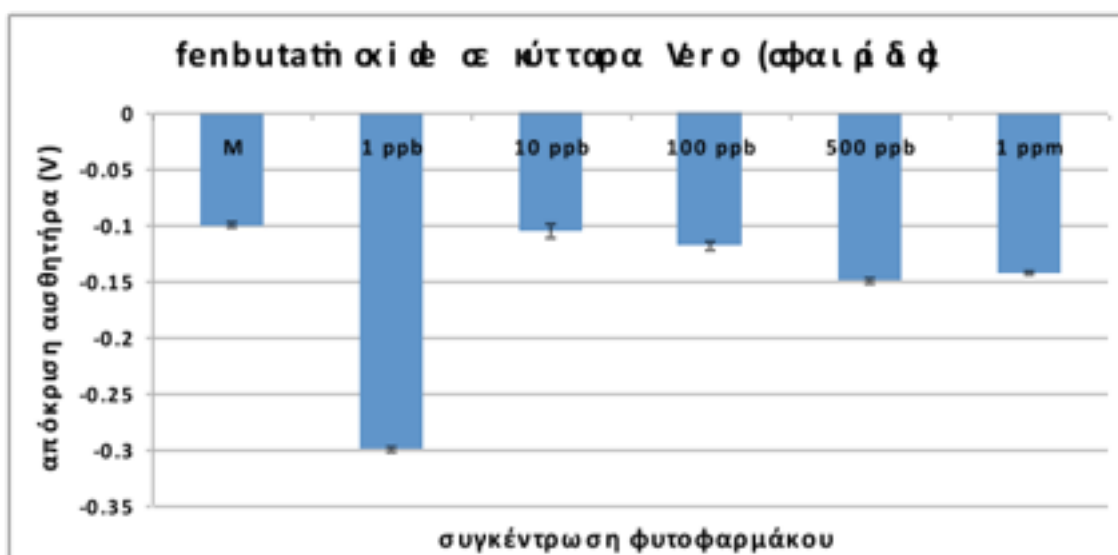
2.8.1 Αποτελέσματα απόκρισης κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς με μορφή σφαιριδίου (κύτταρα N2a, VERO και πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού)

· Απόκριση κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς στο ακαρεοκτόνο fenbutatin oxide

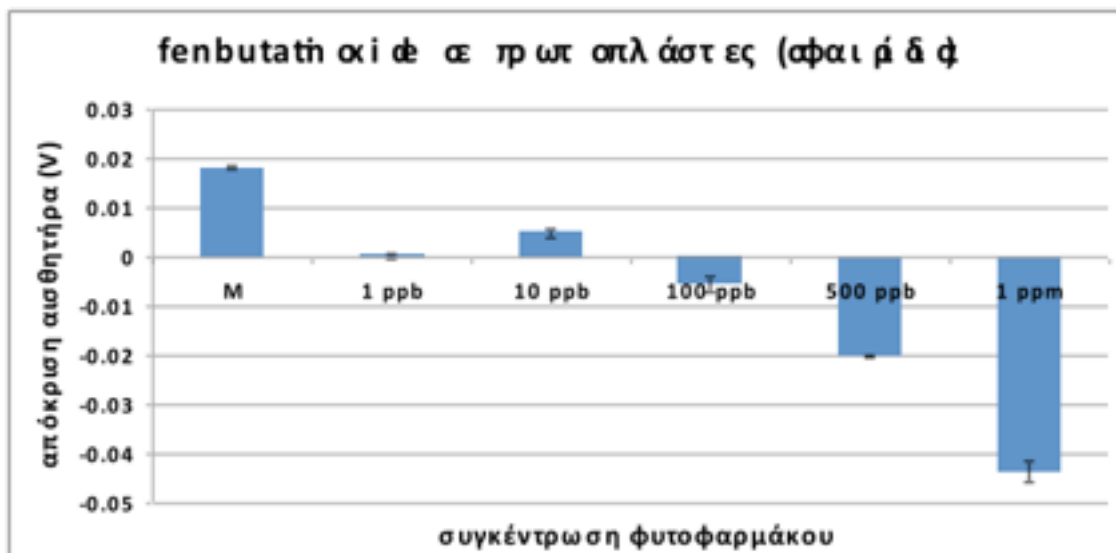
Παρατηρώντας τα διαγράμματα 1, 2 και 3 βλέπουμε ότι υπάρχει διαφοροποίηση στην απόκριση του αισθητήρα μεταξύ και των τριών κυτταρικών σειρών για τη μηδενική συγκέντρωση (μάρτυρας M) του ακαρεοκτόνου fenbutatin oxide, η οποία ανέρχεται στα -18 mV (N2a), -99 mV (Vero) και 18 mV (πρωτοπλάστες). Επιπλέον, κάθε κυτταρική σειρά αντιδρά διαφορετικά στις πέντε συγκεντρώσεις του φυτοφαρμάκου αλλά υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ των αποκρίσεων του βιοαισθητήρα για τις πρότυπες συγκεντρώσεις του ακαρεοκτόνου και των αποκρίσεων για το μάρτυρα (εξαίρεση στα VERO όπου οι τιμές απόκρισης για μάρτυρα και συγκέντρωση 10 ppb σχεδόν ίσες). Ακόμη, στην κυτταρική σειρά των πρωτοπλαστών παρατηρούνται πολύ μικρές τιμές αποκρίσεων (της τάξης των -5 mV έως 0,2 mV) για τις συγκεντρώσεις 1 ppb, 10 ppb και 100 ppb.



Διάγραμμα 1. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα N2a σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του ακαρεοκτόνου fenbutatin oxide



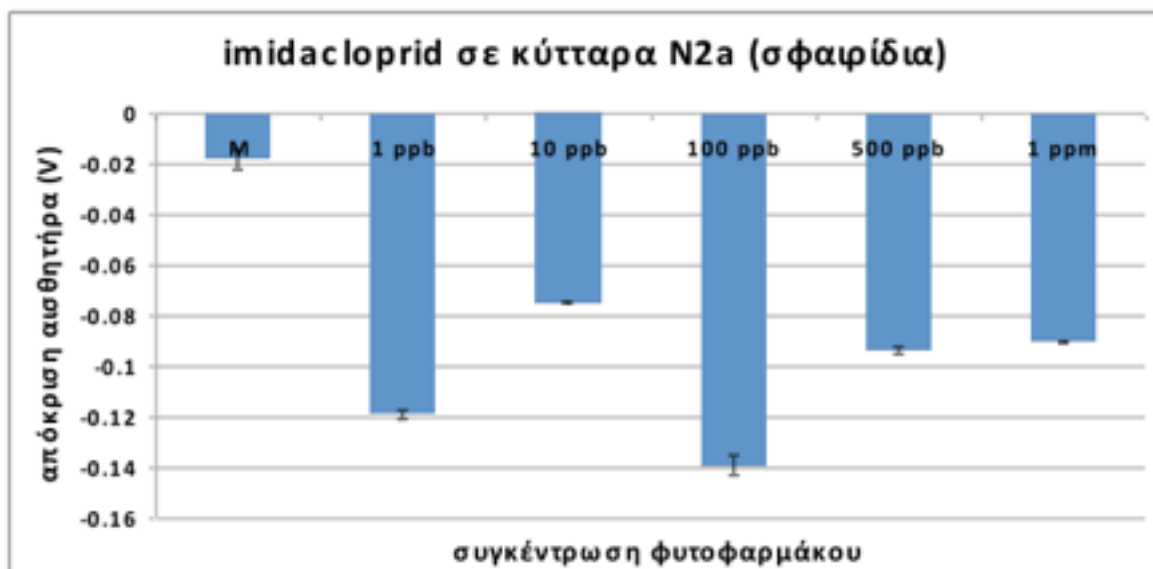
Διάγραμμα 2. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα VERO σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του ακαρεοκτόνου fenbutatin oxide



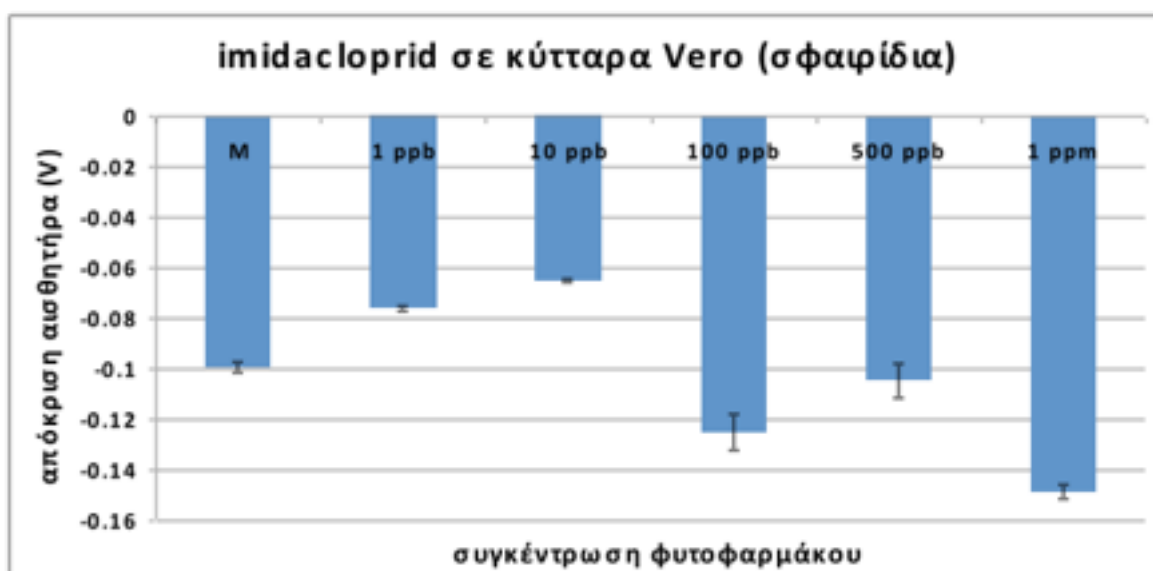
Διάγραμμα 3. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του ακαρεοκτόνου fenbutatin oxide

· Απόκριση κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς στο εντομοκτόνο imidacloprid

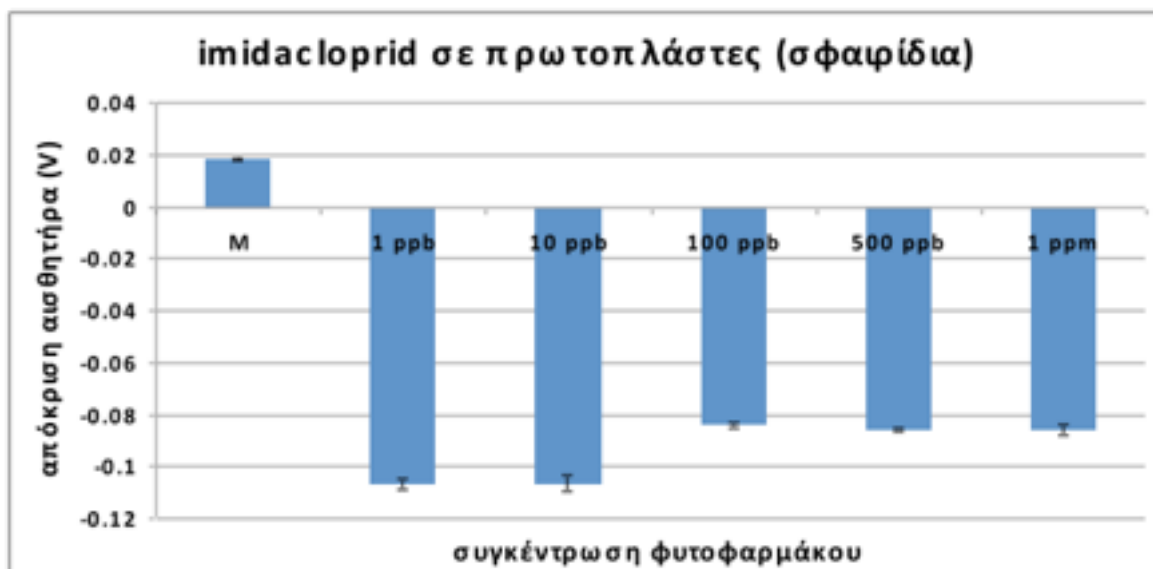
Η επίδραση του εντομοκτόνου imidacloprid προκάλεσε αρνητικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα στις επιμέρους συγκεντρώσεις με μόνη θετική απόκριση αυτή του μάρτυρα M στους πρωτοπλάστες (Διαγράμματα 4, 5 και 6). Στην περίπτωση των πρωτοπλαστών παρατηρήθηκε μεγάλη μεταβολή ανάμεσα στη μηδενική και τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις, όμως δεν υπήρξε σαφής διαχωρισμός μεταξύ αυτών (1 ppb, 500 ppb και 1 ppm) και (1 ppb και 10 ppb), (Διάγραμμα 6). Στο διάγραμμα 4 (N2a) υπάρχει μια σχετική γραμμικότητα από τη συγκέντρωση 100 ppb έως την μέγιστη 1 ppm , ενώ στο διάγραμμα 5 (Vero) δεν διαφοροποιείται σημαντικά η απόκριση του μάρτυρα από τη συγκέντρωση 500 ppb.



Διάγραμμα 4. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα N2a σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου imidacloprid



Διάγραμμα 5. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα VERO σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου imidacloprid

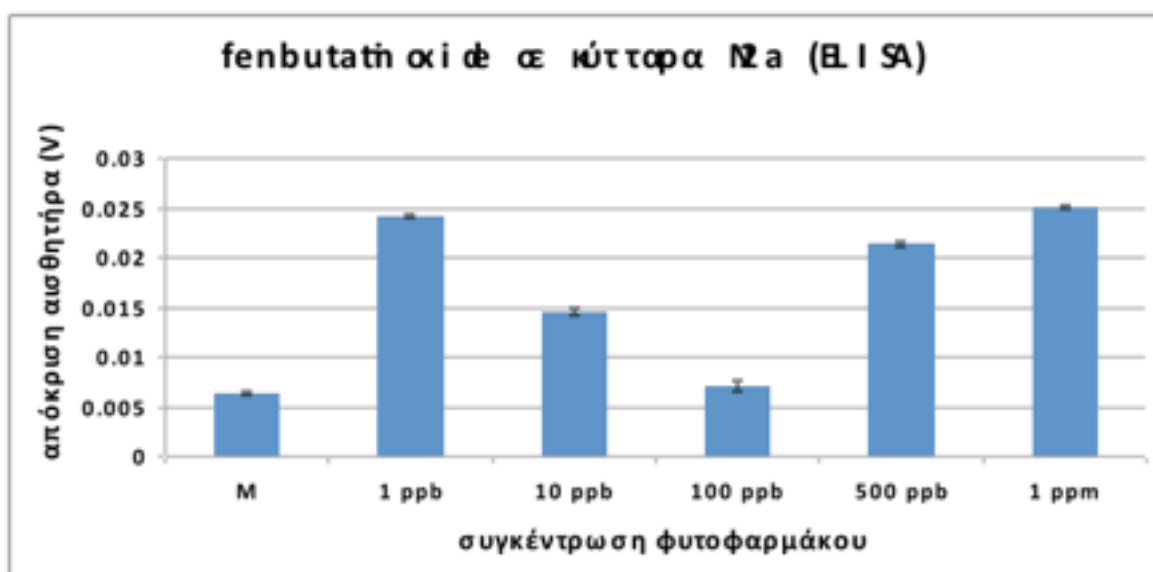


Διάγραμμα 6. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου imidacloprid

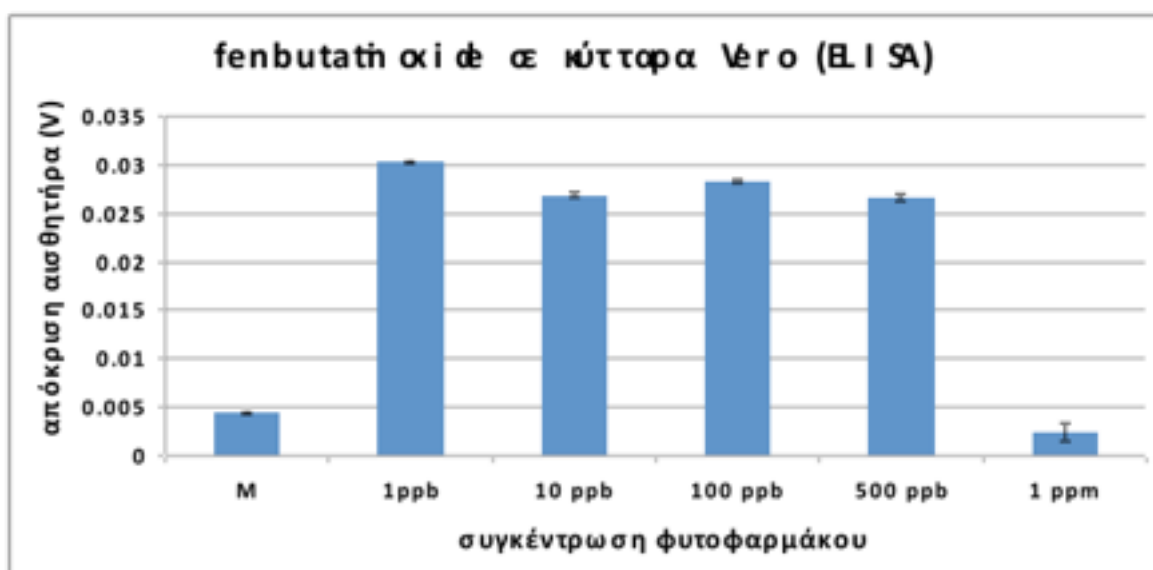
2.8.2 Αποτελέσματα απόκρισης κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς σε πλακίδιο ELISA (κύτταρα N2a, VERO και πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού)

· Απόκριση κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς στο ακαρεοκτόνο fenbutatin oxide

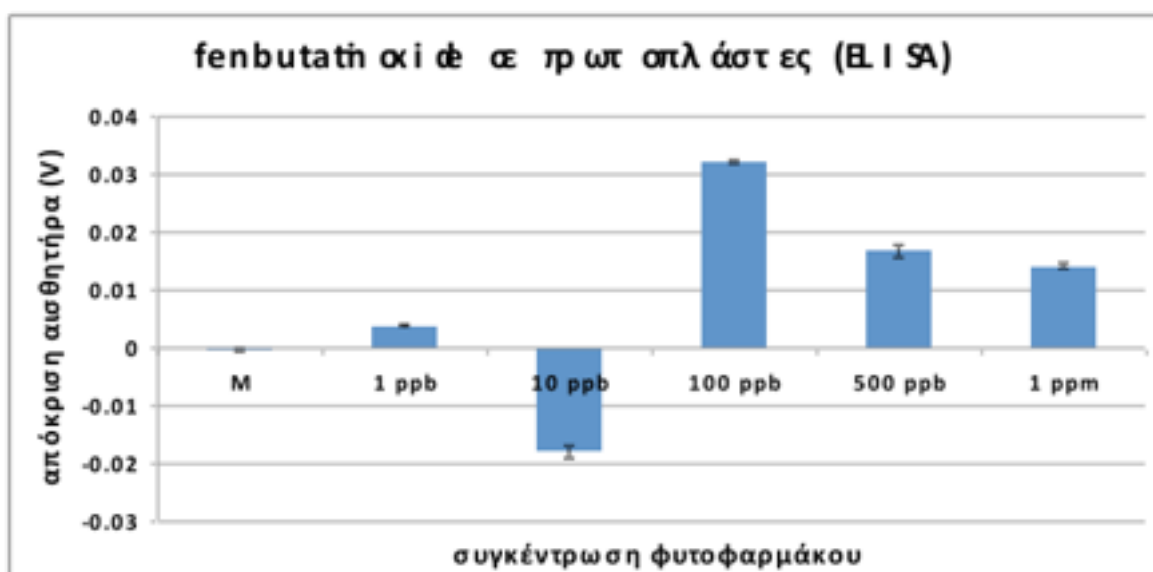
Στα διαγράμματα 7, 8 και 9 παρατηρούνται θετικές τιμές αποκρίσεων (με εξαίρεση τη συγκέντρωση 10 ppb του φυτοφαρμάκου στους πρωτοπλάστες). Στην κυτταρική σειρά των πρωτοπλαστών (διάγραμμα 9) διακρίνεται το εύρος της γραμμικότητας στην απόκριση του βιοαισθητήρα να περιλαμβάνει συγκεντρώσεις 0 (σχεδόν μηδενική τιμή απόκρισης), 100 ppb, 500 ppb και 1 ppm. Στην πιο αραιή συγκέντρωση (1 ppb) πολύ μικρή διαφοροποίηση από την απόκριση του μάρτυρα. Στο διάγραμμα 8 (κύτταρα Vero) βλέπουμε ότι υπάρχει μικρή διαφοροποίηση μεταξύ των τιμών για το μάρτυρα και τη πυκνότερη συγκέντρωση (1 ppm), ενώ στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις επίσης δεν παρατηρήθηκε σαφής διαφοροποίηση της απόκρισης μεταξύ των αλλά με σαφώς μεγαλύτερη τιμή από αυτή της μηδενικής συγκέντρωσης. Στο διάγραμμα 6 (κύτταρα N2a), παρατηρήθηκε επίσης μεγάλη μεταβολή στις αποκρίσεις μεταξύ μηδενικής και προτύπων συγκεντρώσεων, η οποία μετριάστηκε για τη συγκέντρωση 100 ppb.



Διάγραμμα 7. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα N2a σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του ακαρεοκτόνου fenbutatin oxide



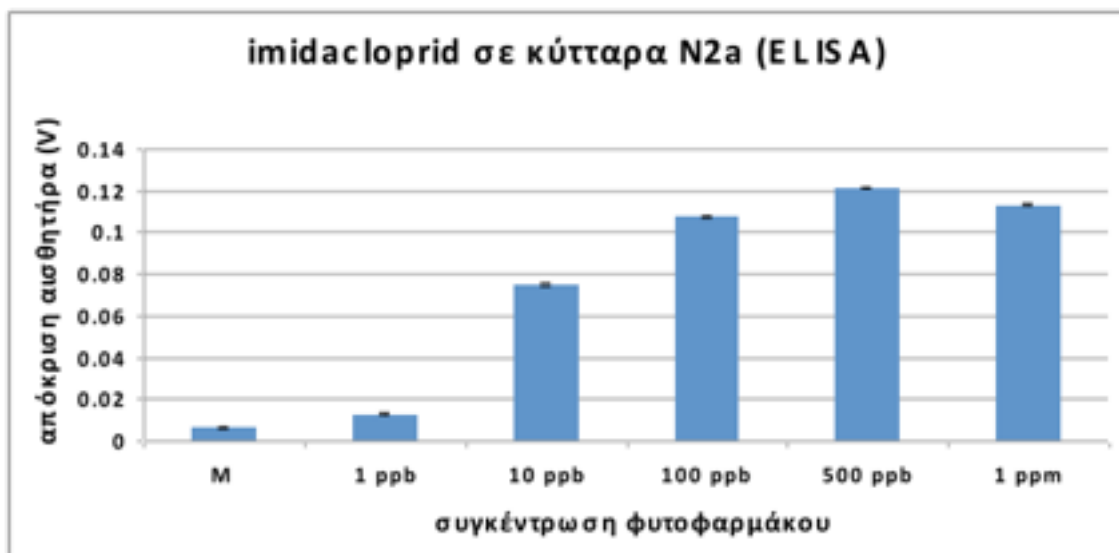
Διάγραμμα 8. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα VERO σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του ακαρεοκτόνου fenbutatin oxide



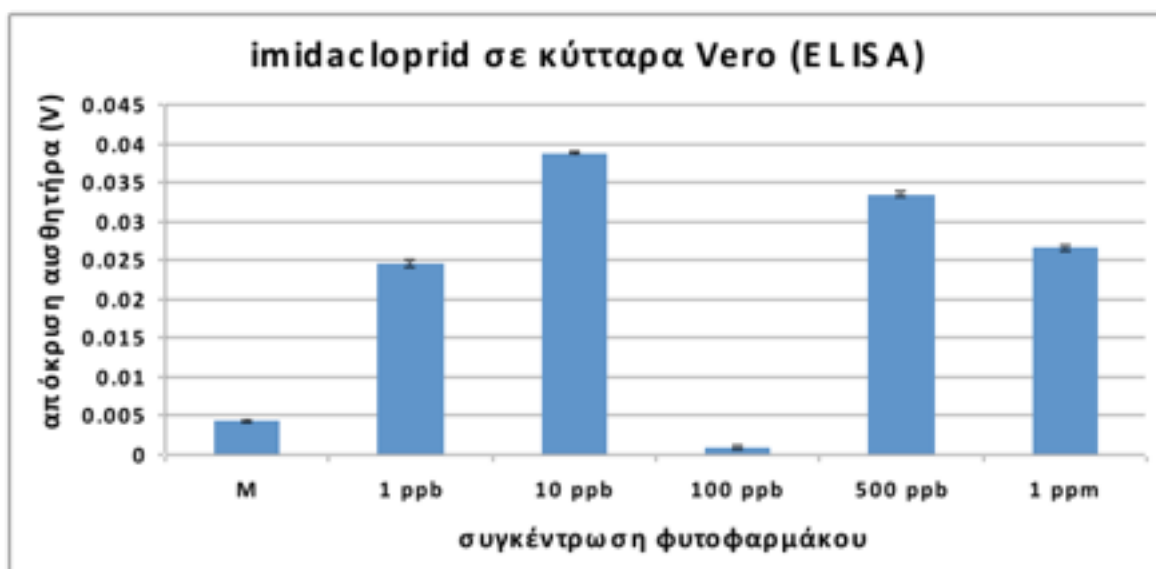
Διάγραμμα 9. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του ακαρεοκτόνου fenbutatin oxide

· Απόκριση κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς στο εντομοκτόνο imidacloprid

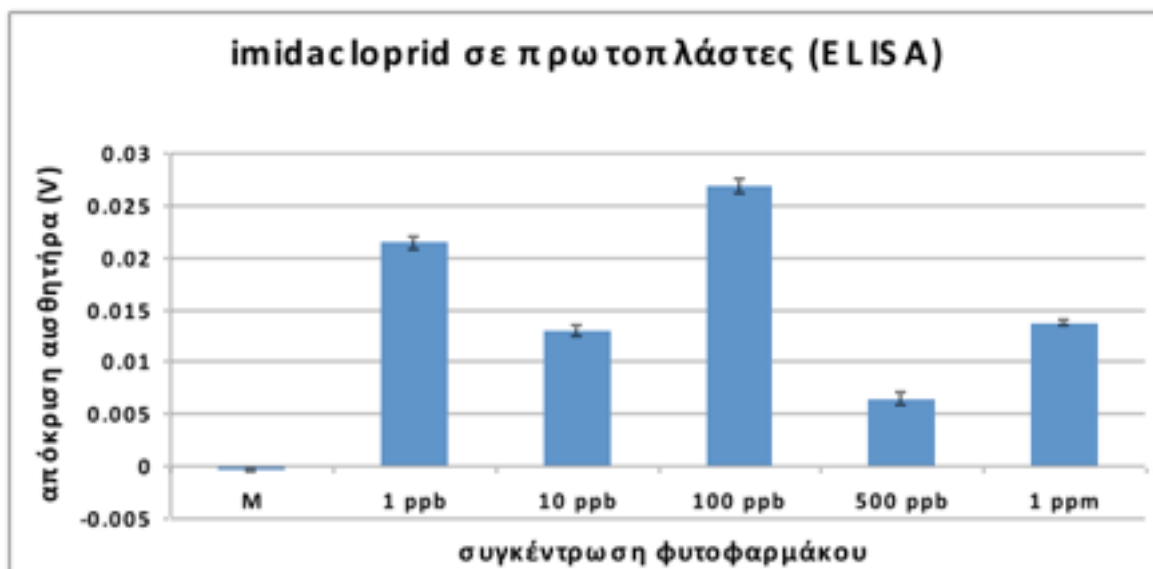
Στα διαγράμματα 10, 11 και 12 και των τριών κυτταρικών σειρών πολύ μικρές τιμές απόκρισης αισθητήρα (από -0,3 έως 6 mV). Πιο αναλυτικά, στο διάγραμμα 10 (κύτταρα N2a) παρατηρήθηκαν θετικές τιμές με μικρή μεταβολή στις αποκρίσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων 10 ppb έως 1 ppm, ενώ στη χαμηλότερη συγκέντρωση (1 ppb) η μεταβολή με τη συγκέντρωση του μάρτυρα ήταν πολύ μικρή. Παράλληλα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα για το imidacloprid, με τη χρήση κυττάρων Vero (διάγραμμα 11), παρατηρήθηκε επίσης μεγάλη μεταβολή στις αποκρίσεις μεταξύ μηδενικής και προτύπων συγκεντρώσεων (εκτός της συγκέντρωσης 100 ppb) αλλά και σε αυτή την περίπτωση δεν υπήρξε σαφής διαχωρισμός μεταξύ αυτών (από 24 έως 38 mV). Τέλος, στο διάγραμμα 12 (πρωτοπλάστες) παρατηρήθηκε σαφής διαφοροποίηση της απόκρισης μεταξύ του μάρτυρα και των συγκεντρώσεων του εντομοκτόνου χωρίς να παρουσιάζει κάποια γραμμικότητα και μέγιστη τιμή στη συγκέντρωση 100 ppb.



Διάγραμμα 10. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα N2a σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου imidacloprid



Διάγραμμα 11. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα VERO σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου imidacloprid



Διάγραμμα 12. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου imidacloprid

Γ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη κυτταρικών βιοαισθητήρων βασισμένων στην τεχνολογία BERA για την ανίχνευση της γενικής τοξικότητας που οφείλεται στην ύπαρξη υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε φυτικούς ιστούς σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, τις οποίες συναντάμε, κυρίως, σε βιολογικά συστήματα.

Τα τελευταία χρόνια, έχει σημειωθεί αυξημένη χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών, σε παγκόσμια κλίμακα, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την διεξαγωγή εντατικών και αποτελεσματικών ελέγχων σε τρόφιμα και στο νερό, για την ανίχνευση υπολειμμάτων τέτοιων ουσιών, προκειμένου να προστατευτεί η δημόσια υγεία. Συνεπώς, η ανάπτυξη γρήγορων, ευαίσθητων και αξιόπιστων μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού υπολειμμάτων τέτοιων ουσιών, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μέχρι πρόσφατα, ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των υπολειμμάτων των ουσιών αυτών, είχε περιοριστεί στην χρήση κλασσικών τεχνικών της αναλυτικής χημείας, όπως χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών. Παρόλο που οι μέθοδοι αυτοί παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία, είναι χρονοβόρες και απαιτούν την παρουσία εξειδικευμένου και έμπειρου προσωπικού, όπως επίσης και την χρήση υψηλού κόστους εξοπλισμού. Επιπλέον, δεν έχουν την ικανότητα διεξαγωγής αναλύσεων τοξικών ουσιών, επί τόπου και σε πραγματικό χρόνο. Οι περιορισμοί που χαρακτηρίζουν τις τεχνικές αυτές, οδήγησαν στην ανάγκη ανάπτυξης νέων αναλυτικών εργαλείων, που θα μπορέσουν να διεξάγουν γρήγορους, επιτόπιους και σε πραγματικό χρόνο, ελέγχους τοξικών ουσιών. Αναπτύχθηκαν πολλοί τύποι βιοαισθητήρων, οι οποίοι αποτελούν, πλέον, δυναμικά εργαλεία στα πεδία των τοξικολογικών και περιβαλλοντικών ελέγχων. Η μεγαλύτερη πρόκληση που έχουν να αντιμετωπίσουν τα βιοαναλυτικά συστήματα, είναι η ικανότητα διαχωρισμού μεταξύ ποικίλων τοξικών ουσιών. Παρόλο που οι πληροφορίες που αφορούν την γενική τοξικότητα μιας αναλυτέας ουσίας μπορεί να είναι χρήσιμες για την κατηγοριοποίηση της, είναι επίσης επιθυμητή και η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των τοξικών ουσιών που εξετάζονται, κάτι που αποδεικνύεται δύσκολο, καθώς πολλές τοξικές ουσίες προκαλούν παρόμοιες μεταβολές στο παραγόμενο σήμα.

Η χρήση κυτταρικών σειρών σε βιοαισθητήρες προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα ανάμεσα στα οποία είναι η αποφυγή της χρήσης ζώων και η δυνατότητα μεγαλύτερης ομοιογένειας μεταξύ των καλλιεργειών. Οι κυτταρικοί

βιοαισθητήρες, αποτελούν ένα τύπο βιοαισθητήρα, που διαχειρίζονται ζωντανά κύτταρα ως αισθητήρια στοιχεία. Η χρήση ζωντανών κυττάρων παρέχει υψηλή ευαισθησία σε μεγάλο εύρος βιολογικά ενεργών ουσιών που επηρεάζουν την κυτταρική λειτουργία. Χαρακτηρίζονται από γρήγορη απόκριση σε διάφορα μόρια, κατά ένα ακριβή και αναπαραγωγίσιμο τρόπο, ανάλογα με την βιολογική τους δράση και όχι τόσο βάση της δομής τους ή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, όπως συμβαίνει με τις χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές μεθόδους. Η αυξημένη τους ευαισθησία, που οφείλεται στην υψηλή βιοκαταλυτική τους δράση και η περιορισμένη ανάμειξη τους με άλλα συστατικά αποτελούν κάποια από τα πλεονεκτήματά τους. Πολλές τεχνικές έχουν προταθεί για την μέτρηση της βιολογικής απόκρισης των κυτταρικών βιοαισθητήρων. Μεταβολές στην συμπεριφορά των κυττάρων, στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, στον μεταβολισμό των κυττάρων ή παράγοντες που προκαλούν τη θανάτωση των κυττάρων ύστερα από έκθεση σε κάποια νευροτοξική ουσία, μπορούν να μετρηθούν και να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο παρουσίας τοξικών ουσιών και για την ταυτοποίηση τους. Νευροτοξικές χημικές ουσίες μπορούν να ανιχνευτούν, μελετώντας την λειτουργία ενεργών νευρικών δικτύων, με την χρήση διατάξεων μικροηλεκτροδίων. Μεταβολές στην ηλεκτρική δραστηριότητα των νευρικών κυττάρων, μπορούν να μετρηθούν κατά την έκθεση των νευρώνων σε διάφορες νευροτοξικές ουσίες.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικοί βιοαισθητήρες 5^{ης} γενιάς και έγινε εφαρμογή της μεθόδου βιοηλεκτρικής αναγνώρισης (BERA). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές και κατασκευάστηκαν δυο μορφές κυτταρικού αισθητήρα. Συνολικά μελετήθηκαν δύο ουσίες, ακαρεοκτόνο και νεονικοτινοειδές εντομοκτόνο, για τη μέτρηση της μεταβολής στο ηλεκτρικό δυναμικό των κυττάρων, που προκάλεσε η παρουσία τοξικών ουσιών, και χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της κυτταρικής απόκρισης στις ουσίες αυτές.

Αναλυτικότερα, τα νευρικά κύτταρα νευροβλαστώματος (N2a) είναι ηλεκτρικά ενεργά και έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές μορφολογικές και βιοχημικές μελέτες (Borkholder 1998), ενώ ευρήματα προηγούμενων μελετών έδειξαν ότι οργανοφωσφορικά και καρβαμικά εκδήλωσαν επιλεκτική δράση στα κύτταρα αυτά (Flaskos et al. 1998). Εκφράζουν τις κύριες οικογένειες τασο-ελεγχόμενων καναλιών, (Na^+ , Ca^{2+} και K^+), που αποκρίνονται σε μεγάλη ποικιλία παρεμποδιστών ιοντικών καναλιών, συμπεριλαμβανομένου και των συνθετικών πυρεθρινών, (παρεμποδιστές των ιοντικών καναλιών Na^+), των αβερμεκτινών, (παρεμποδιστές των ιοντικών καναλιών Ca^{2+}), των

οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων, (αναστολείς του νευροδιαβιβαστή GABA) και των καρβαμιδικών εντομοκτόνων, (παρεμποδιστές του ενζύμου AChE). Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο BERA 5^{ης} γενιάς και για τις δύο μορφές (σφαιρίδια και πλακίδια elysa), τα αποτελέσματα που προέκυψαν επιτρέπουν την εκτίμηση ότι η έκθεση κυττάρων N2a τόσο στο ακαρεοκτόνο fenbutatin oxide όσο και στο εντομοκτόνο imidacloprid, (διαγράμματα 1, 4, 7 και 10), παρουσίασε διαφορά στις αποκρίσεις των αισθητήρων μεταξύ προτύπων συγκεντρώσεων και μάρτυρα, αλλά και αρκετά σαφείς διαφοροποιήσεις για όλες τις επιμέρους συγκεντρώσεις.

Τα κύτταρα VERO αποτελούν κύτταρα προερχόμενα από νεφρικά κύτταρα του αφρικάνικου πράσινου πιθήκου *Cercopithecus aethiops* που συνιστώνται για τον εντοπισμό της κυτταροτοξικότητας in vitro. Χρησιμοποιώντας, παρομοίως όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τη μέθοδο BERA, για το ακαρεοκτόνο fenbutatin oxide στη μορφή σφαιριδίου (διάγραμμα 2) δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές αποκλίσεις στις τιμές απόκρισης (εκτός της συγκέντρωσης 1 ppb), με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο σαφής διαχωρισμός των διαφορετικών συγκεντρώσεων του φυτοφαρμάκου. Τα ίδια περίπου παρατηρούνται και στη μορφή πλακιδίου (διάγραμμα 8), εκτός της συγκέντρωσης 1 ppm, αλλά με σαφή διαχωρισμό μεταξύ προτύπων συγκεντρώσεων και μάρτυρα. Για το εντομοκτόνο imidacloprid (διαγράμματα 5 και 11) και για τις περισσότερες συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων, παρατηρούνται διαφοροποιημένες αποκρίσεις (κυρίως στη μορφή πλακιδίου).

Οι πρωτοπλάστες της μελέτης αυτής, είναι φυτικά κύτταρα στα οποία έγινε λύση του κυτταρικού τοιχώματος ώστε να υπάρχει άμεση πρόσβαση στην κυτταρική μεμβράνη και προέρχονται από φύλλα καπνού *Nicotiana tabacum* (ποικιλίας Samsun). Η απόκριση των κυττάρων αυτών στο ακαρεοκτόνο fenbutatin oxide (διαγράμματα 3 και 9), προκάλεσε μια σχετικά γραμμική μεταβολή του δυναμικού των κυττάρων, ενώ και στις δύο μορφές αισθητήρα παρατηρήθηκε σαφής διαχωρισμός των προτύπων διαλυμάτων μεταξύ τους και σε σχέση με τον μάρτυρα. Οσον αφορά την απόκριση των πρωτοπλαστών στο εντομοκτόνο imidacloprid, για τη μορφή σφαιριδίου (διάγραμμα 6), παρατηρείται σαφής διαχωρισμός μεταξύ προτύπων συγκεντρώσεων και μάρτυρα αλλά όχι μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων της ουσίας. Αντιθέτως, για τη μορφή πλακιδίου (διάγραμμα 12), παρατηρούνται μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις για όλες τις επιμέρους συγκεντρώσεις ώστε να είναι δυνατός ο σαφής διαχωρισμός τόσο μεταξύ τους όσο και με το μάρτυρα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας αλλά και παλιότερων μελετών, χρησιμοποιούνται κυρίως αισθητήρες BERA βασισμένοι σε νευρικά κύτταρα (όπως κύτταρα νευροβλαστώματος N2a) για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη μέτρηση της παρεμπόδισης της κυτταρικής ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) ως προς την ικανότητα της να υδρολύει την ακετυλοχολίνη (ACh) προς οξικό οξύ και χολίνη. Η παρουσία υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων ανιχνεύεται από το βαθμό της παρεμπόδισης της κυτταρικής AChE, ο οποίος είναι αντίστροφα ανάλογος με τη συγκέντρωση της ACh. Η ACh είναι ένας διεγέρτης-νευρομεταβιβαστής, η ενεργότητα του οποίου ρυθμίζεται από την AChE. Επομένως, η παρεμπόδιση της AChE μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη διέγερση του κυττάρου μέσω της ACh, η οποία μπορεί να μετρηθεί λόγω της υπερπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης. Με άλλα λόγια, η παρεμπόδιση της AChE από τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων στο δείγμα θα οδηγήσει σε εκτεταμένη διέγερση των νευρικών κυττάρων από την ACh, η οποία περαιτέρω θα προκαλέσει την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης πάνω από ένα προκαθορισμένο κατώφλι.

Ωστόσο δεν πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός ότι το ασβέστιο αποτελεί το σημαντικότερο ίσως σήμα που συνοδεύει μια τεράστια ποικιλία βιοχημικών αντιδράσεων. Τα ιόντα ασβεστίου λειτουργούν σαν ένας δευτερογενής αγγελιοφόρος για ποικίλες κυτταρικές διεργασίες (Berridge 1998). Η αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου σχετίζεται με την είσοδο των ιόντων μέσω τασοελεγχόμενων διαύλων καθώς και με την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από τα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Εφόσον το ασβέστιο αποτελεί ένα ενδοκυτταρικό ρυθμιστικό σήμα το οποίο αφορά μεγάλο αριθμό κυτταρικών λειτουργιών, αλλαγές στη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού, πιθανόν να αποτελούν ενδεικτικές αποκρίσεις των κυττάρων στο stress. Είναι επίσης γνωστό ότι η συστολή κυττάρων μέσα σε κολλαγόνο (κυρίως ινοβλαστών) έχει ως αποτέλεσμα την εισροή ιόντων ασβεστίου η οποία επάγει το cAMP και το φωσφατιδικό οξύ μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης D (He and Grinnell 1995). Συχνά, τα σήματα ασβεστίου συνοδεύουν την μίτωση και φαίνεται ότι οι αυξομειώσεις τους αποτελούν χαρακτηριστικό του μιτωτικού σταδίου (Whitaker 1997). Οι Wang et al. (2002) παρατήρησαν ότι η μείωση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου σχετίζεται με το θάνατο κυττάρων νευροβλαστώματος ενώ σύμφωνα με τους Kintzios et al. (2006) η αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου μπορεί να σχετίζεται με τον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό ακινητοποιημένων κυττάρων μόνο όταν τα κύτταρα είναι ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια.

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους και με βάση τα αποτελέσματα της εργασίας, συμπεραίνεται ότι η χρήση του πλακιδίου ELISA δίνει πιο σαφή αποτελέσματα όσον αφορά τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των δραστικών ουσιών. Η συγκεκριμένη μέθοδος δίνει τη δυνατότητα σε έναν βιοαισθητήρα να εξάγει, για το ίδιο χρονικό διάστημα όπως και στη μέθοδο του σφαιριδίου, περισσότερες μετρήσεις. Επιπλέον, ένα πλακίδιο μπορεί να περιέχει διαφορετικούς τύπους κυττάρων αλλά και να ανιχνεύονται στον ίδιο βιοαισθητήρα διαφορετικά φυτοφάρμακα. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η επιλεκτικότητα και ο βαθμός επαναληψιμότητας της αρχής λειτουργίας της Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (BERA).

Η χρήση ζωντανών κυττάρων για γρήγορες και εξειδικευμένες μελέτες ανίχνευσης τοξικών ουσιών αποτελεί ένα πεδίο συνεχώς αυξανόμενου ενδιαφέροντος. Η σημασία της μεθόδου BERA στην ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών έγκειται στο γεγονός ότι παρέχει τρία σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης:

1. Η υψηλή ταχύτητα ανάλυσης (3 min έναντι μίας ημέρας)
2. Η υψηλή ευαισθησία (δυνατότητα ανίχνευσης έως και ενός μέρους στο τρισεκατομμύριο δηλαδή 1 ppt)
3. Το χαμηλό κόστος ανάλυσης (30-60€ έναντι 100-220€)
4. Η δυναμικότητα της μεθόδου (χιλιάδες αναλύσεις/ημέρα έναντι δεκάδων/ημέρα)
5. Ο εύχρηστος χρησιμοποιούμενος εξοπλισμός (φορητός)

Το κυριότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι οι κυτταρικοί αισθητήρες αντιμετωπίζουν το πρόβλημα του ακριβούς προσδιορισμού της φύσης των εξεταζόμενων ουσιών. Για αυτόν τον λόγο, στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές σειρές κυττάρων έτσι ώστε να επιτευχθεί αύξηση της επιλεκτικότητας της μεθόδου, αφού κάθε κυτταρική σειρά μπορεί να έχει διαφορετική απόκριση στα υπό ανάλυση φυτοφάρμακα. Μελλοντικά πολλές εφαρμογές θα επωφεληθούν από τη χρήση παράλληλων συστημάτων που θα επιτρέπουν ταυτόχρονες μετρήσεις σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές. Η ανάπτυξη ενός τέτοιου συστήματος θα προσφέρει βελτιώσεις τόσο στο εύρος της ευαισθησίας όσο και στην ικανότητα διάκρισης και ταξινόμησης των αναλυτέων ουσιών.

Τα τελευταία 25 χρόνια γίνεται αναφορά στην χρήση ολόκληρων κυττάρων ως αισθητήρια στοιχεία αναλυτικών συστημάτων. Οι ερευνητικές δραστηριότητες στο πεδίο

των κυτταρικών βιοαισθητήρων έχουν σημειώσει ραγδαία εξέλιξη. Παρόλα αυτά πολύ λίγες διατάξεις κυτταρικών βιοαισθητήρων έχουν χρησιμοποιηθεί στο εμπόριο. Τα βακτηριακά κύτταρα αποτελούν πολύ διαδεδομένο βιολογικό υλικό ανίχνευσης των κυτταρικών βιοαισθητήρων. Βελτιώσεις στις συνθήκες αποθήκευσης των ζωικών κυττάρων, αναμένεται να ενισχύσει την εξαγωγή των κυτταρικών βιοαισθητήρων στο εμπόριο για την χρήση τους σε φαρμακευτικούς και ιατρικούς ελέγχους, υψηλής πιστότητας. Αυτό μπορεί να προκύψει από τα βελτιωμένα υποστρώματα ακινητοποίησης ή από την ανάπτυξη καινοτόμων συστημάτων που θα απαρτίζονται από μικροαισθητηριακές διατάξεις, ικανές να μετρήσουν φυσικοχημικές παραμέτρους των καλλιεργούμενων κυττάρων. Επίσης, η ανάπτυξη μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών, με εξειδίκευση σε επιθυμητές ουσίες στόχους, έχειδειχθεί ότι μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία βιοαισθητήρων με μηδενικά λανθασμένα αρνητικά ή λανθασμένα θετικά αποτελέσματα.

Ειδικότερα όσον αφορά την τεχνολογία BERA και στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, η χρήση διαφορετικών κυτταρικών σειρών μπορεί να προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών δραστικών ουσιών σε ένα δείγμα. Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να αναπτυχθεί για ένα μεγάλο πεδίο εφαρμογών όπως είναι: η ασφάλεια τροφίμων, οι τομείς της γεωργίας, ιατρικής και άμυνας, όπως φυσικά και σε ένα ευρύ φάσμα έρευνας για θέματα περιβάλλοντος.

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Addor R. W., Godfrey C. R. A.** (1995). *Agrochemicals from Natural Products*. Marcell Dekker, Inc., NY
- Alocilja E. C., Radke S. M.** (2003). Market analysis of biosensors for food safety. *Biosens. Bioelectron.* **18**: 841-846
- Argiriou A. A.** (2004). Semiconductor sensors, thermal sensors, mechanical, magnetic, radiant sensors and chemical sensors
- Assman S. M., Haubrick L.L.** (1996). Transport proteins of the plant plasma membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 458
- Beadle D.** (1999). *Progress in Neuropharmacology and Neurotoxicology of Pesticides and Drugs*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK
- Bedair S. S., Fedder G. K.** Microcantilever Gas Chemical Sensors with Multi-modal Capability
- Bedioui F.** (1999). Foreword. *Analysis* **27**: 555-557
- Berridge M. J.** (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**: 13-26
- Bickerstaff G. F.** (1997). *Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana Press, Totowa, NJ
- Borkholder D. A.** (1998). Cell based biosensors using microelectrodes. pp. 1-129
- Chambers J. E., Levi P. E.** (1992). *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects*. Academic Press, Inc., NY, USA
- Chaplin M.** (2004). *Immunosensors*. London South Bank University
- Corbertt J. R., Hartley G. S., Baillie A. C.** (1984). *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*. 2nd edn. Academic Press, Inc., NY, USA
- Cremlyn R. J.** (1991). *Agrochemicals: Preparation and Mode of Action*. John Wiley and Sons, UK
- Cupta R. C.** (2005). *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Pesticides*. Academic Press, Inc., NY, USA
- Daunert S., Barrett G., Feliciano J. S., Shetty R. S., Shrestha S., Smith-Spencer W.** (2000). Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chem. Rev.* **100**: 2705-2738
- DeBusschere B. D.** (2002). *Portable Cell-Based Biosensors*
- Eggins B. R.** (2002). *Chemical sensors and biosensors. Medical and Biological Applications*
- Flampouri K., Mavrikou S., Kintzios S., Miliadis G., Aplada-Sarlis P.** (2009). Development and validation of a cellular biosensor detecting pesticide residues in tomatoes. *Talanta* **80**: 1799-1804
- Flaskos J., McLean W. G., Fowler M. J., Hargeaves A. J.** (1998). Tricrecyl phosphate inhibits the formation of axon-like processes and disrupts neurofilaments in cultured mouse N2a and rat PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **242**: 101-104
- Fraden J.** (2004). *Third Edition of Handbook of Modern Sensors: physics, designs, and applications*, Chapter 1
- Frossyniotis D., Anthopoulos Y., 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
- 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**: 114-120
- Gilchrist K. H.** (2003). Characterization and validation of cell-based biosensors. pp. 1-134

- Guilbalt G. C., Hock B., Schmidt R.** (1992). Biosensors Bioelectronics **7**: 411-419
- He Y., Grinnell F.** (1995). Role of phospholipase D in the cAMP signal transduction pathway activated during fibroblast contraction of collagen matrices. *J Cell Biol.* **130**(5): 1197-1205
- Hock B., Seifert K., Kramer K.** (2002). Engineering receptors and antibodies for biosensors. Department of Botany, Technical University of Muenchen, Germany. *Biosens. Bioelectron.* **17**: 239-249
- <http://academic.scranton.edu/faculty/CANNM1/biochemistry/biochemistrymodule.html>
- http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm
- <http://www.alanwood.net/pesticides/>
- <http://www.gregalo.com/neuralnets.html>
- <http://www.jaist.ac.jp/~yokoyama/images/biosensor.gif>
- Hulanicki A., Glab S., Ingman F.** (1991). Chemical Sensors – Definitions and classifications. *International Union of Pure and Applied Chemistry* **63**: 1247-1250
- Jacobson R. J., Croft P., Fenlon J.** (1999). Response to fenbutatin oxide in populations of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) in UK protected crops. *Crop Protection* **18**: 47-52
- Keusgen M.** (2002). Biosensors: new approaches in drug discovery. *Naturwissen schaften* **89**: 433-444
- Kintzios S., Pistola E., Panagiotopoulos P., Bomsel M., Alexandropoulos N., Bem F., Ekonomou G., Biselis J., Levin R.** (2001). Bioelectric Recognition Assay (BERA). *Biosensors and Bioelectronics* **16**: 325-336
- Kintzios S., Pistola E., Konstas J., Bem F., Matakidis Th., Alexandropoulos N., Biselis I., Levin R.** (2001). The application of the bioelectric recognition assay for the detection of human and plant viruses: definition of operational parameters. *Biosensors and Bioelectronics* **16**: 467-480
- 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. *Biosensors and Bioelectronics* **20**: 906-915
- 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. *Biosensors and Bioelectronics* **21**: 1365-1373
- Kintzios S.** (2006). Next Generation Cell Sensor For Virus Identification-Field Based Assays. *Biodetection Technologies. 3rd Edition Proceedings* **1**: 7-32
- Kintzios S.** (2007). Cell-Based Biosensors in Clinical Chemistry. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **7**: 1019-1026
- Κλώνης Ι.** (1997). Ενζυμική Βιοτεχνολογία. Ιδρυμα Τεχνολογίας και Ερευνας. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης
- Lambrechts M., Sansen W. M. C.** (1992). An introduction to microelectrochemical sensors. *Biosensors: Microelectrochemical Devices*
- Leahey J. P.** (1985). The Pyrethroid Insecticides. Taylor and Francis, London, UK
- Makinwa K.** (2008). Electronic Instrumentation Laboratory / DIMES, Delft University of Technology. Sensors for wireless sensor networks
- Malhotra B. D., Chaubey A.** (2003). Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sensors and Actuators B: Chemical* **91**: 117-127

- Μαρινοπούλου Ι.** (2005). Ανάπτυξη κυτταρικού βιοαισθητήρα για τη μέτρηση του υπεροξειδίου του οξυγόνου και μελέτη της κυτταροδιαίρεσης και φυσιολογικών παραμέτρων συσχετιζόμενων με αυτήν. Μεταπτυχιακή μελέτη ΓΠΑ
- Μαρμάρας Β., Λαμπροπούλου-Μαρμάρα Μ.** (2005). Βιολογία Κυττάρου. 5η Έκδοση. Τυποrama. Πάτρα
- Martinoia S., Massobrio G., Lorenzelli L.** (2005). Modeling ISFET microsensor and ISFET – based Microsystems: A review. *Seroscand Actuators B: Chemical* **105**: 14-27
- Mavrikou S., Flampouri K., Moschopoulou G., Mangana O., Michaelides A., Kintzios S.** (2008). Assessment of Organophosphate and Carbamate Pesticide Residues in Cigarette Tobacco with a Novel Cell Biosensor. *Sensors* (in press)
- Mehvar M., Abdi M.** (2004). Recent developments, characteristics and potential applications of electrochemical biosensors. *Analytical sciences* **20**: 1113-1126
- Middelhoek S., Noorlag D. J. W.** (1981). Signal conversion in solid-state transducers. *Sensors and Actuators* **2**: 211-228
- 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. *Analytica Chimica Acta* **573-574**: 90-96
- Moschopoulou G., Papanastasiou I., Makri O., Lambrou N., Economou G., Soukouli K., Kintzios S.** (2007). Cellular redox-status is associated with regulation of frond division in *Spirodela polyrrhiza*. *Plant Cell Rep.* **26**: 2063-2069
- 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. *Biosensors and Bioelectronics* **24**: 1033-1036
- Μπλούχος Π.** (2009). Ανάπτυξη κυτταρικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων χρησιμοποιούμενων στην καταπολέμηση εχθρών των εσπεριδοειδών. Μεταπτυχιακή μελέτη ΓΠΑ
- Owicki J. C., Parce J. W.** (1991). Biosensors based on the energy metabolism of living cells: The physical chemistry and cell biology of extracellular acidification. *Biosens. Bioelectron.* **7**: 255-272
- Pantoja R., Nagaraj J. M., Starace D. M., Melosh N. A., Blunck R., Bezanilla F., Iteath J. R.,** (2004). Silicon chip-based patch-clamp electrodes integrated with PDMS microfluidics. *Biosens. Bioelectron.* **20**: 509-517
- Πιστολά Ε.** (2003). Μηχανισμοί της Βιοηλεκτρικής Μεθόδου Αναγνώρισης (BERA) και εφαρμογές (με έμφαση στην Ιολογία). Μεταπτυχιακή μελέτη ΓΠΑ
- Rainina E., Efremenco E., Varfolomeyev S., Simonian A. L., Wild J.** (1996). The development of a new biosensor based on recombinant *E. coli* for the direct detection of organophosphorus neurotoxins. *Biosens. Bioelectron.* **11**: 991-1000
- Ramakrishna S., Lala N. L., Garudadhvaj H., Ramaseshan R., Ganesh V. K.** Polymer Nanofibers for Biosensor Applications **15**: 377-392
- Robbens J., Maras M., Laureyn W., Blust R., De Coen W.** (2005). Whole cell biosensors for (eco) toxicity screening: alternatives for the future. *NSTI-Nanotech* **1**: 497-500
- Rodriguez-Mozaz S., Marco M. P., Lopez de Alda M. J., Barcelo D.** (2004). Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**: 588-598
- Rogers K. R., Gerlach C. L.** (1996). A Status Report on Biosensors for Ecological and Human Exposure Assessment. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 486-491

- Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Κ. Α., Γαλάτης Β., Γανωτάκης Δ., Γκανή-Σπυροπούλου Κ., Καραμπουρνιώτης Γ., Κοτζαμπάσης Κ., Κωνσταντινίδου Ε. Ι., Μανέτας Ι.** (2003). Φυσιολογία Φυτών: από το μόριο στο περιβάλλον. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο Κρήτης
- Souza S. F.** (2001). Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **16**: 337-353
- Stein W. D.** (1990). Channels, Carriers, and Pumps: An Introduction to Membrane Transport. New York: Academic Press
- Stenersen J.** (2004). Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology. CRC Press, LLC, Boca Raton, Florida, USA
- Stenger D. A., Gross G. W., Keefer E. W., Schaffer K. M., Andreadis J. D., Ma W., Pancrazio J. J.** (2001). Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors. *Trends in Biotechnology* **19**: 304-309
- Taylor R. F., Schultz J. S.** (1996). Introduction to chemical and biological sensors. *Handbook of Chemical and Biological Sensors*
- Thevenot D. R., Toth K., Durst R., Wilson G. S.** (1999). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* **71**: 2333
- Wang Z., Hamman M. A., Huang S. M., Lesko L. J., Hall S. D.** (2002). Effect of St John's work on the pharmacokinetics of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther.* **1(66)**: 411-413
- Whitaker J. O.** (1997). Field guide to North American mammals. In: *National Audobon Society*. 2nd Edition. Alfred A. Knopf, Inc., New York, NY
- Xi-Liang Luo, Jing-Juan Xu, Wei Zhao, Hong-Yuan Chen** (2004). A novel glucose ENFET based on the special reactivity of MnO₂ nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* **19**: 1225-1300
- Yamamoto I., Casida J. E.** (1999). Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany
- Zieziulewicz T. J., Unfricht D. W., Hadjout N., Lynes M. A., Lawrence D. A.** (2003). Shrinking the Biologic world – Nanobiotechnologies for toxicology. *Technological sciences* **74**: 235-244
- Ζιώγας Β., Μαρκόγλου Α.** (2007). Γεωργική Φαρμακολογία. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. Εκτυπωτική Αττικής. Αθήνα

