



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΥΜΒΑΤΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΓΙΑ
ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Ν. ΨΥΧΟΓΥΙΟΣ, MD

ΙΑΤΡΟΣ - ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΟΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ

Επιβλέπων

Ν ΤΖΑΜΤΖΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2015

Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται σε όλους εκείνους γνωστούς και άγνωστους, επιστήμονες και ερευνητές, που προσπαθούν να ζεύξουν τις επιστήμες για την πρόοδο της ανθρώπινης υγείας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΥΜΒΑΤΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΓΙΑ
ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

**ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Ν. ΨΥΧΟΓΥΙΟΣ, MD
ΙΑΤΡΟΣ - ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΟΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ν. Τζαμτζής, Αν. Καθηγητής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

N. Τζαμτζής, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ
Δ. Νικολέλης, Καθηγητής ΕΚΠΑ
Σ. Λιοδάκης, Καθηγητής ΕΜΠ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

N. Τζαμτζής, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ
Δ. Νικολέλης, Καθηγητής ΕΚΠΑ
Σ. Λιοδάκης, Καθηγητής ΕΜΠ
Α. Παπά, Αναπλ. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π
Κ. Κορδάτος, Αναπλ. Καθηγητής Ε.Μ.Π
Κ. Μεθενίτης, Αναπλ. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α
Ν. Ψαρουδάκης, Επικ. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανωτάτη Σχολή Χημικών Μηχανικών του
Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

N.5343/1932, Άρθρο 202

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	11
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	13
ABSTRACT.....	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	17
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....	25
1.1 Η έννοια του αισθητήρα.....	27
1.2 Αρχές λειτουργίας αισθητήρων.....	29
1.3 Αισθητήρες στους φυσικούς οργανισμούς. Κυτταρικές μεμβράνες και ο ρόλος τους στην αναγνώριση χημικών ενώσεων.....	31
1.4 Κανάλια Ιόντων	37
1.5 Είδη Βιοαισθητήρων.....	39
1.5.1 Αισθητήρες με βάση το μεταλλάκτη.....	40
1.5.2 Αισθητήρες με βάση τον παράγοντα αναγνώρισης – Βιοαισθητήρες.....	44
1.6 Πλεονεκτήματα Βιοαισθητήρων έναντι Κλασσικών χημικών αισθητήρων.....	49
1.7 Αρχές που διέπουν την κατασκευή του Βιοαισθητήρα.....	51
1.8 Εφαρμογές των βιοαισθητήρων.....	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΔΙΣΤΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ MEMBRANΩΝ	57
2.1 Ορισμός – Γενικές αρχές	59
2.2 Αρχές Λειτουργίας των Διστρωματικών Λιπιδικών Μεμβρανών.....	61
2.3 Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα βιοαισθητήρων με συνθετικές διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες έναντι φυσικών μεμβρανών	63

2.4	Υλικά Σχηματισμού Συνθετικών Διστρωματικών Λιπιδικών Μembrανών.....	66
2.5	Τεχνικές Σχηματισμού μη υποστηριζόμενων Συνθετικών Διστρωματικών Λιπιδικών Μembrανών.....	69
2.5.1	Τεχνική της ψύκτρας.....	69
2.5.2	Τεχνική του Langmuir – Blodgett.....	69
2.5.3	Τεχνική σχηματισμού λιποσωμάτων (σφαιρικές διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες)	71
2.6	Υποστρώματα Συνθετικών Διστρωματικών Λιπιδικών Μembrανών.....	73
2.6.1	Λιπιδικές μεμβράνες μεταλλικής επιφάνειας.....	73
2.6.2	Λιπιδικές μεμβράνες υποστηριζόμενες σε φίλτρα.....	74
2.7	Πολυμερισμένες Συνθετικές Λιπιδικές Μembrάνες.....	75
2.7.1	Δομή και ιδιότητες.....	75
2.7.2	Σχηματισμός συνθετικών λιπιδικών μεμβρανών με πολυμερισμό πάνω σε φίλτρα.....	76
2.8	Ιοντική Διαπερατότητα των Διστρωματικών Λιπιδικών Μembrανών.....	79
2.8.1	Μηχανισμοί μεταφοράς ιόντων.....	79
2.8.2	Ηλεκτρικό κύκλωμα ισοδύναμο των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών.....	81
2.9	Φυσικοχημικοί Μέθοδοι Μηχανισμού Απόκρισης Βιοαισθητήρων Λιπιδικών Μembrανών.....	83
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΜΦΥΤΕΥΣΙΜΟΙ ΝΑΝΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΣΕ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	87
3.1	Εισαγωγή.....	89
3.2	Η έννοια του νανυποδοχέα.....	91
3.3	Βιοαισθητήρες σε κλινική βάση.....	92
3.4	Ταξινόμηση και ιδιότητες των εμφυτεύσιμων υλικών.....	93
3.4.1	Σύγχρονη χρήση πολυμερών για βιο-νανοαισθητήρες.....	93
3.4.2	Σύγχρονες νανοδομές για βιοσυνθέσεις.....	96
3.4.2.1	Υδροξυαπατίτης.....	96
3.4.2.2	Μεταλλικά νανοσωματίδια.....	97
3.4.2.3	Νανοδομές από άνθρακα.....	97
3.5	Τεχνολογία ανάπτυξης συμβατών βιοαισθητήρων.....	100
3.5.1	Νανοςύνθετα φιλμ.....	100

3.5.2	Πορώδη ικρίωματα.....	100
3.5.3	Νανοϋβριδικές μεμβράνες.....	102
3.6	Αποστείρωση των συμβατών νανοβιοαισθητήρων.....	104
3.7	In-vitro βιοδιάσπαση των συμβατών νανοβιοαισθητήρων.....	106
3.8	Εφαρμογή νανοβιοαισθητήρων σε διαδικασία ιστικής ανάπλασης.....	108
3.9	Παραδείγματα χρήσης συμβατών νανοβιοαισθητήρων	110
3.10	Το μέλλον.....	113
	B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	115
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	117
	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΥ ΣΕ ΝΑΝΟΤΟΙΧΩΜΑΤΑ ZnO	
4.1	Εισαγωγή.....	119
4.2	Αντιδραστήρια και διαλύματα.....	123
4.3	Οργανολογία	124
	4.3.1 Κατασκευή ακατέργαστου αισθητήρα χοληστερόλης.....	124
	4.3.2 Κατασκευή αισθητήρα με χρήση σταθεροποιημένης λιπιδικής μεμβράνης.....	124
4.4	Αποτελέσματα.....	126
	4.4.1 Έλεγχος της επιφανειακής δομής του αισθητήρα με SEM.....	126
	4.4.2 Έλεγχος βιοαισθητήρα χοληστερόλης σε χρόνο απόκρισης, γραμμικότητα , επαναληψιμότητα και σταθερότητα.....	127
	4.4.3 Μηχανισμός δημιουργίας σήματος.....	129
	4.4.4 Μελέτη της επίδρασης του pH, του τύπου του ρυθμιστικού διαλύματος, της θερμοκρασίας και διαφόρων παρεμποδιστών.....	130
	4.4.5 Εφαρμογή στο δείγμα ορού.....	133
4.5	Επιμέρους συμπεράσματα.....	134
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	135
	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΟΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΕΓΧΥΣΗ ΟΥΡΙΚΑΣΗΣ ΣΕ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΕΠΙΚΑΘΗΜΕΝΗ ΣΕ ΝΑΝΟΣΥΡΜΑΤΑ ZnO	

5.1	Εισαγωγή.....	137
5.2	Αντιδραστήρια.....	141
5.3	Οργανολογία.....	142
5.4	Έλεγχος του βιοαισθητήρα.....	145
	5.4.1 Χρόνος απόκρισης	145
	5.4.2 Αναπαραγωγιμότητα, γραμμικότητα και σταθερότητα του αισθητήρα	147
	5.4.3 Μελέτη της λειτουργίας του αισθητήρα στην επίδραση του pH, της θερμοκρασίας και παρεμποδιστών	148
5.5	Επιμέρους συμπεράσματα.....	155
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	157
	Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	161
	Δ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	195
	Παράρτημα 1: Συντμήσεις-Ακρωνύμια	197
	Παράρτημα 2: Τίτλοι Σχημάτων –Πινάκων	199
	Παράρτημα 3: Δημοσιεύσεις	203

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ως γνωστόν οι βιοαισθητήρες είναι συσκευές που αποτελούνται από ένα βιολογικό σύστημα αναγνώρισης (bioreceptor) και από έναν μετατροπέα. Η αλληλεπίδραση των αναλυτών με το βιοϋποδοχέα προκαλεί ένα φαινόμενο κατά το οποίο ο μετατροπέας μπορεί να το μετατρέψει σε μια μέτρηση (π.χ. ηλεκτρικό σήμα). Οι πλέον κοινοί βιοϋποδοχείς βασίζονται σε αλληλεπιδράσεις α) αντισώματος-αντιγόνου, β) νουκλεϊκού οξέος, γ) ενζυμικές, δ) κυτταρικές και ε) με τη χρήση βιομμητικών υλικών. Συνήθεις τεχνικές μετατροπής περιλαμβάνουν μηχανική, ηλεκτρική και οπτική ανίχνευση.

Τα τελευταία χρόνια οι περιοχές της νανο-τεχνολογίας και των νανο-επιστημών αποτελούν διεθνώς έναν πυρήνα έντονων δραστηριοτήτων με αναρίθμητες εφαρμογές, στις οποίες επικεντρώνεται ένα πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων και βιομηχανικών επενδύσεων. Τα αποτελέσματα γίνονται ήδη αντιληπτά στον οικονομικό στίβο, επηρεάζοντας διεθνώς βιομηχανίες και οικονομίες, αλλά και στον κοινωνικό τομέα, βελτιώνοντας το επίπεδο της ζωής. Η συνολική αγορά για τις εφαρμογές της νανο-τεχνολογίας το 2007 άγγιξε τα 1,7 δις \$ στις ΗΠΑ, με εκτιμήσεις για κατακόρυφη αύξηση τα επόμενα χρόνια (BCC Research). Το πρόθεμα «νανο-» υποδηλώνει την επιστήμη και τεχνολογία της τάξης μεγέθους του νανομέτρου (nm), διαστάσεις που αγγίζουν τη μοριακή δομή της ύλης και απαιτούν νέες πειραματικές και τεχνολογικές προσεγγίσεις στη διαχείρισή τους. Οι επιστήμες αυτές απευθύνονται σε υψηλής ακρίβειας επεμβάσεις στη νανοκλίμακα (1-100 nm) που είναι το σημείο που ξεκινάει η φύση να χτίζει τον οργανισμό μας. Το νανόμετρο είναι το ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου (10^{-9} m), 60000 φορές μικρότερο από το πάχος μιας τρίχας, και αναφερόμαστε σ'αυτήν ακριβώς τη σκάλα μεγεθών, όπου τα βιολογικά μόρια και οι δομές εκτελούν τις λειτουργίες τους μέσα στο κύτταρο. Η νανο-βιοτεχνολογία προέρχεται από τη σύγκλιση της νανο-τεχνολογίας με τη σύγχρονη βιολογία και αντίστοιχα, η νανο-ιατρική προκύπτει από την εφαρμογή της νανο-βιοτεχνολογίας στην παραδοσιακή ιατρική. Ως βιοτεχνολογικό παρακλάδι της νανο-τεχνολογίας επομένως, η νανο-ιατρική αναφέρεται στην παρακολούθηση, ανίχνευση, αποκατάσταση και έλεγχο των βιολογικών συστημάτων του ανθρώπου σε μοριακό επίπεδο, με την υψηλής ακρίβειας κατασκευή και χρήση νανοδομών και νανοδιατάξεων. Η ανάπτυξη της έρευνας στο χώρο αυτό βασίζεται στα επιτεύγματα και τις ανακαλύψεις των βασικών επιστημών και ιδιαίτερα της χημείας, της φυσικής

και της βιολογίας (επιστήμες με θεμελιωμένη τη μελέτη της ύλης στο μοριακό επίπεδο), ενώ απαιτείται μια διεπιστημονική προσέγγιση με τη συνεργασία ιατρών, προγραμματιστών ΗΥ, επιστημόνων υλικών και άλλων ειδικών.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει τη βάση της πάνω στη φιλοσοφία της νανοτεχνολογίας και της χρήσης των βιοαισθητήρων και ακολουθώντας ένα βήμα επιπλέον, στη ζεύξη αυτών των δύο 'φιλοσοφιών' ώστε να δημιουργηθούν δομές και συστήματα για βιοιατρικές εφαρμογές.

Πριν την έναρξη της προηγήθηκαν πολλές και πολύωρες συναντήσεις με τον καθηγητή ΕΚΠΑ κ. Νικολέλη αναλύοντας τα δεδομένα, εστιάζοντας τα προβλήματα τόσο από ιατρικής άποψης αλλά και από πλευράς πρακτικής εφαρμογής. Κατόπιν ετέθησαν οι βάσεις ώστε να σχηματιστεί η θεωρητική φόρμουλα του εγχειρήματος και από το 2008 άρχισαν τα πρώτα πιλοτικά πειράματα ώστε να αποκτηθεί αφενός εμπειρία στην κατασκευή τέτοιων δομών αλλά και να γίνει αντιληπτή η εφικτότητα αυτού του εγχειρήματος.

Θέλω να ευχαριστήσω βαθύτατα τον καθηγητή κ. Νικολέλη για τις ατελείωτες ώρες που μου διέθεσε ώστε να αντιληφθώ τη φιλοσοφία και τον τρόπο λειτουργίας αυτών των δομών, όπως επίσης και για τη συνεχή παρουσία του με τις υποδείξεις και τις πολύτιμες συμβουλές του σε όλη τη διαδικασία της διατριβής. Η διδακτορική αυτή διατριβή εκπονήθηκε στη Σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ κατά το χρονικό διάστημα 2011-2014.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον καθηγητή ΕΜΠ κ. Νικόλαο Τζαμτζή, ο οποίος ήταν ο επιβλέπων καθηγητής στην εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής. Πέραν της καθοδήγησης που μου προσέφερε σε όλα αυτά τα χρόνια, τόσο στη θεωρητική στήριξη του θέματος αλλά και κατά τη συγγραφή της, ο κ. Τζαμτζής ήταν θερμός υποστηρικτής της δουλειάς αυτής αλλά και πολύτιμος σύμβουλος.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή ΕΜΠ κ. Λιοδάκη για τις παρατηρήσεις και τις υποδείξεις του σε κριτικά σημεία της όλης διαδικασίας.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τη σύζυγό μου Νικολέττα και τα παιδιά μου Δαυιδία και Νικόλα, για την υπομονή και κατανόηση που έδειξαν στις πολύωρες ώρες εργασίας αλλά και συγγραφής της διατριβής.

Ευελπιστώ τα αποτελέσματά της διατριβής αυτής αλλά και η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε να αποτελέσουν εφαλτήριο για άλλους επιστήμονες, τόσο ιατρούς όσο χημικούς, φυσικούς, μηχανικούς και βιολόγους ώστε να βελτιώσουν αυτού του είδους τις συσκευές και να πετύχουν τρόπους απλής εφαρμογής τους στο ανθρώπινο σώμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τρέχουσες μέθοδοι της κλινικής διαγνωστικής με συνιστώσα την άντληση πληροφοριών από το βιοχημικό προφίλ του ασθενούς, στηρίζονται κατά βάση σε κλα'σικές μεθόδους ποσοτικής μέτρησης βιοχημικών δεικτών. Από την άλλη πλευρά η αναγνώριση ιογενών νόσων, η παρακολούθηση της βακτηριακής δραστηριότητας βακτηρίων ή η κατάδειξη νοσογόνων καταστάσεων απαιτεί πολύ εξειδικευμένα εργαστήρια, στις περισσότερες των περιπτώσεων, γεγονός που αυξάνει τό κόστος, αλλά κάνει και δύσκολη την πρόσβαση. Τα δεδομένα αυτά σχεδόν καθιστούν αδύνατη την πρόσβαση απομεμακρυσμένων πληθυσμών σε υγειονομικές υπηρεσίες υψηλού βαθμού. Πέραν τούτων η χειρουργική των ιστών έχει ανάγκη τόσο από τεχνητούς ιστούς που θα χρησιμοποιηθούν για επιτέλεση βιολογικών λειτουργιών αλλά και από μηχανισμούς παρακολούθησης μεταμοσχευμένων ιστών μέχρι την πλήρη ενσωμάτωση στη νέα τους θέση. Με τα μέχρι τούδε δεδομένα και οι δύο αυτές ανάγκες είναι πολύ κοστοβόρες για τις υπηρεσίες υγείας.

Πρόσφατα αυξημένος αριθμός ερευνητών έχει εστιάσει στη χρησιμότητα των βιοαισθητήρων σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Συνδυασμένοι με νανοϋλικά, και νανοδομές, βιοαισθητήρες σε νανοκλίμακα μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Τέτοιου είδους εφαρμογές αποτελούν η μέτρηση βιοχημικών δεικτών στον ορό ασθενών, η παρακολούθηση της δραστηριότητας παθογόνων βακτηρίων στο σώμα, η διαπίστωση μεταβολών σε κυτταρικό επίπεδο, που δυνητικά θα μπορεί να εξελιχθεί σε ογκογενετική πλατφόρμα, η αναγνώριση ιών, η χρήση τους ως δεικτών αναγνώρισης παθογόνων νόσων κλπ. Οι συσκευές αυτές – νανοβιοαισθητήρες -καθίστανται έτσι εξαιρετικά ευέλικτα συστήματα που επιτρέπουν βιοϊατρικές αναλύσεις με ταχύτητα, άριστη εκλεκτικότητα, υψηλή ευαισθησία και υπερεκλεκτική διάγνωση. Η 'αλληλεπίδραση' επίσης της νανοτεχνολογίας και της βιολογίας μπορεί να λύσει πολλά βιοϊατρικά θέματα και να δώσει μία νέα διάσταση στον τομέα της υγείας και της ιατρικής.

Η χρήση της νανοτεχνολογίας στην ιατρική προσφέρει εκπληκτικές δυνατότητες και δίνει νέες διαστάσεις στην κλινική διαγνωστική και θεραπεία, με μερικές από τις πιθανές χρήσεις να βρίσκονται στη σφαίρα του ιδεατού, άλλες σε διάφορα στάδια χρήσης, και άλλες σε καθημερινή χρήση.

Η νανοτεχνολογία στην ιατρική περιλαμβάνει εφαρμογές νανοσωματιδίων

που επι της τρεχούσης είναι υποαναπτυγμένες αλλά και εφαρμογές που περιλαμβάνουν τη χρήση νανορομπότ για την επισκευή αστοχιών σε κυτταρικό επίπεδο.

Όπως και να το ονομάσει κανείς η νανοτεχνολογία στο πεδίο της ιατρικής θα αναπτύξει στο εγγύς μέλλον τεχνικές και μεθόδους για την τάχιστα αναγνώριση και κατάδειξη αστοχιών σε κυτταρικό επίπεδο, που δυνητικά θα μπορούσε να καταλήξει σε νοσογόνο κατάσταση σε μακρο επίπεδο (πχ. καρκίνος), αλλά και σε πληρέστερη και στοχευμένη θεραπεία τόσο σε κυτταρικό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο αποκλειστικά ιστών.

Η παρούσα διατριβή παρουσιάζει πρωτότυπους ποτενσιομετρικούς βιοαισθητήρες κατασκευασμένους για την ανίχνευση και μέτρηση των επιπέδων χοληστερόλης και ουρικού οξέος. Οι αισθητήρες αυτοί έδειξαν μεγάλη εκλεκτικότητα, εξαιρετική ευαιθησία, μεγάλη επαναληπτικότητα, ενώ θα μπορούσε να εμφυτευθούν στο ανθρώπινο σώμα λόγω της βιοσυμβατότητας της μεμβράνης λιπιδίων.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:

Βιοαισθητήρες, νανοτεχνολογία σε βιοϊατρικές εφαρμογές.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:

Βιοαισθητήρες, ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες, πολυμερισμένες λιπιδικές μεμβράνες, ένεση σε ροή διαλύματος, νανοδομές, νανοτοιχεία ZnO, νανοσύρματα ZnO.

ABSTRACT

The current method of clinical diagnosis based on information from the biochemical profile of the patient rely on classic methods of measurement of biochemical indicators. On the other hand the diagnosis of viral infections, the monitoring of bacterial activity or the recognition of various diseases requires very specialized medical labs. Having said that it is easily understandable that the cost is increased and the diagnostic quality is low in populations traditionally underserved. Furthermore tissue surgery requires artificial tissue-implants for biological functions in the body as well as monitoring mechanisms of transplanted tissues until complete incorporation in their new position. Currently both these targets are very expensive for health systems.

Recently increased number of researchers is focused on the functionality of the biosensors in biomedical applications. These structures combined with nanotechnology can be used in biomedical applications. Such applications are measurement of biochemical in blood samples, bacterial activity monitoring, viral recognition, drug delivery in specific targets e.t.c. These devices – nanobiosensors- are very flexible systems, which provide biomedical measurements very fast, with excellent selectivity, and very high sensitivity. The combination of nanotechnology and biology can solve many biomedical issues and give a new era in medicine.

The use of nanotechnology in medicine offers some exciting possibilities. Some techniques are only imagined, while others are at various stages of testing, or actually being used today.

Nanotechnology in medicine involves applications of nanoparticles currently under development, as well as longer-range research that involves the use of manufactured nano-robots to make repairs at the cellular level (sometimes referred to as *nanomedicine*).

Whatever you call it, the use of nanotechnology in the field of medicine could revolutionize the way we detect and treat damage to the human body and disease in the future, and many techniques only imagined a few years ago are making remarkable progress towards becoming realities.

The work in this thesis was to fabricate novel potentiometric biosensors based on ZnO nanowalls and nanowires for the detection and measurement of cholesterol

and uric acid levels in different samples. These biosensors shown great selectivity, excellent sensitivity, and appreciable reproducibility. Due to the biocompatibility of the lipid film these biosensors could be implanted in the human body.

Key words:

Biosensors, FIA, polymerized lipid membrane, nanostructures, nanowalls, nanowires
ZnO

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τρέχουσα τακτική στην καθημέρα κλινική διαγνωστική στηρίζεται μεταξύ άλλων σε εργαστηριακούς ελέγχους που αποκαλύπτουν το βιοχημικό προφίλ του ασθενούς. Η ταυτοποίηση ιογενών νόσων, ο έλεγχος της βακτηριακής δραστηριότητας μικροβιακών στελεχών, η διάγνωση νοσογόνων καταστάσεων κλπ, έχει ανάγκη εξειδικευμένων εργαστηρίων στην πλειονότητα των περιπτώσεων, συνθήκη η οποία αυξάνει το κόστος αλλά και κάνει δύσκολη την πρόσβαση σε υπηρεσίες τέτοιου είδους, ειδικά σε απομακρυσμένους πληθυσμούς από τα αστικά κέντρα.

Προχωρώντας ένα βήμα πιο πέρα και παρακολουθώντας την εξέλιξη της χειρουργικής των ιστών είναι πλέον προφανής η αναγκαιότητα της χρήσης τεχνητών ιστών για επιτέλεση βιολογικών λειτουργιών αλλά και η ανάπτυξη τεχνικών παρακολούθησης μεταμοσχευμένων ιστών, μέχρι την πλήρη ενσωμάτωσή τους στις θέσεις στόχους. Με τα μέχρι τούδε δεδομένα και οι δύο αυτές ανάγκες είναι πολύ κοστοβόρες για τις υπηρεσίες υγείας. Πρόσφατα αυξημένος αριθμός ερευνητών έχει εστιάσει την έρευνα στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων που θα μπορούσαν να δώσουν λύση σε τέτοια προβλήματα.

Ο βιοαισθητήρας είναι ένας αυτόνομος αισθητήρας ικανός να παρέχει ποσοτικές ή ημιποσοτικές πληροφορίες χρησιμοποιώντας ένα στοιχείο βιολογικής αναγνώρισης που βρίσκεται σε άμεση χωρική επαφή με ένα κατάλληλο μεταλλάκτη. Η αναλυτική διάταξη του βιοαισθητήρα περιέχει ένα βιοστοιχείο (ένζυμο, αντίσωμα, κύτταρο, ιστό, κλπ.), ένα μεταλλάκτη που μετατρέπει μία βιολογική ή βιοχημική αναγνώριση του υποστρώματος (αναλύτη) σε μετρήσιμο ή καταγραφόμενο σήμα. Συνήθως στους βιοαισθητήρες ως στοιχείο βιολογικής αναγνώρισης χρησιμοποιείται ένα ένζυμο (ενζυμικοί βιοαισθητήρες) ή βιολογικοί υποδοχείς όπως αντισώματα, κύτταρα, ιστοί (βιοαισθητήρες συγγένειας). Το βιοστοιχείο των περισσότερων βιοαισθητήρων είναι ακινητοποιημένο πάνω σε μεμβράνη ή μέσα σε γέλη έτσι ώστε το βιοστοιχείο να κρατιέται σε στενή επαφή με το μεταλλάκτη. Το παραγόμενο αναλυτικό σήμα είναι αποτέλεσμα βιοαναγνώρισης, δηλαδή εκλεκτικής αλληλεπίδρασης του βιολογικού παράγοντα ανίχνευσης (παράγοντας βιοαναγνώρισης) με την προσδιοριζόμενη ουσία. Ως παράγοντας βιοαναγνώρισης χρησιμοποιείται κάποιο βιομόριο πρωτεϊνικής ή νουκλεοτιδικής φύσης (π.χ ένζυμο, αντίσωμα, υποδοχέας, πεπτίδιο ή ολιγονουκλεοτίδιο) ή ένας βιολογικός παράγοντας

(π.χ κυτταρικό οργανίδιο, μικροοργανισμός ή τμήμα ιστών) ακινητοποιημένος σε έναν κατάλληλο φορέα.

Ο ιδανικός βιοαισθητήρας είναι αυτός που θα παρέχει μεγάλη εκλεκτικότητα, υψηλή ευαισθησία, καλή επαναληψιμότητα και ακρίβεια, ταχεία απόκριση, υψηλή αξιοπιστία και ικανότητα αυτοελέγχου, μεγάλη διάρκεια ζωής και δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, χαμηλό κόστος, ανεξαρτησία απόκρισης από φυσικές και χημικές μεταβολές και ευκολία κατασκευής. Η χρήση αυτών των συσκευών είναι πολυδιάστατη. Συγκεκριμένα μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε κλινική διάγνωση και βιοϊατρική τεχνολογία, ποιοτικό έλεγχο και φαρμακευτική ανάλυση, μικροβιολογία (ανίχνευση ιών και βακτηρίων), παραγωγή και ποιοτικό έλεγχο τροφίμων, κτηνιατρική διάγνωση, έλεγχο βιομηχανικών αποβλήτων, προσδιορισμό βιομηχανικών (τοξικών) αερίων, έλεγχο της ρύπανσης του περιβάλλοντος, ανίχνευση ουσιών χημικού ή βιολογικού πολέμου.

Η νανοβιοτεχνολογία είναι ένας ραγδαία αναπτυσσόμενος κλάδος της σύγχρονης νανοεπιστήμης και νανοτεχνολογίας στον οποίον εφαρμόζονται τα εργαλεία και οι διεργασίες κατασκευής νανοδιατάξεων για την κατασκευή νανοδομών και νανοσυστημάτων που θα προορίζονται για τη μελέτη βιολογικών συστημάτων. Ποιοί είναι οι θεμέλιοι λίθοι της νανοβιοτεχνολογίας; Σε διαστάσεις νανομέτρου μπορούν τώρα να κατασκευαστούν διάφορες δομές και συστήματα τα οποία λόγω της διάστασής τους έχουν πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία και διαπερατότητα, και επιτρέπουν μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με τα βιολογικά συστήματα.

Στο χώρο της διαγνωστικής η αγορά της έρευνας στις επιστήμες υγείας επιδιώκει συνεχώς τη βελτίωση των ερευνητικών μεθόδων βιοανάλυσης μέσα από τη χρήση νανοδομών για διάφορες βιολογικές διεργασίες. Με τον τρόπο αυτό ενισχύεται η παραγωγικότητα στην ερευνητική διάσταση για τις επιστήμες υγείας, μειώνεται σημαντικά ο χρόνος, η προσπάθεια αλλά και η δαπάνη κατά την προετοιμασία και την ανάλυση δειγμάτων DNA, αίματος, δειγμάτων ιστών κτλ. Επίσης, η απαίτηση μικρότερης ποσότητας δειγμάτων σημαίνει ελαχιστοποίηση της επέμβασης στον ανθρώπινο οργανισμό για την εξαγωγή του δείγματος, που είναι μία από τις κύριες επιδιώξεις της Νανοϊατρικής.

Σε in-vitro εφαρμογές η νανοβιοτεχνολογία είναι στο επίκεντρο της ανάπτυξης στο πεδίο των βιοαισθητήρων μέσω της χρήσης νέων υλικών, βελτιωμένης επιφανειακής μηχανικής και ολοκληρωμένων συστημάτων. Οι βιοαισθητήρες

αναπτύσσονται με χρήση και συνδυασμό προηγμένων νανοϋλικών (nanowires, νανοσωματίδια κ.α.). Με τον τρόπο αυτό δίνεται η δυνατότητα, για παράδειγμα, να ανιχνευθούν πρωτεΐνες σε μοριακή κλίμακα, και έτσι το πεδίο της διαγνωστικής να επεκταθεί σε επίπεδο ανίχνευσης και ταυτοποίησης μέχρι και ξεχωριστών μορίων από ένα δείγμα μείγματος σωματικών υγρών. Για την ex-vivo ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι φασματοσκοπίας και μικροσκοπίας (π.χ. imaging mass spectroscopy, scanning probe microscopy), που ανοίγουν νέες προοπτικές για τη μοριακή παθολογία και τα υψηλής ευαισθησίας biochips.

Με τη βοήθεια της νανοτεχνολογίας η in-vivo απεικόνιση συνεισφέρει στην έγκαιρη διάγνωση και την παρακολούθηση της εξέλιξης των ασθενειών (π.χ. καρκινικές μεταστάσεις). Οι τεχνικές απεικόνισης περιλαμβάνουν την οπτική απεικόνιση και φασματοσκοπία, πυρηνική απεικόνιση με τη βοήθεια ραδιενεργών ανιχνευτών, απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού, τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων κλπ. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται ως επικαλύψεις νανοσωματιδίων για παράδειγμα, ή που είναι βασισμένα σε μακρομοριακές δομές (πχ λιποσώματα), σε συνδυασμό με τις εξελίξεις στις οπτικές μεθόδους νανο-απεικόνισης, οδηγούν στη ραγδαία βελτίωση της in-vivo απεικόνισης, ώστε να αποφευχθούν προβλήματα σχετικά με την τοξικότητα και με την ασφάλεια των ασθενών (λόγω των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται).

Όσον αφορά τις βιοϊατρικές συσκευές, οι νανοσυσκευές ανοίγουν νέους ορίζοντες στην ιατρική διαγνωστική και θεραπεία, καθώς οι τεχνολογικές πρόοδοι στα υλικά και τους βιοαισθητήρες γίνονται πρόδρομοι της ανάπτυξης των ιατρικών εφαρμογών. Στον τομέα της θεραπείας του καρκίνου, όπως και στην συγκεκριμένη μεταφορά φαρμάκων, τα νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν μικροσωλήνες για την τοπική καταστροφή ιστών, χρησιμοποιώντας φως ή θερμότητα για να προκαλέσουν θερμικό φορτίο ή μεταφέροντας και εναποθέτοντας χημειοθεραπευτικές ουσίες.

Θεραπευτική. Διακρίνεται σε δύο ευρείς τομείς: αυτόν της στοχευμένης θεραπείας (targeted delivery) και στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής (regenerative medicine). Στοχευμένη θεραπεία: συνίσταται στην in-vivo μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών με χρήση νανοσωματιδίων όπως νανοκρύσταλλοι, νανοσφαίρες και νανοκάψουλες. Λόγω των διαστάσεών τους, αυτά τα νανοσυστήματα μεταφοράς μπορούν να διαπεράσουν κάθε είδους βιολογικές μεμβράνες και να απορροφηθούν στη κυκλοφορία του αίματος. Έτσι, η

νανοθεραπευτική εγγυάται την μεταφορά μεγάλης δόσης φαρμάκων σε μια αυστηρά συγκεκριμένη περιοχή, ελαττώνοντας την ολική συγκέντρωση του φαρμάκου στον οργανισμό, την τοξικότητα και τις επακόλουθες παρενέργειες. Με τη χρήση της νανοβιοτεχνολογίας μπορεί να επιταχυνθεί η θεραπευτική ικανότητα των πρωτεϊνικών και μακρομοριακών φαρμάκων για τη καταπολέμηση των μολυσματικών νόσων και του καρκίνου. Η βαθιά κατανόηση των αλληλεπιδράσεων των τεχνητών νανοδομών (π.χ. νανοσωματιδίων) με τον οργανισμό είναι ο βασικότερος παράγοντας για την επιτυχία της στοχευμένης θεραπείας. Μερικούς από τους στόχους της νανοτεχνολογίας είναι ο σχεδιασμός νανοδομών που απορροφώνται από τα κύτταρα (σχήμα, διαστάσεις, χημικά χαρακτηριστικά των επιφανειών & νανοδομών), η αιμοσυμβατότητα και η μελέτη της αλληλεπίδρασης των νανοδομών με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, η in-vivo μεταφορά-κατανομή και αποδόμηση των νανοδομών, η αποβολή των νανοδομών από το σώμα. Επίσης, σημαντικός είναι ο τρόπος εισαγωγής των νανοδομών στον οργανισμό, όπως π.χ. με νανοβελόνες, μέσω μικροηλεκτρομηχανικών συστημάτων (MEMS) που τοποθετούνται στο δέρμα ή με biochips που εμφυτεύονται στο σώμα. Αναγεννητική ιατρική: αναμένεται να θεραπεύσει ασθένειες όπως η οστεοαρθρίτιδα, οι ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις, μέσω της μηχανικής των ιστών (tissue engineering) και της βιομιμητικής στρατηγικής (δηλ. της διαδικασίας προσομοίωσης των φαινομένων που συμβαίνουν στη φύση).

Η Νανοτεχνολογία συνεισφέρει σημαντικά στην παραγωγή έξυπνων βιοϋλικών, βιοενεργών μορίων σημάτων και στις θεραπείες βασισμένες σε κύτταρα. Οι διαφορές στην τοπογραφία των νανοϋλικών οδηγούν σε διαφορετική κυτταρική συμπεριφορά (προσκόλληση, προσανατολισμός, κινητικότητα, ενεργοποίηση κτλ). Νανοϋλικά με ενισχυμένες μηχανικές ιδιότητες μπορούν να αντικαταστήσουν αυτά που χρησιμοποιούνται στα ορθοπεδικά εμφυτεύματα τώρα, τα οποία δεν είναι ανθεκτικά στις πιέσεις που υφίστανται στο εσωτερικό του οργανισμού. Νανοϋλικά με ελεγχόμενες ηλεκτρικές ιδιότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία νευρικών παθήσεων.

Νανοτεχνολογικές μέθοδοι ανάπτυξης οδηγούν στην παραγωγή νέων τύπων νανοδομημένων βιοϋλικών, όπως νανοϊνες (nanofibers), νανοσφαίρες, νανο-δέντρα, βιοενεργούς υάλους κτλ. Η Νανοτεχνολογία θα βοηθήσει στην ανάπτυξη βιοενεργών υλικών που απελευθερώνουν μόρια-σήματα με ελεγχόμενες δόσεις / ρυθμούς, μέσω

διάχυσης ή αποικοδόμησης του υλικού, καθώς και στην ανάπτυξη συστημάτων στόχευσης για τις θεραπείες μέσω βλαστικών κυττάρων.

Από όποιο πρίσμα και να το αντικρύσει κανείς η νανοτεχνολογία στο πεδίο της ιατρικής θα αναπτύξει στο εγγύς μέλλον τεχνικές και μεθόδους για την τάχιστα αναγνώριση και κατάδειξη σφαλμάτων σε κυτταρικό επίπεδο, που θα μπορούσε να καταλήξει σε ιστική ανεπάρκεια ή καταστροφή (πχ. καρκίνος), αλλά και σε πληρέστερη και στοχευμένη θεραπεία τόσο σε κυτταρικό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο αποκλειστικά συγκεκριμένων και μεμονωμένων ιστών.

Η παρούσα διατριβή παρουσιάζει πρωτότυπους ποτενσιομετρικούς βιοαισθητήρες κατασκευασμένους για την ανίχνευση και μέτρηση των επιπέδων χοληστερόλης και ουρικού οξέος. Έως σήμερα έχει ερευνηθεί μια μεγάλη ποικιλία υλικών για την κατασκευή βιοαισθητήρων που να διαθέτουν επιλεκτικότητα και γρήγορη απόκριση και μεταξύ αυτών των υλικών το οξειδίο του ψευδαργύρου (ZnO) φαίνεται να είναι ένας από τους πιο σοβαρούς διεκδικητές για την κατασκευή ενός απλού, βιοασφαλή και αξιόπιστου βιοαισθητήρα με χαμηλό κόστος παραγωγής. Οι διαφορετικές δομές –σε νανοκλίμακα- που μπορεί να προσλάβει το ZnO λόγω της μεγάλης ειδικής του επιφάνειας και των εξαιρετικών ηλεκτρικών και θερμικών του ιδιοτήτων, το έχουν τοποθετήσει στο κέντρο της προσοχής των ερευνητών.

Στο πλαίσιο αυτής της διατριβής έγιναν διάφοροι πειραματικοί κύκλοι. Εν κατακλείδι, παρουσιάζεται ένας ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας χοληστερόλης και ένας βιοαισθητήρας ουρικού οξέος. Και οι δύο αυτοί αισθητήρες είναι βασισμένοι σε σε νανοδομές ZnO . Πραγματοποιήθηκαν εργασίες ταυτοποίησης της κατασκευής του αισθητήρα με παραμέτρους το χαμηλό κόστος, τη χρήση από ανιδείκευτο προσωπικό σε όποιες συνθήκες και τη μελέτη δυνατότητας εμφύτευσης στο ανθρώπινο σώμα.

Στο θεωρητικό τμήμα της διατριβής γίνεται αναφορά στην έννοια των βιοαισθητήρων και των χρήσεων τους σε διάφορες εφαρμογές. Επίσης γίνεται παρουσίαση της επίδρασης της νανοτεχνολογίας σε πολλαπλές εφαρμογές με ιδιαίτερη έμφαση τις βιοϊατρικές, αλλά και τη σύζευξη της τεχνολογίας των βιοαισθητήρων με αυτή των νανοδομών επι σκοπόν την προώθηση της νανοϊατρικής.

Στο πειραματικό τμήμα γίνεται εκτενής περιγραφή της διαδικασίας κατασκευής των βιοαισθητήρων χοληστερόλης και ουρικού οξέος αλλά και της

χρήσης τους μέσω νανοδομών ZnO για τον προσδιορισμό αυτών των βιοχημικών δεικτών.

Τέλος δίνονται τα συμπεράσματα και αναλύονται οι προοπτικές χρήσης τέτοιων συσκευών.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

1.1 Η έννοια του αισθητήρα

Οι ανάγκες της σύγχρονης εποχής και της εξαιρετικά ταχύτατης τεχνολογικής ανάπτυξης απαιτούν τη χρήση συστημάτων ταχύτατης αντίληψης και μέτρησης μεγεθών. Οι αισθητήρες παρέχουν τέτοιου είδους χαρακτηριστικά καθόσον είναι ικανοί να μετρήσουν φυσικά μεγέθη όπως πίεση, ένταση φωτός, θερμοκρασία, ηλεκτρικό δυναμικό, ιξώδες κλπ.. Ως αισθητήρας ορίζεται μια συσκευή, άλλοτε άλλου μεγέθους, η οποία μπορεί να ανιχνεύσει ένα μακροσκοπικό φυσικό μέγεθος και να το μετατρέψει σε ηλεκτρικά μετρήσιμο σήμα. Ερεθίσματα διαφόρων πηγών όπως επίπεδα κάποιας ποσότητας υλικού, ιδιότητα κάποιου υλικού ή μεταβολή ιδιότητας υλικών που μπορεί να καταδειχθεί, αποτελούν το στοιχείο εισόδου ενός αισθητήρα. Όταν τα ανωτέρω μπορεί να μετατραπούν σε μετρήσιμο σήμα, αυτό αποτελεί το στοιχείο εξόδου του αισθητήρα και συνήθως έχει τη μορφή τάσης, ή ηλεκτρικού φορτίου. Τα στοιχεία που συνθέτουν έναν αισθητήρα είναι η ενεργός του επιφάνεια, ο μετατροπέας σήματος και το ηλεκτρονικό τμήμα επεξεργασίας δεδομένων. Η ενεργός επιφάνεια του αισθητήρα περιέχει το συστατικό αναγνώρισης, που πραγματοποιεί την ανίχνευση. Ο μετατροπέας σήματος μετατρέπει τη φυσική ή χημική αντίδραση που πραγματοποιείται, λόγω της αντίδρασης που πραγματοποιείται, σε μετρήσιμο σήμα. Με κριτήριο την μορφή ενέργειας που μεταφέρει το σήμα τους οι αισθητήρες κατηγοριοποιούνται σε : χημικούς, θερμικούς, μαγνητικούς, μηχανικούς, ηλεκτρικούς, ακτινοβολίας, και βιοχημικούς.

Οι χημικοί αισθητήρες αποτελούν αναλυτικές συσκευές με μεγάλη ανάπτυξη και πολλαπλές εφαρμογές. Η βασική τους λειτουργία είναι η ποιοτική ή/και ποσοτική ταυτοποίηση μιας αναλυόμενης ουσίας, μέσω χημικής αντίδρασης. Αποτελούνται από δύο κύρια μέρη : ένα χημικά ευαίσθητο τμήμα όπου πραγματοποιείται η χημική αντίδραση και έναν μετατροπέα σήματος που μετατρέπει την χημική πληροφορία κυρίως σε ηλεκτρικό ή οπτικό σήμα. Η επιφάνεια όπου πραγματοποιείται η χημική αντίδραση μπορεί να είναι κάποια στοιβάδα πολυμερών ή άλλο επιστρωμένο υλικό μη βιολογικής φύσεως. Συγκεκριμένες ουσίες, που είναι ενσωματωμένες στο επιστρωμένο υλικό αλληλεπιδρούν με την προς ανάλυση ουσία και με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται η ανίχνευση και ο προσδιορισμός της ποιοτικής ή ποσοτικής. Όσον αφορά την αναγκαιότητα του μετατροπέα σήματος, είναι η μετάφραση της παρουσίας της αναλυόμενης ουσίας σε ανιχνεύσιμο σήμα το οποίο μπορεί να

ερμηνευτεί και να οδηγήσει στον προσδιορισμό της ουσίας, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Το εύρος των εφαρμογών των χημικών αισθητήρων είναι πολύ μεγάλο και περιλαμβάνει τομείς όπως οι κλινικές έρευνες, ή η διάγνωση ασθενειών μέσω της ανίχνευσης ουσιών στο αίμα, οι περιβαλλοντικοί έλεγχοι, οι ποιοτικοί και ποσοτικοί έλεγχοι προϊόντων στις βιομηχανίες τροφίμων, κτλ.

Κατηγορία των χημικών αισθητήρων αποτελούν οι βιοαισθητήρες (biosensors). Η διαφορά των βιοαισθητήρων από τους υπόλοιπους χημικούς αισθητήρες βρίσκεται στην ενεργό επιφάνεια αναγνώρισης. Στους βιοαισθητήρες η ενεργός επιφάνεια αναγνώρισης είναι κάποιο βιολογικό μόριο (ένζυμο, αντίσωμα, κλπ) ή και ολόκληρο κύτταρο. Κατά τον τρόπο αυτό χρησιμοποιούνται βιολογικά ή βιομιμητικά υλικά προκειμένου να ανιχνευθεί συγκεκριμένη αναλυόμενη ουσία σε κάποιο υπόστρωμα, μέσω ιδιαίτερων ή εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται ανάμεσα στα βιολογικά στοιχεία και την προς ανάλυση ουσία. Οι βιοαισθητήρες είναι δηλαδή 'έξυπνες' συσκευές με ενσωματωμένο βιολογικό υλικό και οι οποίες με την βοήθεια ενός μετατροπέα σήματος μετατρέπουν τη βιολογική αντίδραση σε μετρήσιμο σήμα. Η αναλυόμενη ουσία μπορεί να έχει οποιαδήποτε μορφή, όπως αντιγόνο, μικροοργανισμός, ανόργανο συστατικό (ιόντα, βαρέα μέταλλα), οργανικό συστατικό (πρωτεΐνες, σάκχαρα,) κ.τ.λ.

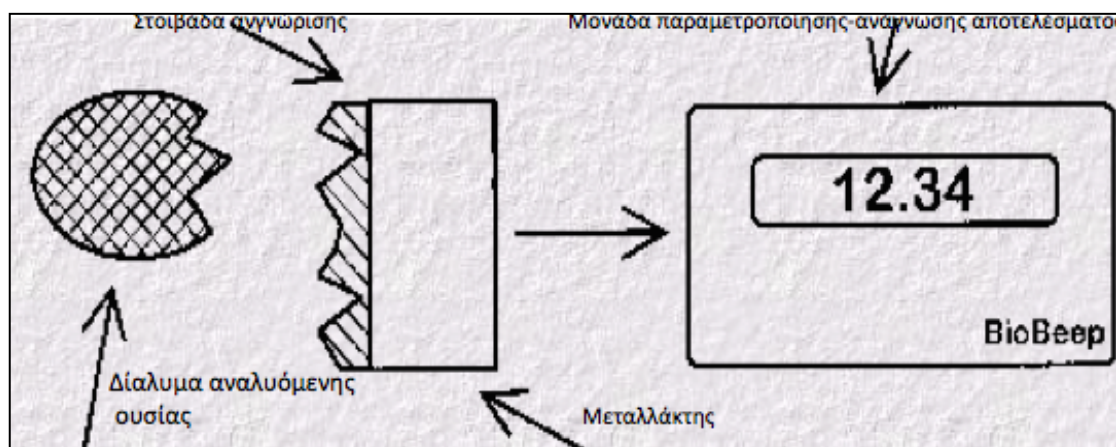
Οι βιοαισθητήρες διαθέτουν την ευαισθησία των υπόλοιπων χημικών αισθητήρων, αφού και σε αυτούς πραγματοποιείται φυσικοχημική μετατροπή του σήματος, αλλά σε αντίθεση με τους λοιπούς αισθητήρες έχουν πολύ μεγάλη εκλεκτικότητα λόγω των βιολογικών αντιδράσεων αναγνώρισης. Η ικανότητά τους ανίχνευσης ουσιών σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, η μεγάλη εξειδίκευση, η εκλεκτικότητα, η ταχύτητα, το χαμηλό κόστος και η δυνατότητα για μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο, τους καθιστούν χρήσιμους σε ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών. Παράδειγμα αποτελούν οι διαγνωστικές αναλύσεις στην ιατρική, περιβαλλοντικές αναλύσεις (π.χ. ανίχνευση ρύπων ή τοξικών ουσιών), και οι ποιοτικοί έλεγχοι τροφίμων. Η ικανότητά τους να πραγματοποιούν μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο δίνει τη δυνατότητα μετρήσεων σε διάφορες χρόνιες παθήσεις πχ. γλυκόζη αίματος – Σακχαρώδης Διαβήτης, ουρία – νεφρικές παθήσεις, ουρικό οξύ – ρευματολογικά νοσήματα κτλ.

Οι βιοαισθητήρες αναπτύσσονται συνεχώς και δημιουργούνται νέα και πιο ολοκληρωμένα συστήματα με ενισχυμένες ιδιότητες, τα οποία πολύ συχνά προσομοιάζουν στους φυσικούς αισθητήρες αναγνώρισης.

1.2 Αρχές Λειτουργίας Αισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές διατάξεις που αποτελούνται από δύο μέρη: (1) τον φυσικοχημικό μεταλλάκτη και (2) τον παράγοντα βιοαναγνώρισης (**σχήμα 1**). Όπως φαίνεται στο σχήμα 1, το διάλυμα της αναλυόμενης ουσίας αλληλεπιδρά με τον παράγοντα βιοαναγνώρισης και οι φυσικοχημικές μεταβολές που πραγματοποιούνται μετατρέπονται σε αναλυτικό σήμα από τον φυσικοχημικό μεταλλάκτη. Ο ρόλος δηλαδή του αισθητήρα είναι να μετατρέπει τις βιοχημικές μεταβολές της αντίδρασης ανάμεσα στον παράγοντα βιοαναγνώρισης, ο οποίος είναι η αντίστοιχη πρωτεΐνη υποδοχέας της κυτταρικής μεμβράνης και της αναλυόμενης ουσίας, που προσομοιάζει με το μόριο διεγέρτη της μεμβράνης, σε αναλυτικό σήμα.

[K. Cammann, 1977 ; J. C. Weaver, 1976]



Σχήμα 1: Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρα

Ο παράγοντας ή στοιβάδα βιοαναγνώρισης συνήθως είναι ολόκληρο βιολογικό υλικό (π.χ. ιστοί, μικροοργανισμοί, οργανίδια) ή βιομόρια (π.χ. ένζυμα, πρωτεΐνες, αντισώματα, DNA). Πολλές φορές όμως δεν είναι βιολογικές ουσίες, αλλά βιομηχανικές, χημικές ουσίες δηλαδή που προσομοιάζουν με ουσίες που βρίσκονται μέσα σε ζωντανούς οργανισμούς. Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι διάφορα χημικά αντιδραστήρια ή καταλύτες. Οποιοδήποτε και να είναι το είδος της ουσίας που χρησιμοποιείται, ο βασικός στόχος είναι ο παράγοντας βιοαναγνώρισης να έχει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ως προς την αναλυόμενη ουσία.

Ο ρόλος του φυσικοχημικού μεταλλάκτη είναι να μετατρέπει τις φυσικοχημικές μεταβολές σε αναλυτικό σήμα. Το τελικό σήμα που λαμβάνουμε έχει

μορφή που εξαρτάται από το είδος του μεταλλάκτη ο οποίος έχει προσαρμοστεί στον βιοαισθητήρα που χρησιμοποιούμε. Έτσι ο μεταλλάκτης μπορεί να μετατρέπει τις μεταβολές σε ηλεκτροχημικό, θερμομετρικό, μαγνητικό ή οπτικό σήμα [N. Takai, 1991; M. Gotoh, 1987]. Προφανώς επιλέγεται το είδος που δίνει τα καλύτερα μετρήσιμα αποτελέσματα, ανάλογα του βιοαισθητήρα που χρησιμοποιείται, την φύση της προσδιοριζόμενης ουσίας και τις γενικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν τις μετρήσεις.

1.3 Αισθητήρες στους φυσικούς οργανισμούς. Κυτταρικές μεμβράνες και ο ρόλος τους στην αναγνώριση χημικών ενώσεων

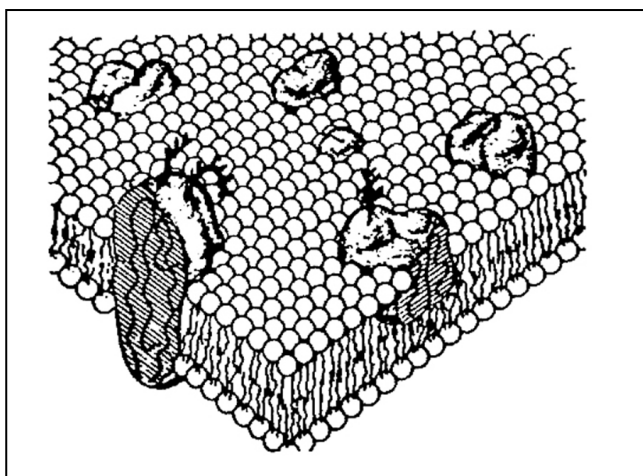
Ένα από τα αντικείμενα μελέτης του τομέα της Αναλυτικής Χημείας, που συνδέεται με το περιβάλλον, είναι οι πρωτότυποι μηχανισμοί χημικής αναγνώρισης των φυσικών οργανισμών. Οι φυσικοί μηχανισμοί αποτελούν πρότυπο για την δημιουργία αισθητήρων χημικής ανάλυσης οι οποίοι θα έχουν ως χαρακτηριστικά την ευαισθησία, τη μεγάλη εκλεκτικότητα, ενώ μετά το τέλος της ανάλυσης-αντίδρασης θα υπάρχει δυνατότητα αναστρεψιμότητας των ενεργών τμημάτων τους και επαναχρησιμοποίησής τους για νέες μετρήσεις [J Janata 1988; M. Thompson 1984]. Οι αισθητήρες αυτοί θα μπορούσαν να έχουν τεράστιες εφαρμογές σε διάφορους τομείς όπως η ιατρική (ανίχνευση ουσιών στο αίμα, δοκιμή νέων ουσιών σε διάφορες παθήσεις), η βιομηχανία (έλεγχος προϊόντων) ή η αντιμετώπιση της ρύπανσης του περιβάλλοντος (έλεγχος υδάτων για ρύπανση με φυτοφάρμακα ή απόβλητα βιομηχανικών μονάδων). Για αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητη η εκτεταμένη μελέτη των ανωτέρω φυσικών μηχανισμών και η προσπάθεια κατανόησης του τρόπου λειτουργίας τους.

Η χημική αναγνώριση στους φυσικούς οργανισμούς συνήθως πραγματοποιείται στην κυτταρική μεμβράνη. Η κυτταρική μεμβράνη ή κυττοπλασματική μεμβράνη (cell membrane or cytoplasmic membrane) συμμετέχει σε όλες τις διεργασίες που σχετίζονται με την επιβίωση, αναπαραγωγή και λειτουργικότητα των κυττάρων. Η κυτταρική μεμβράνη είναι βιολογική μεμβράνη η οποία διχωρίζει το εσωτερικό περιβάλλον του κυττάρου από το εξωτερικό. Η κυτταρική μεμβράνη είναι εκλεκτικά διαπερατή σε ιόντα και οργανικά μόρια και ελέγχει τη διακίνηση 'παραγόντων' στο εσωτερικό περιβάλλον του κυττάρου από το εξωτερικό και αντίστροφα. Δηλαδή ο ρόλος των μεμβρανών είναι η διαμερισματοποίηση του κυττάρου από το περιβάλλον, ο έλεγχος της μετακίνησης βιομορίων από το περιβάλλον στο κύτταρο και αντίστροφα, η υποδοχή εξωτερικών ερεθισμάτων μέσω μορίων υποδοχέων, η συμμετοχή τους στην διακυτταρική επικοινωνία και η συσσώρευση στην επιφάνεια τους διαφόρων ενζύμων για ειδικές αντιδράσεις.

Η κυτταρική μεμβράνη που περιβάλλει το κυτταρόπλασμα των ζωντανών κυττάρων υπάρχει σε μύκητες, βακτήρια, ιούς και παράχει μηχανική προστασία στο κύτταρο και αποκλείει την είσοδο μεγαλύτερων μορίων στο ενδοκυττάριο

περιβάλλον. Η κυτταρική μεμβράνη επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στη στήριξη του κυτταροπλασματικού σκελετού, λειτουργία που προσδίδει σχήμα στο κύτταρο καθώς και στην προσκόλλησή του στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αλλά και σε άλλα κύτταρα βοηθώντας έτσι στο σχηματισμό των ιστών.

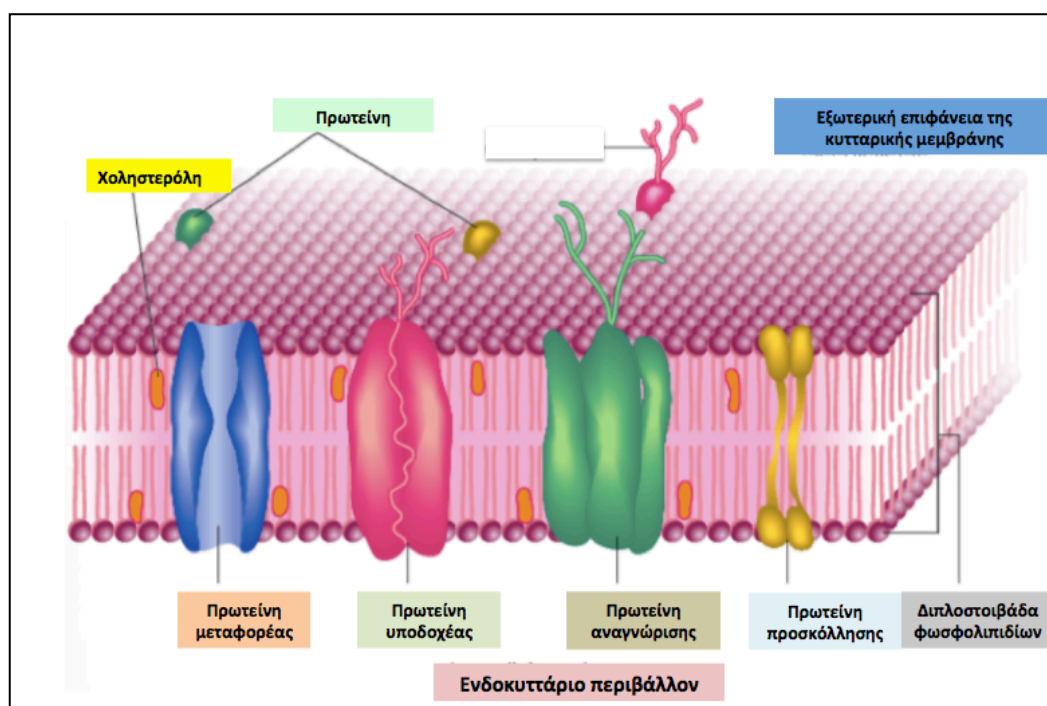
Το πλέον γνωστό μοντέλο απεικόνισης της δομής των κυτταρικών μεμβρανών, είναι των από τους Singer και Nicholson (1972), γνωστό και ως ρευστό μωσαϊκό (fluid mosaic model) [S. J. Singer and G.L. Nicholson, 1972]. Το μοντέλο αυτό αντικατέστησε το προηγούμενο των Davson and Danielli [Danielli, J. F.; Davson, H. 1935]. Οι βιολογικές μεμβράνες θα πρέπει να θεωρούνται δύο διαστάσεων ρευστοί σχηματισμοί στους οποίους λιπιδικά και πρωτεϊνικά μόρια διαχέονται κατά το μάλλον ή ήττον εύκολα. Η ονομασία αυτή περιγράφει την δομή της μεμβράνης. Στην σύνθεση των κυτταρικών μεμβρανών συμμετέχουν σε διαφορετικό ποσοστό τα εξής κύρια συστατικά: πρωτεΐνες (διαμεμβρανικές και επιφανειακές), λιπίδια, υδρογονάνθρακες, γλυκοπρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες και νερό. Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από δύο στρώματα φωσφολιπιδίων που περιέχουν και πρωτεϊνικά μόρια και περιτυλίγουν το κύτταρο. Οι πρωτεΐνες δεν είναι στατικές, αλλά διαχέονται εγκάρσια στο επίπεδο της μεμβράνης επιπλέοντας στο ρευστό σχηματισμό των λιπιδικών μορίων, δίνοντας της με αυτόν τον τρόπο την ρευστότητα (σχήμα 2).



Σχήμα 2: Κυτταρική μεμβράνη σε τρισδιάστατη απεικόνιση που περιλαμβάνει την λιπιδική διλοστοιβάδα και πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες των κυτταρικών μεμβρανών είναι : (1) οι πρωτεΐνες υποδοχείς οι οποίες υποδέχονται εξωτερικά από το κύτταρο μόρια, (2) οι πρωτεΐνες

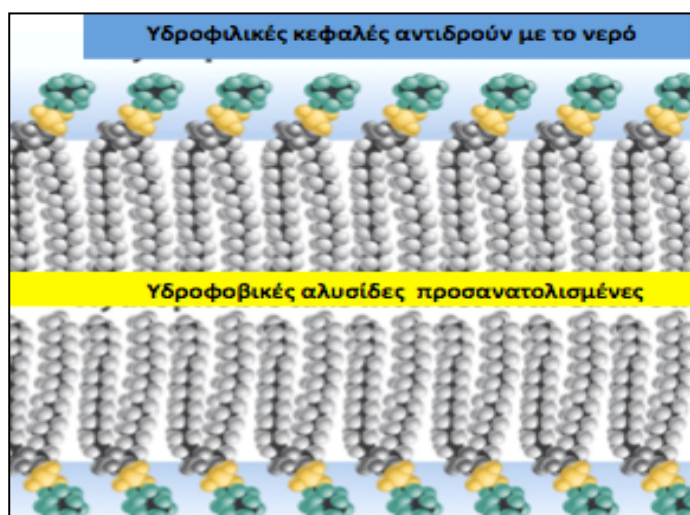
προσκόλλησης οι οποίες συμμετέχουν στην επικοινωνία των κυττάρων, (3) οι πρωτεΐνες αναγνώρισης που αναγνωρίζουν εξωτερικά μόρια και οι (4) πρωτεΐνες μεταφορείς που ρυθμίζουν την μετακίνηση του νερού και των διαλυτών μορίων μέσω της μεμβράνης (**σχήμα 3**). Τα εξωτερικά μόρια που αναφέρθηκαν, ονομάζονται μόρια διεγέρτες διότι προκαλούν αλλαγές στην χημική δομή των πρωτεϊνών μετά την αναγνώριση και διεγείρουν μια σειρά από άλλες αντιδράσεις. Μελέτες των μεμβρανών έδειξαν ότι κάποιες από τις πρωτεΐνες διατρέχουν την κυτταρική μεμβράνη από την μία πλευρά ως την άλλη και ονομάζονται «εσωτερικές» (intrinsic), ενώ άλλες συμπλέκονται μόνο με την επιφάνεια αυτής και ονομάζονται «εξωτερικές» (extrinsic) [P. Yeagle, 1992].



Σχήμα 3: Σχηματική δομή της κυτταρικής μεμβράνης με τα τέσσερα είδη πρωτεϊνών και τη διπλοστιβάδα των φωσφολιπιδίων

Περαιτέρω μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια διαφόρων τεχνικών [P. Yeagle, 1992], όπως τεχνικές περίθλασης ακτινών X και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, αποδεικνύουν ότι όλες οι μεμβράνες έχουν την ίδια βασική δομή. Αποτελούνται από μόρια που έχουν μία πολική περιοχή, την κεφαλή και δύο μη πολικές υδρογονανθρακικές αλυσίδες, με μήκος από 14 έως 20 άτομα άνθρακα. Τα

μόρια αυτά σχηματίζουν δύο αντικριστές μονοστιβάδες. Όταν η μεμβράνη βρίσκεται σε υδατικό περιβάλλον, οι μη πολικές αλυσίδες της κάθε μονοστιβάδας προσανατολίζεται η μία απέναντι στην άλλη σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο το υδρόφοβο εσωτερικό της μεμβράνης, ενώ οι πολικές κεφαλές της κάθε στιβάδας προσανατολίζονται προς το υδατικό περιβάλλον, σχηματίζοντας τις δύο υδρόφιλες επιφάνειες. Λόγω αυτής της δομής η κυτταρική μεμβράνη ονομάζεται Διστρωματική Λιπιδική Μεμβράνη (ΔΛΜ) (Bilayer Lipid Membrane) [M. Thompson, 1984] (σχήμα 4).



Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση της διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης με τις πολικές κεφαλές προς το υδατικό εξωκυττάριο περιβάλλον και τις μη πολικές κεφαλές προσανατολισμένες μεταξύ τους στο υδρόφοβο εσωτερικό της μεμβράνης

Η κυτταρική μεμβράνη είναι εκλεκτικά διαπερατή και ικανή να ελέγχει τι εισέρχεται στο ενδοκυττάριο περιβάλλον και τί εξέρχεται από αυτό. Η κίνηση των ουσιών διαμέσου της μεμβράνης μπορεί να είναι είτε παθητική (συμβαίνει χωρίς την κατανάλωση ενέργειας από το κύτταρο) είτε ενεργητική (χρειάζεται να καταναλωθεί ενέργεια από το κύτταρο). Η κυτταρική μεμβράνη κατ'αυτόν τον τρόπο δρα σαν εκλεκτικό φίλτρο το οποίο επιτρέπει συγκεκριμένες ουσίες να εισέρχονται ή να εξέρχονται του κυτταροπλάσματος. Οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούν οι βιολογικές μεμβράνες για τη μεταφορά ουσιών διακρίνονται:

1. Παθητική ώσμωση και διάχυση: Μερικές ουσίες (μικρά μόρια και ιόντα) όπως διοξείδιο (CO_2) και οξυγόνο (O_2), μπορούν να κινηθούν διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με διάχυση, που αντιπροσωπεύει παθητική διαδικασία μεταφοράς. Καθόσον η μεμβράνη λειτουργεί σαν φραγμός για συγκεκριμένα μόρια

και ιόντα, σχηματίζονται διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτών μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης. Η διαφορά συγκέντρωσης σε μια ημιδιαπερατή δομή (κυτταρική μεμβράνη εν προκειμένω) δημιουργεί ωσμωτική ροή νερού.

2. Διαμεμβρανικά πρωτεϊνικά κανάλια και μεταφορείς. Θρεπικά συστατικά όπως σάκχαρα και αμινοξέα, πρέπει να εισέλθουν στο ενδοκυττάριο περιβάλλον, ενώ προϊόντα μεταβολισμού πρέπει να εξέλθουν αυτού. Τέτοια μόρια διαχέονται παθητικά μέσω ‘πρωτεϊνικών καναλιών’, μέσω διευκολυνόμενης διάχυσης ή εξωθούνται διαμέσου της μεμβράνης με τους διαμεμβρανικούς μεταφορείς.

3. Ενδοκύτωση: Η διαδικασία με την οποία το κύτταρο απορροφά μόρια με το μηχανισμό της ενθυλάκωσης των από την μεμβράνη. Η ενδοκύτωση αποτελεί έτσι μηχανισμό που ‘εσωτερικοποιεί’ μακρομόρια, μικρομόρια ή ιόντα του εξωκυττάρου περιβάλλοντος, απαιτεί ενέργεια και έτσι χαρακτηρίζεται σαν ενεργός μηχανισμός μεταφοράς.

4. Εξωκύτωση: Πρόκειται περι μηχανισμού αντίθετου της ενδοκύτωσης, όπου ουσίες από το ενδοκυττάριο περιβάλλον εξωθούνται στο εξωκυττάριο. Με το μηχανισμό αυτό αποβάλλονται προϊόντα μεταβολισμού ή χρησιμοποιείται για την έκκριση ουσιών (πχ ορμονών, ενζύμων κλπ). Στη διαδικασία αυτή μικρές μεμβρανικές κοιλότητες σχηματίζόμενες στο εσωτερικό του κυττάρου και περιέχουν την προς έκκριση ή απέκκριση ουσία, έρχονται σε επαφή με το εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης. Τα λιπιδικά μόρια της διπλοστοιβάδας των λιπιδίων επανασυντάσσονται και κατόπιν ενώνονται. Με τον τρόπο αυτό έρχεται η προς έξοδο ουσία, μέσω των ενωμένων λιπιδικών μορίων στον εξωκυττάριο χώρο, διανύοντας το πάχος της κυτταρικής μεμβράνης.

Στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών υποδοχέων των μεμβρανών με τα μόρια διεγέρτες οφείλεται η ικανότητα ενός νευρικού κυττάρου να δέχεται και να μεταδίδει ερεθίσματα. Ο μηχανισμός με τον οποίο αυτές οι αλληλεπιδράσεις μετατρέπονται σε νευρικά ερεθίσματα δεν είναι γνωστός πλήρως. Σύμφωνα με τις επικρατούσες θεωρίες, ο μηχανισμός στηρίζεται στην διαφορετική περιεκτικότητα ιόντων (κυρίως καλίου) ανάμεσα στον εσωτερικό του κυττάρου χώρο και των εξωτερικό από το κύτταρο. Η αντλία ιόντων νατρίου- καλίου, η οποία αποτελεί το πλέον χαρακτηριστικό παράδειγμα πρωτεΐνης φορέα ενεργού μεταφοράς, διακινεί ενεργά (ενάντια στο ηλεκτροχημικό δυναμικό) το ιόν νατρίου έξω από το κύτταρο, ενώ ταυτόχρονα κινεί το ιόν καλίου μέσα σε αυτό. 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. Αν αυτή η αντλία σταματήσει να λειτουργεί ή εάν παρεμποδιστεί η λειτουργία της, τότε συσσωρεύονται ιόντα νατρίου μέσα στο κύτταρο, ενώ η συγκέντρωση των ιόντων καλίου μειώνεται. Αν ο εσωτερικός και ο εξωτερικός χώρος ενός νευρικού κυττάρου έχουν την ίδια περιεκτικότητα σε ιόντα καλίου, τότε αυτό το κύτταρο δεν μπορεί να δεχτεί ούτε να μεταδώσει ερεθίσματα. Τα τοπικά αναισθητικά κάνουν ακριβώς αυτή τη λειτουργία: παρεμποδίζουν προσωρινά τους μηχανισμούς με τους οποίους εξασφαλίζεται η διαφορετική περιεκτικότητα σε ιόντα καλίου μέσα και έξω από το κύτταρο και έτσι το κύτταρο 'ναρκώνεται'. [A. G. Lee, 2003].

1.4 Κανάλια Ιόντων

Μια μεγάλη ομάδα βιοαισθητήρων στηρίζει την λειτουργία τους στις μεταβολές του ηλεκτροχημικού δυναμικού σε συνθετικές λιπιδικές μεμβράνες, οι οποίες προσομοιάζουν λειτουργικά των φυσικών μεμβρανών. Οι μεταβολές αυτές πραγματοποιούνται με μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την μεταφορά ιόντων μέσω των καναλιών ιόντων.

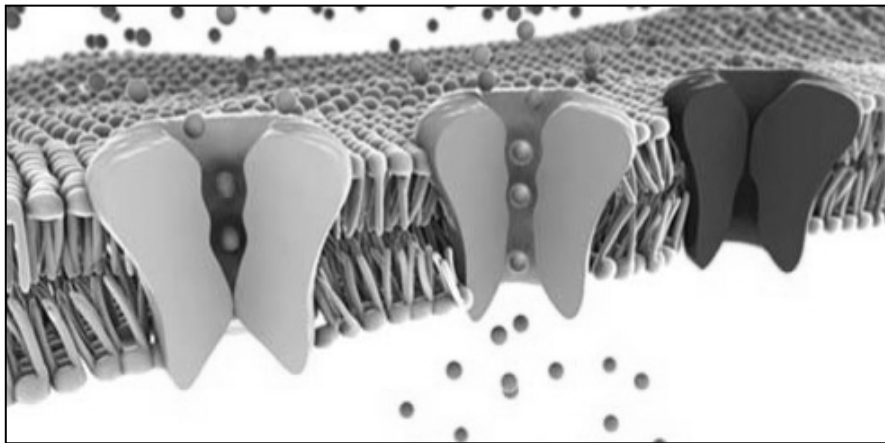
Όταν στην μεμβράνη υπάρχει ισορροπία δυναμικού (resting potential) υπάρχει και ισορροπία των ηλεκτρικών δυνάμεων επί των ιόντων. Στην κατάσταση αυτή δεν παρατηρείται ροή ιόντων και το διαμεμβρανικό δυναμικό παραμένει σταθερό. Ο συνδυασμός της εκλεκτικά διαπερατής κυτταρικής μεμβράνης και των σύνθετων μηχανισμών μεταφοράς, επιτρέπει στο κύτταρο να διατηρεί πολύ διαφορετικές συγκεντρώσεις ιόντων, στο εσωτερικό και στο εξωτερικό του, οι οποίες δημιουργούν αυτή την σταθερή διαφορά δυναμικού.

Το διπλό στρώμα της κυτταρικής μεμβράνης δεν είναι διαπερατό για τα ιόντα, επομένως η κίνηση των ιόντων μέσα και έξω από το κύτταρο γίνεται μέσω των καναλιών ιόντων (ion channel). Τα κανάλια ιόντων δηλαδή επιτρέπουν σε συγκεκριμένα ανόργανα ιόντα όπως τα ιόντα νατρίου και καλίου ή άλλες διαλυτές ουσίες να περάσουν μέσα από το διπλό λιπιδικό στρώμα με κατεύθυνση προς το εσωτερικό ή προς το εξωτερικό του κυττάρου. Η κατευθυντήρια δύναμη για αυτή την μεταφορά είναι η διαφορά του ηλεκτροχημικού δυναμικού που δημιουργείται λόγω των διαφορετικών συγκεντρώσεων των διαλυτών ουσιών στο εσωτερικό και το εξωτερικό του κυττάρου (**σχήμα 5**).

Τα κανάλια ιόντων ουσιαστικά είναι υδρόφιλοι πόροι που εκτείνονται διαμεμβρανικά και οι οποίοι μόλις ανοίξουν επιτρέπουν στα ιόντα να περάσουν από μέσα τους. Αποτελούνται δηλαδή από αγωγούς οι οποίοι μπορούν να ανοίγουν και να κλείνουν. Εμφανίζουν ιοντική επιλεκτικότητα, καθώς επιτρέπουν σε ορισμένα ανόργανα ιόντα να περάσουν και σε άλλα όχι. Η εκλεκτικότητα τους σε ορισμένα ιόντα βασίζεται: α) στο μέγεθος των ιόντων, β) στο φορτίο τους και γ) σε πολύπλοκες χημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται μέσα στο κανάλι [Alberts B 2002].

Τα κανάλια ιόντων δεν παραμένουν συνέχεια ανοιχτά, αλλά λειτουργούν σαν πύλες οι οποίες ανοίγουν για λίγο και στη συνέχεια κλείνουν. Η δέσμευση ενός μορίου διεγέρτη από μια πρωτεΐνη, συνοδεύεται από αλλαγές στην δομή και διαμόρφωση της τελευταίας και προκαλεί το άνοιγμα ενός αγωγίμου από ιόντα,

καναλιού ιόντων, κατά μήκος της λιπιδικής μεμβράνης. [K. Fisher, 1974]. Διαμέσου αυτού του καναλιού όπως αναφέρθηκε, τα ιόντα καλίου όπως και ένας μεγάλος αριθμός από άλλα ιόντα περνά από το εξωτερικό στο εσωτερικό του κυττάρου [I. Γεωργιάτος, 1989]. Τα ιόντα αυτά ουσιαστικά αποτελούν χημικά σήματα, τα οποία μέσω της μεμβράνης περνούν από το εξωτερικό περιβάλλον στο εσωτερικό του. Στην συνέχεια οι πληροφορίες αυτές περνούν στο νευρικό σύστημα.



Σχήμα 5: Κανάλια ιόντων τα οποία ελέγχουν τη ροή ιόντων διαμέσου της διπλοστοιβάδας της λιπιδικής μεμβράνης

Οι πρωτεΐνες υποδοχείς της μεμβράνης, αναγνωρίζοντας εκλεκτικά συγκεκριμένα μόρια, ανοίγουν το αγωγίμο από ιόντα κανάλι. Για να συμβεί όμως αυτό σημαίνει ότι προκαλούνται δυναμικές αλλαγές στα ηλεκτροστατικά πεδία στην επιφάνεια των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών. Οι μεταβολές στο ηλεκτρικό δυναμικό και την αγωγιμότητα της μεμβράνης προκαλούν και τις μεταβολές στα κανάλια ιόντων [Alberts B 2002] .

Οι έρευνες και οι μελέτες πάνω στην κατασκευή τεχνητών βιοαισθητήρων προσανατολίζονται στην προσπάθεια προσομοίωσης της κυτταρικής μεμβράνης και των μηχανισμών της. Η διεργασία της αναγνώρισης στο κύτταρο χαρακτηρίζεται από αυξημένη ταχύτητα, ευαισθησία και εκλεκτικότητα, ιδιότητες που επιδιώκεται να αποκτήσουν και οι τεχνητοί χημικοί αισθητήρες.

1.5 Είδη Βιοαισθητήρων

Η ταξινόμηση των βιοαισθητήρων μπορεί να γίνει με δύο τρόπους. Στον πρώτο τρόπο ταξινόμησης λαμβάνουμε υπόψη το είδος του φυσικοχημικού μεταλλάκτη. Στον δεύτερο τρόπο κατηγοριοποιούμε τους αισθητήρες με βάση τον βιολογικό υποδοχέα καθώς και τον τρόπο αλληλεπίδρασης του βιολογικού υποδοχέα [M. Vreeke, 1995] με την προσδιοριζόμενη ουσία. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ο παράγοντας βιοαναγνώρισης (υποδοχέας) συνήθως είναι ολόκληρο βιολογικό υλικό ή βιομόρια ή και βιομιμητικές, χημικές ουσίες. Είναι υπεύθυνος για την αναγνώριση (μέσω αντίδρασης) της προσδιοριζόμενης ουσίας. Ο φυσικοχημικός μεταλλάκτης μετατρέπει τις φυσικοχημικές μεταβολές που πραγματοποιούνται, εξαιτίας της αντίδρασης υποδοχέα και προσδιοριζόμενης ουσίας, σε αναλυτικό σήμα.

Παρακάτω παρατίθεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας κατάταξης βιοαισθητήρων (**Πίνακας 1**) ο οποίος θα αναλυθεί στην συνέχεια. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα με βάση την φυσικοχημική αρχή η οποία διέπει το σύστημα ανίχνευσης – τροποποιητή σήματος, οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε ηλεκτροχημικούς οι οποίοι μετρούν μεταβολές στις ηλεκτρικές παραμέτρους, οπτικούς, οι οποίοι μετρούν αλλαγές στις οπτικές παραμέτρους, πιεζοηλεκτρικούς, οι οποίοι μετρούν αλλαγές στην μάζα στην επιφάνεια ενός κρυστάλλου και θερμικούς, οι οποίοι υπολογίζουν την έκλυση ή απορρόφηση θερμότητας.

Ανάλογα με το είδος βιομορίων αναγνώρισης κατατάσσονται σε : α) ενζυμικούς βιοαισθητήρες όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα είναι ένζυμο β) ανοσοαισθητήρες όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα είναι αντίσωμα γ) DNA βιοαισθητήρες, όπου το ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα είναι κάποιο νουκλεϊκό οξύ, δ) κυτταρικούς βιοαισθητήρες ή βιοαισθητήρες μικροοργανισμών, όπου το βιολογικό τμήμα μπορεί να είναι κύτταρο ιστός ή 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 αναλυόμενης ουσίας, προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή επιλεκτικότητα.

Πίνακας 1: Κατηγορίες βιοαισθητήρων

Με βάση το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης	Με βάση την αρχή μεθόδου και του είδους του μεταλλάκτη ανίχνευσης
Ενζυμικοί-Ανοσοχημικοί	Ηλεκτροχημικοί (Ποτενσιομετρικοί, Αγωγιμομετρικοί, Αμπερομετρικοί)
Βασιζόμενοι σε υποδοχείς (βιολογικής συγγένειας, ΔΛΜ)	Οπτικοί (Απορρόφησης, Φθορισμού, Φωταύγειας, Οπτικές ίνες)
Βασιζόμενοι σε ιστούς και κύτταρα	Πιεζοηλεκτρικοί
	Θερμικοί

1.5.1 Αισθητήρες με βάση το μεταλλάκτη

A. Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι βιοαισθητήρες σε ηλεκτροχημικές αναλύσεις και διαγνωστικές μελέτες. Εφαρμόζονται κυρίως για την ανίχνευση συγκεντρώσεων γλυκόζης, για τον εντοπισμό υβριδικών τμημάτων DNA κ.α. Αποτελούνται από ηλεκτροχημικούς μεταλλάκτες σήματος (π.χ. ηλεκτρόδια). Οι βιοαισθητήρες αυτοί βασίζονται σε μια συνήθως ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση που οδηγεί στην παραγωγή ιόντων. Έχουν την δυνατότητα να απλοποιούν σημαντικά την μετατροπή του σήματος, χωρίς να χρειάζονται δαπανηρό εργαστηριακό εξοπλισμό. Με βάση τους ηλεκτροχημικούς μεταλλάκτες σήματος χωρίζονται περαιτέρω σε τρεις κατηγορίες : α) οι αμπερομετρικοί και βολταμετρικοί βιοαισθητήρες β) οι ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες και γ) οι αγωγιμομετρικοί βιοαισθητήρες [S. Zhao, 1991 ; G. Winter 1991].

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι είναι μια από τις πρώτες κατηγορίες ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων που χρησιμοποιήθηκαν, βασίζουν την λειτουργία τους στις διαδικασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων ή ιόντων. Το παραγόμενο σήμα προέρχεται από την ανταλλαγή ηλεκτρονίων μεταξύ του βιολογικού υλικού του ενεργού τμήματος ανίχνευσης του βιοαισθητήρα και του ηλεκτροδίου εργασίας. Η ανταλλαγή αυτή καταγράφεται και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της

αναλυόμενης ουσίας. Το ηλεκτρόδιο δηλαδή πολώνεται σε κάποια τιμή δυναμικού και παράγεται ηλεκτρικό ρεύμα, μέσω του οποίου προσδιορίζεται η αναλυόμενη ουσία. Αυτό που μετράει ουσιαστικά ο βιοαισθητήρας, είναι η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος [S. Zhao, 1991]. Το πρόβλημα με αυτού του είδους τους αισθητήρες είναι ότι πολλές φορές το ηλεκτροχημικά ενεργό σωματίδιο ή άλλα συστατικά που εμπλέκονται στην διαδικασία αναγνώρισης, υφίστανται οξείδωση ή αναγωγή στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας (συνήθως ηλεκτρόδιο Pt).

Όσον αφορά τους αγωγιμομετρικούς βιοαισθητήρες έχουμε μέτρηση των μεταβολών της αγωγιμότητας, η οποία εξαρτάται από τις μεταβολές στις συγκεντρώσεις των ιόντων, το φορτίο τους ή στην κινητικότητά τους, που παρατηρούνται κατά την βιολογική αναγνώριση. Ειδικά σε αραιά διαλύματα η συσχέτιση μεταξύ της μεταβολής της αγωγιμότητας και της μεταβολής της συγκέντρωσης ιόντων είναι σχεδόν γραμμική. Το είδος αυτό των βιοαισθητήρων θα μπορούσε να βρει εφαρμογή σε βιολογικά υγρά [G. Winter 1991]. Μπορούμε να μετρήσουμε τις τιμές αγωγιμότητας π.χ. στο αίμα ενός ασθενούς και να την συγκρίνουμε με τις τιμές στο αίμα ενός φυσιολογικού ατόμου. Το μειονέκτημα των αγωγιμομετρικών βιοαισθητήρων είναι ότι μέσα από τις μετρήσεις, δεν μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για τα είδη των ιόντων που υπάρχουν στο διάλυμα. Η χρησιμότητά τους βέβαια παραμένει, καθώς σε πολλά διαλύματα, όπως διάφορα βιολογικά υγρά, τα είδη των ιόντων είναι γνωστά. Επίσης, ένα άλλο μειονέκτημα είναι ότι οι μετρήσεις αγωγιμότητας παρουσιάζουν χαμηλή ευαισθησία.

Το τρίτο είδος ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων είναι οι ποτενσιομετρικοί. Ανήκουν στην κατηγορία των Εκλεκτικών Ηλεκτροδίων Ιόντων (EHI). Η διάταξη των αισθητήρων αυτών περιλαμβάνει ένα διάλυμα αναφοράς, στο οποίο η ενεργότητα του ιόντος που θέλουμε να μετρήσουμε είναι γνωστή και έχει σταθερή τιμή, καθώς και μια μεμβράνη η οποία παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς ορισμένα ιόντα [D. Skoog, 1982]. Η μεμβράνη διαχωρίζει το διάλυμα αναφοράς με το διάλυμα στο οποίο θέλουμε να μετρήσουμε την περιεκτικότητά του σε ένα ιόν. Αποτέλεσμα είναι να δημιουργείται μια διαφορά δυναμικού ανάμεσα στις δύο πλευρές της μεμβράνης, καθώς η ενεργότητα του ιόντος, για το οποίο η μεμβράνη παρουσιάζει εκλεκτικότητα, έχει διαφορετική τιμή στο υπό μέτρηση διάλυμα σε σχέση με το διάλυμα αναφοράς, όπου η τιμή είναι γνωστή. Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά στις ενεργότητες των δύο διαλυμάτων τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η διαφορά δυναμικού. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προσδιοριστεί η περιεκτικότητά του ιόντος στο άγνωστο διάλυμα. Οι

ποτενσιομετρικοί αισθητήρες ανήκουν στην κατηγορία των Εκλεκτικών Ηλεκτροδίων Ιόντων.

B. Πιεζοηλεκτρικοί βιοαισθητήρες

Η δεύτερη κατηγορία αισθητήρων μετά τους ηλεκτροχημικούς είναι οι πιεζοηλεκτρικοί (Piezoelectric). Στο είδος αυτό αισθητήρων αυτό που μετράμε είναι οι μεταβολές σε διάφορα μεγέθη ενός κύματος [E. Palecek, 1993] όπως είναι η συχνότητα, το πλάτος και η φάση. Οι όποιες μεταβολές σχετίζονται με την συγκέντρωση της υπό μέτρηση ουσίας.

Συγκεκριμένα, όταν η προσδιοριζόμενη ουσία αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα τότε διαταράσσεται το ηλεκτρικό πεδίο. Όταν διαταράσσεται το πεδίο στο πιεζοηλεκτρικό υλικό, επειδή σε όλη την επιφάνεια του υπάρχουν σταθεροποιημένα ηλεκτρόδια, προκαλείται παραμόρφωση (μηχανική) στο υπόστρωμα και δημιουργείται ακουστικό κύμα [E. Palecek, 1993]. Οι μεταβολές στα μεγέθη του ακουστικού κύματος προκαλούνται εξαιτίας της αλληλεπίδρασής του με μια ουσία που έχει αποθεθεί στην επιφάνεια των κρυστάλλων από τους οποίους αποτελούνται οι πιεζοηλεκτρικοί αισθητήρες. Οι βιοαισθητήρες αυτοί ουσιαστικά λειτουργούν σαν αισθητήρες μάζας, αφού η αλλαγή της μάζας των κρυστάλλων προκαλεί αλλαγές στην συχνότητα συντονισμού του εξωτερικά εφαρμοζόμενου κύματος το οποίο περνά δια μέσου της επιφάνειάς τους. Η σχέση ανάμεσα στην αλλαγή της μάζας στην επιφάνεια του κρυστάλλου και στην συχνότητα ταλάντωσής της είναι γραμμική.

Επειδή η λειτουργία των πιεζοηλεκτρικών αισθητήρων βασίζεται στην δημιουργία, την διάδοση και την μέτρηση ακουστικών κυμάτων στην επιφάνεια ενός κρυστάλλου, ονομάζονται και συσκευές Επιφανειακών Ακουστικών Κυμάτων (Surface Acoustic Wave devices).

Γ.Θερμικοί Βιοαισθητήρες

Στους θερμικούς βιοαισθητήρες ο προσδιορισμός της ουσίας στο διάλυμα, πραγματοποιείται με μετρήσεις της θερμότητας που εκλύεται κατά την πραγματοποίηση της βιοχημικής αντίδρασης [P. Bergveld, 1989]. Οι περισσότερες αντιδράσεις που περιλαμβάνουν βιολογικές ουσίες είναι εξώθερμες.

Οι τομείς εφαρμογής αυτού του είδους αισθητήρων είναι αρκετοί. Παράδειγμα αποτελούν τα συστήματα ροής, η ανάλυση δειγμάτων από το περιβάλλον και η ιατρική [P. Bergveld, 1988, S. Caras 1985]. Τις περισσότερες

φορές ο θερμικός αισθητήρας που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις, περιλαμβάνει έναν αισθητήρα θερμοκρασίας και έναν κατάλληλο βιοκαταλύτη (ένζυμο), για αυτό λέγεται και θερμίστορας ενζύμου (Enzyme Thermistor).

Δ. Οπτικοί Βιοαισθητήρες

Στους οπτικούς βιοαισθητήρες, οι οποίοι είναι μαζί με τους ηλεκτροχημικούς οι πιο ευρέως διαδεδομένοι, ανιχνεύεται αλλαγή στις οπτικές ιδιότητες είτε του βιολογικού μορίου ανίχνευσης παρουσία της αναλυόμενης ουσίας, είτε της ίδιας της αναλυόμενης ουσίας και αυτή η μεταβολή συσχετίζεται με την συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας. Παρατηρούνται κυρίως αλλαγές στην απορρόφηση ή τον φθορισμό. Οι μετρήσεις που πραγματοποιούνται με τους οπτικούς βιοαισθητήρες βασίζονται πολλές φορές στις οπτικές ίνες. Οι εφαρμογές ανίχνευσης ουσιών με οπτικές ίνες αυξάνονται συνεχώς. Παραδείγματα αποτελούν οι ανιχνεύσεις αντιγόνων, υποστρωμάτων και νουκλεϊνικών οξέων [K. Saini 1994; G. Alvarado-Urbina, 1981].

Τα πλεονεκτήματα αυτού του είδους βιοαισθητήρων είναι αρκετά. Καταρχήν υπάρχει η δυνατότητα της εξ αποστάσεως ανίχνευσης (remote sensing) καθώς, με την βοήθεια των οπτικών ινών, το σήμα μπορεί να μεταφερθεί σε μεγάλες αποστάσεις χωρίς απώλειες. Πολλές φορές στον τομέα της κλινικής χημείας γίνονται έρευνες με οπτικούς βιοαισθητήρες για την δημιουργία νέων φαρμάκων. Με την χρήση των αισθητήρων προσδιορίζονται οι αλληλεπιδράσεις βιομορίων (λίπη, DNA, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες) με υπό δοκιμή φάρμακα, άμεσα και χωρίς στάδια προκατεργασίας. Το υπό μέτρηση δείγμα, τοποθετείται συνήθως σε στρώμα δεξτράνης που βρίσκεται πάνω σε μεταλλική επιφάνεια, όπου σταθεροποιείται. Η αιτία της άμεσης ανίχνευσης είναι η εκλεκτικότητα που παρουσιάζει ο βιοαισθητήρας ως προς την προσδιοριζόμενη ουσία. Με τις κλασσικές μεθόδους ανάλυσης αντίθετα η διαδικασία είναι επίπονη και χρονοβόρα, καθώς τα προς ανάλυση βιομόρια συνήθως δεν βρίσκονται μόνα τους, αλλά προσκολλημένα σε βακτήρια, ιούς ή κύτταρα. Πρέπει για αυτό το λόγο να προηγηθεί των κλασσικών μεθόδων ανάλυσης, ο καθαρισμός, η απομόνωση και η διαλυτοποίηση των δειγμάτων.

1.5.2 Αισθητήρες με βάση τον παράγοντα βιοαναγνώρισης –Βιοαισθητήρες

A. Βιοαισθητήρες που έχουν σαν βάση λιπιδικές μεμβράνες

Η λειτουργία αυτών των βιοαισθητήρων στηρίζεται στις λιπιδικές μεμβράνες. Ο τρόπος λειτουργίας προσομοιάζει την λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών. Συγκεκριμένα επάνω στην μεμβράνη ακινητοποιούνται εκλεκτικά βιολογικά στοιχεία δέσμευσης (υποδοχείς), τα οποία διατηρούν σε μεγάλο βαθμό την εκλεκτική τους δυνατότητα. Ανάμεσα στον υποδοχέα και στην αναλυόμενη ουσία (προσδιοριζόμενη ουσία) πραγματοποιούνται μη ομοιοπολικές αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις [A. Michaloliakos 2011]. Ο σχηματισμός συμπλόκου υποδοχέα-αναλυόμενης ουσίας ή το προϊόν της χημικής αντίδρασης μεταβάλλει τις ηλεκτρικές ιδιότητες της λιπιδικής μεμβράνης. Τέτοιες ιδιότητες όπως είναι το δυναμικό, η ηλεκτρική αντίσταση ή η χωρητικότητα μπορούν να μετρηθούν με ηλεκτροχημικές μεθόδους. Επίσης είναι δυνατόν να μεταβληθούν άλλες οπτικές ιδιότητες που προσδιορίζονται με διάφορες οπτικές τεχνικές ή με λήψη φασμάτων.

Ο τύπος της λιπιδικής μεμβράνης που χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι οι διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες (ΔΛΜ). Οι μεμβράνες αυτές αποτελούνται από δύο αντικριστά στρώματα ακριβώς όπως και οι φυσικές μεμβράνες. Τα δύο στρώματα της μεμβράνης σχηματίζονται σε μια μικρή οπή από Teflon®, με την τεχνική της αναδίπλωσης της μονοστοιβάδας [D.P. Nikolelis, 1992].

B. Βιοαισθητήρες που βασίζονται σε αντισώματα ή σε άλλους υποδοχείς βιολογικής συγγένειας

Ένας μεγάλος αριθμός αντιδράσεων που γίνονται στην φύση και περιλαμβάνουν την διαδικασία βιολογικής αναγνώρισης, η οποία πραγματοποιείται με την επιλεκτική πρόσδεση στον υποδοχέα, είναι αντιδράσεις μεταξύ αντιγόνων και αντισωμάτων. Παράδειγμα αποτελούν ανοσογενικές αποκρίσεις που συνδέονται με φυσικές κυτταρικές μεμβράνες και οι οποίες έχουν οδηγήσει στην πραγματοποίηση διάφορων ερευνών που περιλαμβάνουν μελέτες τεχνητών λιπιδικών μεμβρανών [E. Toro-Goyco, 1966 ; K. P. O'Boyle 1984]. Η κατασκευή αυτού του είδους των βιοαισθητήρων βασίζονται στις εξειδικευμένες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους υποδοχείς (αντισώματα) και τις προσδιοριζόμενες ουσίες (αντιγόνα).

Η ανίχνευση της προσδιοριζόμενης ουσίας γίνεται εμμέσως ή αμέσως με την μέτρηση μεταβολών που συμβαίνουν σε διάφορα μεγέθη λόγω των αλληλεπιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος. Τα αντισώματα εμφανίζουν μεγάλη εκλεκτικότητα, εξαιρετική ευαισθησία και δημιουργία ισχυρών δεσμών. Η πολύ ισχυρή δέσμευση των αντισωμάτων με τα αντιγόνα, οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις μη αντιστρεπτές, με αποτέλεσμα οι βιοαισθητήρες που βασίζονται σε αυτά να είναι συνήθως μιας χρήσης. Το πρόβλημα επομένως στην δημιουργία και εκμετάλλευση αυτού του είδους των βιοαισθητήρων είναι να βρεθεί τρόπος αναγέννησης του ενεργού μέρους του αντισώματος, γιατί η αναπλήρωση των χημικών της συσκευής είναι κάτι που κοστίζει και είναι χρονοβόρα [F. F. Bier, 1994; F. F. Bier, R. Jockers, 1994]. Προσπάθειες για την δημιουργία συσκευών ανάλυσης που αναγεννούν το ενεργό αντίσωμα έχουν γίνει με την χρήση όξινων διαλυμάτων [R. M. Sutherland, 1984], παρόλα αυτά μπορεί και πάλι να αλλάξει προσωρινά η διαμόρφωση του αντισώματος και να απενεργοποιηθεί.

Στην θέση του υποδοχέα αντί για αντίσωμα μπορεί να είναι DNA ή RNA οπότε έχουμε μια άλλη κατηγορία βιοαισθητήρων τους DNA αισθητήρες. Στην περίπτωση αυτή στην θέση του αντιγόνου θα είναι μια μορφή DNA όπως π.χ. ένας μικροοργανισμός με χαρακτηριστική αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Οι βιοαισθητήρες DNA χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανίχνευση γενετικών ασθενειών και μολύνσεων από ιούς. Για την διεξαγωγή μετρήσεων με αυτούς τους αισθητήρες μελετώνται φαινόμενα όπως η μεταβολή στο ηλεκτροχημικό σήμα των βάσεων του DNA.

Γ. Βιοαισθητήρες που βασίζονται σε ιστούς ή και σε ολόκληρους μικροοργανισμούς

Στην περίπτωση αυτών των αισθητήρων, η εκλεκτική αντίδραση πραγματοποιείται από τα ενεργά συστατικά των κυττάρων, τα οποία βρίσκονται στο φυσικό τους περιβάλλον, δηλαδή σε μικροοργανισμούς ή σε ιστούς οργανισμών [C. Tran- Minh , 1979; S. Sasso, 1990 ; C. Rosa, 1995].

Στους βιοαισθητήρες μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται κυρίως τρεις μέθοδοι ανάλυσης. Στην πρώτη μέθοδο η αναλυόμενη ένωση λειτουργεί ως υπόστρωμα για την αναπνοή των μικροοργανισμών. Στην δεύτερη μέθοδο παρεμποδίζεται η αναπνευστική διαδικασία των μικροοργανισμών από την προς ανάλυση ένωση. Στην τρίτη μέθοδο γίνεται χρήση γενετικά τροποποιημένων

μικροοργανισμών (genetically engineered microorganisms-GMOs) οι οποίοι αναγνωρίζουν και ανιχνεύουν συγκεκριμένες ουσίες.

Οι συγκεκριμένοι αισθητήρες παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα των ενεργών συστατικών τους, καθώς τα κύτταρα βρίσκονται στο φυσικό τους περιβάλλον. Άλλο σημαντικό πλεονέκτημα που παρουσιάζουν είναι ότι δεν χρειάζεται να γίνει απομόνωση και καθαρισμός ενζύμων. Επίσης δεν απαιτούν ακριβά αντιδραστήρια, άρα έχουν χαμηλό κόστος λειτουργίας.

Το πρόβλημα είναι πολλές φορές η εκλεκτικότητά τους είναι μικρή σε σχέση με τα άλλα είδη βιοαισθητήρων όπως π.χ. τους βιοαισθητήρες αντισωμάτων όπου η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος είναι πλήρως εξειδικευμένη. Επίσης κατά την χρήση τους έχουν παρατηρηθεί και μεγάλοι χρόνοι απόκρισης, οπότε υπάρχει καθυστέρηση στην λήψη αποτελεσμάτων

Δ. Βιοαισθητήρες που βασίζονται σε ένα ένζυμο (βιοκαταλύτης)

Στην περίπτωση αυτή η προσδιοριζόμενη ουσία (υπόστρωμα) αντιδρά με το ένζυμο και προκύπτει ένα καινούριο προϊόν. Το προϊόν αυτό ανιχνεύεται και έτσι προκύπτει το αναλυτικό σήμα μέσα από το οποίο υπολογίζεται η συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας. Τα ένζυμα αποτελούν το πιο διαδεδομένο είδος βιολογικών μορίων που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Η μεγάλη εκλεκτικότητα, η καταλυτική δραστηριότητα και η γρήγορη κινητική των περισσότερων ενζύμων είναι τα σημαντικότερα πλεονεκτήματά που οδήγησαν στην ευρεία χρήση τους σε βιοαισθητήρες. Από την άλλη πλευρά μειονεκτήματα αποτελούν η αστάθεια πολλών ενζύμων και το υψηλό κόστος της μεθόδου.

Κατά την διάρκεια της ανάλυσης υπάρχουν δύο επιλογές ως προς την θέση του ενζύμου : μπορεί είτε να κινείται ελεύθερα στο διάλυμα, να βρίσκεται δηλαδή σε διαλυμένη μορφή, είτε να είναι ακινητοποιημένο. Ακινητοποίηση ενζύμων είναι ο περιορισμός τους σε τεχνητή στερεά φάση, η οποία διακρίνεται από την κύρια υγρή φάση, σχηματίζεται δηλαδή ένα ετερογενές σύστημα.

Στην περίπτωση της ακινητοποίησης έχουμε σημαντικά οφέλη [J. Clark, 1962]. Καταρχήν υπάρχει πλήρης διαχωρισμός του ακινητοποιημένου ενζύμου από το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται η προσδιοριζόμενη ουσία. Έτσι το αναλυόμενο διάλυμα δεν μολύνεται από διάφορα συστατικά του ενζύμου. Επίσης, όταν το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής. Αυτό σημαίνει τόσο ότι παραμένει σταθερό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, όσο και ότι διατηρεί την

δραστικότητα του. Λόγω της διατήρησης τους, τα ακινητοποιημένα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά επανάληψη μειώνοντας σημαντικά το κόστος.

Όλα τα παραπάνω πλεονεκτήματα οδηγούν στην άποψη ότι τα ακινητοποιημένα ένζυμα είναι σαφώς προτιμότερα για την κατασκευή νέων αναλυτικών οργάνων, όπως βιοαισθητήρες. Τα όργανα αυτά, που θα βασίζονται σε ένζυμα, θα έχουν σταθερότητα, επαναληπτικότητα, χαμηλότερο κόστος σε σχέση με τους βιοαισθητήρες ελεύθερων ενζύμων, ενώ στο τέλος των μετρήσεων δεν θα καταστρέφεται το προσδιοριζόμενο διάλυμα. Επομένως, εκτεταμένες μελέτες πραγματοποιήθηκαν ως προς τις τεχνικές ακινητοποίησης ενζύμων οι οποίες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες [P.W. Carr, 1980; R. Bernstein, 1985; J.S. Schultz, 1987; S. Weber 1992] : (α) τις τεχνικές που περιλαμβάνουν χημικές μεθόδους, όπου σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί είτε μεταξύ του ενζύμου και της επιφάνειας στήριξης, είτε μεταξύ των ίδιων των μορίων του ενζύμου, τα οποία στην περίπτωση αυτή σχηματίζουν τη βιοκαταλυτική στερεά φάση, το λεγόμενο διασταυρούμενο διαμοριακό πλέγμα (cross-linking) (β) στις μεθόδους που περιλαμβάνουν φυσικές τεχνικές όπου η ακινητοποίηση πραγματοποιείται με προσρόφηση (adsorption), τον εγκλωβισμό (entrapment) σε τεχνητό μικροπεριβάλλον π.χ. πλέγμα πολυμερούς και την ενθυλάκωση (encapsulation) (γ) στις υβριδικές τεχνικές που είναι συνδυασμός των δύο άλλων

Χαρακτηριστικό παράδειγμα χημικής ακινητοποίησης του ενζύμου είναι η αντίδραση των μορίων του ενζύμου με ένα διλειτουργικό αντιδραστήριο όπως είναι η γλουταραλδεϋδη. Με την βοήθεια του διλειτουργικού αντιδραστήριου δημιουργούνται διαμοριακές διασταυρούμενες συνδέσεις είτε μεταξύ των μορίων του ενζύμου, είτε μεταξύ ενός μορίου ενζύμου και ενός άλλου πρωτεϊνικού μορίου όπως η αλβουμίνη. Σχηματίζεται δηλαδή ένα διακλαδισμένο πολυμερές. Το ενζυματικό πολυμερές είτε σχηματίζεται απευθείας επάνω στην επιφάνεια του μεταλλάκτη (ο οποίος δίνει το αναλυτικό μετρήσιμο σήμα), είτε εγκλωβίζεται μηχανικά μεταξύ δύο πολυμερών ημιπερατών μεμβρανών, οι οποίες έρχονται σε επαφή με τον μεταλλάκτη. Στην πρώτη περίπτωση, δηλαδή του απευθείας σχηματισμού, έχουμε τον ταυτόχρονο σχηματισμό στοιβάδας υποστηρικτικού πολυμερούς, όπως είναι η οξική κυτταρίνη. Στην δεύτερη περίπτωση οι ημιπερατές μεμβράνες που εγκλωβίζουν το πολυμερές είναι φτιαγμένες από πολυκαρβονικά (polycarbonates) ή PVC ενώ είναι επικαλυμμένες από σιλικόνη. Η χημική σύσταση της κάθε μεμβράνης, καθορίζει αν θα υπάρχει εκλεκτικότητα ως προς το προϊόν ή το υπόστρωμα.

Ένας τρόπος φυσικής ακινητοποίησης είναι ο εγκλωβισμός του ένζυμου στην μάζα ενός πολυμερούς. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται με διάφορες μεθόδους. Το ένζυμο συνήθως παγιδεύεται στο πολυμερές κατά την διάρκεια του πολυμερισμού. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, όπως όταν για παράδειγμα ο πολυμερισμός γίνεται με θέρμανση, το ένζυμο προστίθεται μετά γιατί αλλιώς μπορεί να καταστραφεί. [R. Bernstein 1985; J.S. Schultz, 1987]. Τα ένζυμα παγιδεύονται μέσα στην μάζα του πολυμερούς κατά την διάρκεια του πολυμερισμού που πραγματοποιείται φωτοχημικά και με την σχηματιζόμενη πηκτή πολυμερούς-ένζυμου, επικαλύπτεται η επιφάνεια του μεταλλάκτη. Όταν ο πολυμερισμός γίνεται πάνω σε λιπιδικές μεμβράνες, η δομή του λιπιδίου γίνεται πιο εύκαμπτη λόγω της εισαγωγής του ένζυμου [D.P. Nikolelis, 2005; A.E. Aliaga, 2009; M. Briget Mary 2006; M. Szafran, 2006]. Είναι γνωστό ότι η εισαγωγή αυτή ομοίως αλλάζει την δομή του λιπιδίου σε πλέον ρευστή [Danielli, J, 1935].

Τα πολυμερή υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι το ελαστικό σιλικόνης, το αγάρ -αγάρ, το άμυλο και το πολυακρυλαμίδιο. Οι ουσίες αυτές είναι υδρόφιλες, αλλά αδιάλυτες στο νερό. Πολλές φορές χρησιμοποιούνται πολυμερή τα οποία στην δομή τους περιλαμβάνουν οξειδοαναγωγικές ομάδες όπως τα σύμπλοκα οσμίου, ή αγώγιμα πολυμερή όπως η (πολυ)πυρρόλη.

Η μέθοδος εγκλωβισμού σε πολυμερές παρουσιάζει ένα βασικό πλεονέκτημα, το ένζυμο διατηρεί την δραστηριότητά του μετά τις αναλύσεις, λόγω των ήπιων συνθηκών που επικρατούν. Το μειονέκτημα σε αυτή την μέθοδο είναι ότι μπορεί να έχουμε τον γρήγορο κορεσμό του ένζυμου, λόγω της μεγάλης ταχύτητας ροής του υποστρώματος προς το ένζυμο. Λόγω του κορεσμού περιορίζεται το εύρος της περιοχής γραμμικής απόκρισης. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να λυθεί με την δημιουργία σταυροδεσμών στο πολυμερές. Με τον τρόπο αυτό όχι μόνο εγκλωβίζονται στο πολυμερές τα ένζυμα, τα οποία έτσι και αλλιώς λόγω του μεγάλου μεγέθους τους δεν μπορούσαν να διαφύγουν, αλλά περιορίζεται και η διάχυση μικρότερου μοριακού μεγέθους ουσιών όπως το υπόστρωμα ή το προϊόν της αντίδρασης.

1.6 Πλεονεκτήματα Βιοαισθητήρων έναντι Κλασσικών Χημικών Αισθητήρων

Η ανίχνευση και η ανάλυση ουσιών σε φυσικά μείγματα είναι ένας από τους βασικότερους τομείς της αναλυτικής χημείας. Για να πραγματοποιηθεί αυτό είναι απαραίτητο ένα πλήθος οργάνων που εξυπηρετούν διάφορες μεθόδους διεξαγωγής αναλύσεων. Τέτοιες τεχνικές ανάλυσης είναι οι χρωματογραφίες, η φασματομετρία μάζας, η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης κλπ.. Με την χρήση των σύγχρονων οργάνων είναι δυνατόν να πραγματοποιείται ένας μεγάλος αριθμός ημερήσιων αναλύσεων φυσικών μειγμάτων. Υπάρχουν όμως δύο πολύ μεγάλα μειονεκτήματα στην διεξαγωγή αυτών των τεχνικών ανάλυσης: (α) το πολύ υψηλό κόστος των οργάνων (β) η ανάγκη ύπαρξης ειδικευμένου προσωπικού, το οποίο είναι απαραίτητο κυρίως για το στάδιο προκατεργασίας του δείγματος.

Τα παραπάνω προβλήματα μπορεί να ξεπεραστούν με την χρήση βιοαισθητήρων. Η απλοποίηση της μεθοδολογίας στηρίζεται στο γεγονός ότι ο προσδιορισμός ουσιών γίνεται *in situ* χωρίς την ανάγκη διαχωρισμού της προσδιοριζόμενης ουσίας από το υπόβαθρο του δείγματος. Έτσι εξαλείφεται η αναγκαιότητα του σταδίου της προκατεργασίας, καθιστώντας ικανή την χρήση τους από τον καθένα. Κατ' αυτόν τον τρόπο δεν υπάρχει η ανάγκη πρόσληψης εξειδικευμένου προσωπικού και άρα μειώνεται σε μεγάλο βαθμό το κόστος. Ένα επίσης ακόμα σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι ενώ δίνουν αποτελέσματα εξίσου ορθά και στο ίδιο μικρό χρονικό διάστημα με τις αναλυτικές μεθόδους (π.χ. αεριοχρωματογραφία) [R.P Buck, 1990], μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτόνομα για μετρήσεις και εκτός εργαστηρίου [M. Thompson, 1984], για μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο, για συνεχείς μετρήσεις και για μετρήσεις *in vivo*. Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα των βιοαισθητήρων είναι η εκλεκτικότητα, ο προσδιορισμός δηλαδή της ουσίας που είναι προς ανίχνευση χωρίς να παρεμποδίζονται οι μετρήσεις από άλλες ουσίες και η ευαισθησία, δηλαδή η ανιχνεύση ουσιών ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις.

Με τους βιοαισθητήρες είναι επίσης δυνατόν να μετρηθεί η αναλυόμενη ουσία με μεγάλη ακρίβεια. Η μοναδικότητά τους στηρίζεται στο ότι ο παράγοντας βιοαναγνώρισης και ο μετατροπέας είναι ενοποιημένα σε μία μόνο συσκευή. Αυτή η ένωση δίνει την δυνατότητα μετρήσεων χωρίς την χρήση αντιδραστηρίων. Ένα άλλο πλεονέκτημα των βιοαισθητήρων σε σχέση με άλλες βιοαναλυτικές μεθόδους

αποτελεί το γεγονός ότι το ακινητοποιημένο στοιχείο βιοαναγνώρισης μπορεί να αναστραφεί (αναγέννηση) και να ξαναχρησιμοποιηθεί. Επομένως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνεχείς ή πολλαπλές δοκιμές για μεγάλο διάστημα. Αντίθετα άλλες μέθοδοι όπως π.χ. η μέθοδος του ενζυμοσύνδετου ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), βασίζονται σε μη αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις και επομένως μετά τη χρήση τους απορρίπτονται, γεγονός που αυξάνει το κόστος [M. Franek, 1997].

Είναι προφανές ότι τα πλεονεκτήματα-χαρακτηριστικά στοιχεία των βιοαισθητήρων, τους κάνουν πολύ χρήσιμες συσκευές στη καθημερινή ιατρική πράξη καθώς με φθινό κόστος, με άριστη επαναληψιμότητα και σε πραγματικό χρόνο μπορεί να δίνουν μετρήσεις βιολογικών παραμέτρων. Αν αυτές οι συσκευές συνδυαστούν με άλλες που μπορεί να προσφέρουν θεραπευτική παρέμβαση στηριζόμενες στις μετρήσεις ενός βιοαισθητήρα (πχ έγχυση ινσουλίνης ή άλλου αντιδιαβητικού στοιχείου με μέτρηση του σακχάρου του αίματος *in vivo*), τότε γίνεται αντιληπτή η προσφορά τους σε εκατομμύρια ασθενείς.

1.7 Αρχές που διέπουν την κατασκευή του Βιοαισθητήρα

Ένας βιοαισθητήρας πρέπει να τηρεί ορισμένες προδιαγραφές τόσο ως προς την ουσία που προσδιορίζεται, όσο και ως προς το τελικό σήμα αλλά και τον τρόπο χειρισμού ώστε να είναι κατάλληλος για μετρήσεις και για να δίνει ορθά αποτελέσματα.

Όσον αφορά την προσδιοριζόμενη ουσία ο βιοαισθητήρας πρέπει να έχει ειδικότητα (να μην παρεμποδίζεται από άλλες ουσίες και από το υπόστρωμα), να μπορεί να την ανιχνεύει ακόμα και σε μικρά όρια (επιπέδου nM), ενώ θα πρέπει να έχει και γραμμική απόκριση όταν υπάρχει μεταβολή της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας. Όσον αφορά το τελικό σήμα που λαμβάνεται, αυτό θα πρέπει να έχει αξιοπιστία και για αυτόν τον λόγο θα πρέπει να γίνεται περιοδική βαθμονόμηση. Επίσης πρέπει να υπάρχει επαναληψιμότητα και ακρίβεια, ενώ το σήμα θα πρέπει να είναι ελεύθερο από ηλεκτρομαγνητικές επιδράσεις. Όσον αφορά τον τρόπο χειρισμού, πρέπει να υπάρχει βιοσυμβατότητα δηλαδή να μπορούν να γίνονται μετρήσεις *in vivo*. Επίσης θα πρέπει να υπάρχει ευκολία χειρισμού και να μπορούν να πραγματοποιηθούν μετρήσεις εκτός εργαστηρίου και σε πραγματικό χρόνο. Παράλληλα οι συσκευές και τα αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα για την λειτουργία του αισθητήρα, πρέπει να έχουν μικρό κόστος.

Μια άλλη κατηγοριοποίηση των χαρακτηριστικών ενός βιοαισθητήρα είναι ο διαχωρισμός τους σε στατικά και δυναμικά. Τα στατικά χαρακτηριστικά καθορίζουν την απόδοσή του σε μια σταθερή κατάσταση. Σε αυτά περιλαμβάνονται η ακρίβεια, τα σφάλματα (βαθμονόμησης, συστηματικά, τυχαία), η επαναληψτικότητα, η εκλεκτικότητα δηλαδή η ικανότητα αναγνώρισης ενός μοναδικού συστατικού μεταξύ άλλων συστατικών του ίδιου δείγματος και η ευαισθησία. Επίσης, πολύ σημαντικά στατικά χαρακτηριστικά είναι η σταθερότητα που εξαρτάται από το χρόνο ζωής του παράγοντα βιοαναγνώρισης και διαχωρίζεται σε σταθερότητα κατά την αποθήκευση (*storage stability*) και σταθερότητα κάτω από συνθήκες συνεχούς λειτουργίας (*operational stability*), ο χρόνος απόκρισης και η γραμμική απόκριση (είναι γενικά επιθυμητό η απόκριση ενός βιοαισθητήρα να μεταβάλλεται γραμμικά με το μετρούμενο μέγεθος). Εκτός από τα στατικά χαρακτηριστικά, τα οποία αναφέρονται στην κατάσταση όπου τα σήματα εσόδου και εξόδου δεν μεταβάλλονται πλέον

συναρτήσει του χρόνου, υπάρχουν και τα δυναμικά χαρακτηριστικά που περιγράφουν την συμπεριφορά του αισθητήρα όταν τα σήματα μεταβάλλονται.

Σε ένα πραγματικό βιοαισθητήρα η συμπεριφορά και τα χαρακτηριστικά του πάντα αποκλίνουν από το ιδανικό. Οι αιτίες είναι σφάλματα λόγω των ηλεκτρονικών κυκλωμάτων ή λόγω επιδράσεων του περιβάλλοντος.

1.8 Εφαρμογές των βιοαισθητήρων

Τα σημαντικά πλεονεκτήματα των βιοαισθητήρων τους καθιστούν πολύ χρήσιμα όργανα μέτρησης και ανίχνευσης ουσιών σε ποικίλους τομείς. Τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη και τελειοποίηση των συστημάτων τους, το πεδίο των εφαρμογών τους έχει διευρυνθεί. Στον **πίνακα 2** αναφέρονται ορισμένοι βασικοί τομείς που χρησιμοποιούνται βιοαισθητήρες .

Στην ιατρική η χρήση των βιοαισθητήρων μπορεί να βοηθήσει τόσο στον τομέα της διάγνωσης (με την μέτρηση διαφόρων ουσιών π.χ γλυκόζη στο αίμα) και την ακόλουθη σύγκριση των συγκεντρώσεων τους με τις συγκεντρώσεις σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις) όσο και στην θεραπεία. Ακόμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαγνωστικές in vivo εφαρμογές, για την παρακολούθηση της χημειοθεραπείας και για τον έλεγχο λειτουργίας τεχνητών οργάνων. Στην φαρμακευτική χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τον έλεγχο φαρμάκων, καθώς και για την ανακάλυψη και την πρόβλεψη της δράσης καινούριων φαρμακευτικών ουσιών. Οι βιοαισθητήρες υπερέχουν από άλλες μεθόδους ανίχνευσης και ελέγχου, καθώς χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα εφαρμογών, ευκολία στην χρήση και στην μετακίνηση, καθώς και ελέγχους πραγματικού χρόνου για ουσίες όπως φάρμακα, τοξίνες, ιοί.

Επίσης, βιοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διεξαγωγή ελέγχου ανίχνευσης άλλων ουσιών στο αίμα όπως ναρκωτικά, αλκοόλ καθώς και διεγερτικών ουσιών (π.χ. εφεδρίνη, ντοπαμίνη) στα ανθρώπινα ούρα. Οι εφαρμογές τους σε αυτούς τους τομείς διαγράφονται πολλές. Παραδείγματα αποτελούν οι έλεγχοι διαιτητικών σκευασμάτων καθώς και ο έλεγχος για doping στους αθλητές. Αποτελούν δε μία ελκυστική και ανταγωνιστική μέθοδο των χρωματογραφικών αναλύσεων [J.L.F.C. Lima, 1999; M. Marazuela, 1999] με πάρα πολλά πλεονεκτήματα.

Σε περιβαλλοντικές αναλύσεις χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό βιοαισθητήρες, καθώς η ευκολία στην μεταφορά και την χρήση τους, οι συνεχείς και σε πραγματικό χρόνο και τόπο αναλύσεις και το χαμηλό κόστος τους καθιστούν μία από τις καλύτερες μεθόδους ανίχνευσης διαφόρων ρύπων. Τα είδη των βιοαισθητήρων που χρησιμοποιούνται κάθε φορά διαφέρουν ανάλογα με το είδος των ρύπων, τις συνθήκες κ.τ.λ. Για παράδειγμα, μεταξύ των διαθέσιμων βιοαισθητήρων για

τον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων οι ενζυματικές μέθοδοι που βασίστηκαν στην αναστολή της χοληνεστεράσης, έχουν εφαρμοστεί ευρέως [P. Skladal, 1996; C. Tran-Minh, 1985; G.A. Evtugyn, 1998]. Επίσης, πιεζοηλεκτρικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με ακινητοποιημένα αντισώματα για την ανίχνευση και προσδιορισμό συγκεκριμένων φυτοφάρμακων και ναρκωτικών. Γενικά, οι βιοαισθητήρες στον τομέα των περιβαλλοντικών αναλύσεων καλύπτουν ένα μεγάλο αριθμό ενώσεων (π.χ. PCBs, βαρέα μέταλλα, χλωροφαινόλες) καθώς και μικροοργανισμών. Μια σημαντική εφαρμογή τους είναι οι γεωργικοί έλεγχοι, δηλαδή οι αναλύσεις υδατικών, εδαφικών, ζωικών ή φυτικών δειγμάτων για την ανίχνευση διαφόρων ουσιών όπως ρύποι, τοξικές ουσίες, φυτοφάρμακα, μικρόβια και άλλες. Το μεγάλο πλεονέκτημα των βιοαισθητήρων σε αυτές τις αναλύσεις είναι η υψηλή εξειδίκευση.

Πίνακας 2: Τομείς εφαρμογής βιοαισθητήρων

Τομέας	Παραδείγματα Εφαρμογών
Περιβάλλον	Διαχείριση αποβλήτων. Έλεγχος υδάτων για φυτοφάρμακα
Ασφάλεια	Έλεγχος για λαθρεμπόριο ναρκωτικών. Έγκαιρη προειδοποίηση χημικού/ βιολογικού πολέμου
Υγεία	Ατομικά συστήματα συναγερμού για τοξικές πτητικές ενώσεις
Ιατρική	Διάγνωση ασθενειών (δείκτες νόσων). Παρακολούθηση χημειοθεραπείας. Ανίχνευση ναρκωτικών στο αίμα. Έλεγχος λειτουργίας τεχνητών οργάνων.
Βιομηχανία	Έλεγχος ζυμωτήρων. Έλεγχος/Διασφάλιση ποιότητας παραγωγής προϊόντων. Διασφάλιση προδιαγραφών για περιβάλλον και ασφάλεια εργαζομένων.

Στον τομέα της βιομηχανίας χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο σε βιομηχανίες παραγωγής και ζυμώσεων, για να ελέγξουν την παραγωγή διαφόρων

ουσιών όπως π.χ. σάκχαρα, αμινοξέα, συντηρητικά, αντιβιοτικά και αντιμικροβιακές ουσίες. Η δυνατότητα που έχουν οι βιοαισθητήρες για αναλύσεις σε πραγματικό χρόνο αποτελεί το μεγάλο τους πλεονέκτημα για την χρήση τους σε τέτοιους ελέγχους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο έλεγχος των ζυμωτήρων στις βιομηχανίες ζύθου ή κρασιού για την παρακολούθηση αντιδράσεων παραγωγής αλκοόλης. Επίσης, ευρεία είναι η χρήση τους στον τομέα ελέγχου της παραγωγής και της ποιότητας των προϊόντων (π.χ. ποιοτικός έλεγχος τροφίμων). Άλλες εφαρμογές τους είναι οι αναλύσεις των βιομηχανικών αποβλήτων καθώς και ο προσδιορισμός διαφόρων ουσιών (συντηρητικά, βιταμίνες, γλυκαντικές ύλες κ.τ.λ.) σε ποτά και τρόφιμα. Βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται ακόμη και στον τομέα της ρομποτικής όπου οι τεχνικές αισθήσεις κυρίως γεύση και όσφρηση είναι απαραίτητες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΔΙΣΤΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

2.1 Ορισμός – Γενικές αρχές

Σημαντική πρόοδος έχει πραγματοποιηθεί τελευταία στον σχεδιασμό, τις αναλυτικές εφαρμογές και την σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων που βασίζονται σε λιπιδικές μεμβράνες [D. P. Nikolelis, 2005]. Οι βιοαισθητήρες με την λιπιδική μεμβράνη χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς χημικής αναγνώρισης που προσομοιάζουν με τους μηχανισμούς χημικής αναγνώρισης που λαμβάνουν χώρα στις εξωτερικές μεμβράνες των κυττάρων των φυσικών οργανισμών, τις κυτταρικές μεμβράνες.

Όπως έχει αναφερθεί, το πιο γνωστό μοντέλο απεικόνισης της δομής των κυτταρικών μεμβρανών, είναι αυτό που προτάθηκε το 1972 από τους Singer και Nicholson, γνωστό ως ρευστό μωσαϊκό (fluid mosaic) [M. Thompson and U.J. Krull, 1984]. Η ονομασία αυτή περιγράφει και την δομή της μεμβράνης. Η μεμβράνη αποτελείται από πρωτεΐνες και λιπιδικά μόρια. Οι πρωτεΐνες δεν είναι στατικές, αλλά διαχέονται εγκάρσια στο επίπεδο της μεμβράνης επιπλέοντας στη 'θάλασσα' των λιπιδικών μορίων, δίνοντας της με αυτόν τον τρόπο την ρευστότητα. Χρησιμοποιώντας τεχνικές περίθλασης ακτινών X και ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπιστώθηκε ότι όλες οι κυτταρικές μεμβράνες έχουν την ίδια βασική δομή, αποτελούμενες από δύο αντικριστές μονοστοιβάδες που περιέχουν αμφίφιλα μόρια [F.T Hong, 1989; U.J. Krull, 1985]. Τα μόρια αυτά αποτελούνται από μία πολική περιοχή (κεφαλή) και δύο μη πολικές υδρογονανθρακικές αλυσίδες με μήκος από 14 έως 20 άτομα άνθρακα. Σε υδατικό περιβάλλον, οι αλυσίδες αυτές προσανατολίζονται η μία απέναντι στην άλλη, σχηματίζοντας έτσι ένα υδρόφοβο εσωτερικό στην μεμβράνη, ενώ οι πολικές κεφαλές κατευθύνονται προς το υδατικό περιβάλλον, σχηματίζοντας τις δύο υδρόφιλες επιφάνειες. Αυτή η διάταξη χαρακτηρίζεται **Διστρωματική Λιπιδική Μεμβράνη (ΔΛΜ)** (σχήμα 3 & 4).

Οι φυσικές ΔΛΜ, οι οποίες αποτελούν την βάση λειτουργίας των συνθετικών οι οποίες εφαρμόζονται στους βιοαισθητήρες, αποτελούν ακόμα αντικείμενο ερευνών ως προς τον τρόπο λειτουργίας τους. Στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών υποδοχέων των μεμβρανών με τα μόρια διεγέρτες οφείλεται η ικανότητα ενός νευρικού κυττάρου να δέχεται και να μεταδίδει ερεθίσματα. Ο μηχανισμός με τον οποίο αυτές οι αλληλεπιδράσεις μετατρέπονται σε νευρικά ερεθίσματα δεν είναι γνωστός πλήρως.

Η δέσμευση ενός μορίου διεγέρτη από μια πρωτεΐνη, συνοδεύεται από αλλαγές στην δομή και διαμόρφωση της λιπιδικής μεμβράνης και προκαλεί το άνοιγμα ενός αγωγίμου από ιόντα καναλιού, (ion channel), κατά μήκος της τελευταίας. Διαμέσου αυτού του καναλιού, τα ιόντα καλίου όπως και ένας μεγάλος αριθμός από άλλα ιόντα περνά από το εξωτερικό στο εσωτερικό του κυττάρου. Η μεταφορά των ιόντων πραγματοποιείται υπό την επίδραση χημικού ή ηλεκτροχημικού δυναμικού. Η δίοδος αυτή των ιόντων είναι φορέας χημικού σήματος, και κατ' αυτόν τον τρόπο, εξωκυτταρικά γεγονότα μετατρέπονται σε ενδοκυτταρικά σήματα και πληροφορίες, τα οποία στην συνέχεια διοχετεύονται στο νευρικό σύστημα.

Το βασικό χαρακτηριστικό στοιχείο της συγκεκριμένης κυτταρικής λειτουργίας, στο οποίο βασίζεται και η λειτουργία των βιοαισθητήρων, είναι ότι όλος ο μηχανισμός βασίζεται στην εκλεκτική αναγνώριση των διαφόρων υποστρωμάτων. Μετά την αναγνώριση, προκαλούνται δυναμικές αλλαγές στα ηλεκτροστατικά πεδία στην επιφάνεια των ΔΛΜ. Οι μεταβολές στο ηλεκτρικό δυναμικό και την αγωγιμότητα της μεμβράνης προκαλούν και τις μεταβολές στην αγωγιμότητα των καναλιών ιόντων. Αντίστοιχα στους βιοαισθητήρες οι ηλεκτρικές μεταβολές στην επιφάνεια των μεμβρανών δίνουν τα μετρήσιμα αναλυτικά σήματα, μέσα από τα οποία προσδιορίζεται η συγκέντρωση του υποστρώματος [*D. P. Nikolelis, N. Psaroudakis, 2005*].

Τελευταίες έρευνες έχουν ανατρέψει παλιότερες μελέτες σύμφωνα με τις οποίες, μόνο οι πρωτεΐνες υποδοχείς και τα ιοντικά κανάλια έχουν ενεργό ρόλο στην χημεία αναγνώριση, ενώ η λιπιδική μεμβράνη έχει μόνο υποστηρικτικό ρόλο με αποστολή την διατήρηση της ενεργότητας των πρωτεϊνών. Σήμερα αρκετοί ερευνητές υποστηρίζουν την άποψη ότι η μεμβράνη συμμετέχει ενεργά στην όλη διαδικασία, μέσω των αλλαγών που πραγματοποιούνται στην δομή της.

2.2 Αρχές Λειτουργίας των Διστρωματικών Λιπιδικών Μεμβρανών

Ο μηχανισμός λειτουργίας των συνθετικών διστρωματικών μεμβρανών προσομοιάζει με αυτόν των φυσικών κυτταρικών μεμβρανών. Σε αυτές ο διεγέρτης είναι η προσδιοριζόμενη ουσία, ενώ ο υποδοχέας είναι ένα βιομόριο αναγνώρισης (π.χ. αντίσωμα, ένζυμο) που βρίσκεται προσκολλημένο στην μεμβράνη. Η αναγνώριση συνοδεύεται από αλλαγές στην δομή και διαμόρφωση της και προκαλεί το άνοιγμα ενός αγωγίμου από ιόντα καναλιού, καναλιού ιόντων (ion channel), κατά μήκος της. Ένας μεγάλος αριθμός ιόντων δεπερνά διαμέσου αυτού του καναλιού από την λιπιδική διπλοστοιβάδα [I. Γεωργιάτσου 1989].

Οι ομοιότητες του μηχανισμού λειτουργίας των συνθετικών μεμβρανών με τον τρόπο λειτουργίας της πλασματικής μεμβράνης των φυσικών κυττάρων είναι προφανής. Συγκεκριμένα τα εκλεκτικά βιολογικά στοιχεία δέσμευσης (υποδοχείς) που ακινητοποιούνται επάνω στην μεμβράνη, διατηρούν σε μεγάλο βαθμό την εκλεκτική τους δυνατότητα. Ανάμεσα στον υποδοχέα και στον υποκαταστάτη (προσδιοριζόμενη ουσία) πραγματοποιούνται μη ομοιοπολικές αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις [A. Michaloliakos, G. Nikoleli, 2011]. Ο σχηματισμός συμπλόκου υποδοχέα-υποκαταστάτη ή προϊόντος χημικής αντίδρασης, ενδέχεται να μεταβάλλει την φυσική ή ηλεκτροστατική δομή της μεμβράνης και να προκαλέσει το άνοιγμα των ιοντικών καναλιών. Ο μεγάλος αριθμός ιόντων που μπορεί να διαπεράσει την μεμβράνη μέσα από αυτά τα κανάλια, ακολουθεί μια βαθμίδα ηλεκτροχημικού δυναμικού [M. Thompson and U.J. Krull, 1984].

Ο σχηματισμός συμπλόκου υποδοχέα-υποκαταστάτη ή το προϊόν της χημικής αντίδρασης μεταβάλλει τις ηλεκτρικές ιδιότητες της λιπιδικής μεμβράνης. Τέτοιες ιδιότητες όπως είναι το δυναμικό, η ηλεκτρική αντίσταση ή η χωρητικότητα μπορούν να μετρηθούν με ηλεκτροχημικές μεθόδους. Για παράδειγμα σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες υποστηριζόμενες πάνω σε ένα πολυμερικό σώμα χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές για την ανάπτυξη μιας απλής μεθόδου για την γρήγορη ηλεκτροχημική ανίχνευση του καρβοφουράνιου. [D.P. Nikolelis, M.G Simantiraki, 2005]

Σε ορισμένες περιπτώσεις, μεταβολές των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μεμβρανών ως συνέπεια των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα λόγω της αλληλεπίδρασης υποδοχέα-υποκαταστάτη, είναι δυνατόν να προσδιορισθούν και με

οπτικές-φασματοσκοπικές τεχνικές. Στις περιπτώσεις αυτές οι διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες, με κατάλληλες τροποποιήσεις καθίστανται φωτοευαίσθητες. Παράδειγμα αποτελούν οι σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες που παρασκευάζονται με πολυμερισμό του μεθυλακρυλικού οξέος, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σαν οπτικοί ανιχνευτές για την ντοπαμίνη ή εφεδρίνη [D. P. Nikolelis, N. Psaroudakis, 2005; Young-Rok Kim, Sungho Jung 2012].

Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η ιοντική διαπερατότητα της μεμβράνης είναι αυξημένη και έτσι το τελικό αναλυτικό σήμα είναι ενισχυμένο. Όταν για παράδειγμα έχουμε δημιουργία συμπλόκου ανάμεσα στον υποδοχέα και την αναλυόμενη ουσία, παρατηρείται μια πολύ μεγάλη αύξηση του ιοντικού φορτίου που διαπερνά την μεμβράνη. Η διαπερατότητα της μεμβράνης σε ιόντα και συνεπώς η ένταση του τελικού σήματος συσχετίζονται και με την δομή της μεμβράνης. Έτσι, μεμβράνες που έχουν μεγάλο αριθμό δομικών ατελειών έχουν μεγάλη διαπερατότητα, διότι οι τελευταίες αποτελούν πόρους από όπου μεταφέρονται παθητικά τα ιόντα. Η διαπερατότητα μπορεί να αυξηθεί και τεχνητά με τροποποίηση της δομής της. Τέτοιες αλλαγές πραγματοποιούνται στις περιπτώσεις που το αρχικό σήμα είναι πολύ ασθενές. Η εισαγωγή κάποιας υδρόφιλης/πολικής δραστικής ομάδας στην ακυλική (υδρόφοβη) περιοχή της διπλοστοιβάδας, είναι δυνατόν να οδηγήσει στην δημιουργία αναλυτικού σήματος ή να συντελέσει στην ενίσχυση του, καθώς αυξάνει την διαπερατότητα [J. C. Weaver, C.L. Cooney, 1976]. Για παράδειγμα ενώσεις σαν το 10-υδροξυστεατικό οξύ αυξάνουν την ιοντική διαπερατότητα μιας μεμβράνης, εξαιτίας της εισαγωγής πολικών περιοχών στο υδρόφοβο εσωτερικό της, με αποτέλεσμα η όδευση των ιόντων να ευνοείται λόγω των πολικών αλληλεπιδράσεων με τις ομάδες υδροξυλίου.

2.3 Πλεονεκτήματα -Μειονεκτήματα Βιοαισθητήρων με συνθετικές Διστρωματικές Λιπιδικές Μεμβράνες έναντι φυσικών μεμβρανών

Οι συνθετικές διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες με σκοπό την ανάπτυξη βιοαισθητήρων [C. L. Poglitsch, 1991; Ch. Striebel 1994], έχουν είτε την μορφή κυψελίδων [K. Balakrishnan, 1982; A. Petrossian 1984], ή είναι μεμβράνες στηριζόμενες σε στερεά υποστρώματα [Young-Rok Kim, Sungho Jung, 2012]. Με την χρήση των επίπεδων λεπτών (φύλλων) μεμβρανών αλλά και κυψελιδικών μεμβρανών επιτυγχάνονται αρκετά πλεονεκτήματα, όπως είναι ο μικρός χρόνος που απαιτείται για την ανάλυση, καθώς είναι μικρός ο χρόνος απόκρισης της μεμβράνης. Οι μικροί χρόνοι απόκρισης οφείλονται στο γεγονός ότι το πάχος των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών, που αποτελούν τους φορείς των υποδοχέων οι οποίοι πραγματοποιούν την χημικά εκλεκτική αντίδραση είναι πολύ μικρό, της τάξης των μερικών nm, ενώ η ζώνη αντίδρασης μπορεί να είναι ακόμη λεπτότερη. Άλλο πλεονέκτημα είναι η υψηλή εκλεκτικότητα γεγονός που δίνει την δυνατότητα άμεσων μετρήσεων σε δείγματα αφού πολλές φορές οι παρεμποδίσεις είναι μικρές. Επίσης το μέγεθος των βιοαισθητήρων είναι μικρό, κάτι που έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη και φορητών βιοαισθητήρων οι οποίοι χρησιμεύουν στην ανίχνευση αναβολικών [D. P. Nikolelis, D. A. Drivelos, 2004].

Όσον αφορά το τελικό σήμα που λαμβάνουμε, υπάρχει ευαισθησία για μια μεγάλη ποικιλία αναλυόμενων ουσιών. Η μεγάλη ευαισθησία οφείλεται στο γεγονός ότι η δέσμευση ενός μορίου προσδιοριζόμενης ουσίας από έναν υποδοχέα, οδηγεί στην μετακίνηση μέσα απ' την μεμβράνη μεγάλου αριθμού ιόντων. Αποτέλεσμα είναι ότι η ιοντική διαπερατότητα αυξάνει πολλές φορές πάνω από την βασική της τιμή, επιτυγχάνοντας συντελεστές ενίσχυσης μέχρι και της τάξεως του 1:100.000. Έτσι το τελικό σήμα υφίστανται σημαντική ενίσχυση, ενώ έχει και γραμμικότητα στην απόκριση ως προς την συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ουσιών σε ένα δείγμα. Επίσης, υπάρχει ευελιξία στην χρήση διαφόρων μεταλλακτών ανάλογα με το ζητούμενο είδος των λαμβανόμενων σημάτων, καθώς και ευκολία στις μετρήσεις [K. Balakrishnan, S. Q. Mehdi, 1982]. Για παράδειγμα οι αισθητήρες αυτού του τύπου μπορούν να εφαρμοσθούν για τον *in vivo* προσδιορισμό φαρμάκων και μεταβολιτών, λόγω του γεγονότος ότι έχουν παρόμοια δομή και λειτουργία με τις φυσικές μεμβράνες. Τέλος ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα είναι το χαμηλό κόστος. Στην

βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί παραδείγματα όπου οι ΔΛΜ μπορούν να αποτελέσουν την βάση για φθηνούς βιοαισθητήρες σε συνδυασμό με την μικροηλεκτρονική και την τεχνολογία των τρανζίστορ τύπου FET [U.J. Krull, M. Thomson, 1985].

Αν και έχει αρκετά πλεονεκτήματα ένας βιοαισθητήρας ΔΛΜ, δεν έχει καταστεί ακόμη δυνατή η κατασκευή ενός τέτοιου αναλυτικού οργάνου. Αυτό οφείλεται κυρίως στην μηχανική και ηλεκτρική αστάθεια των φωσφολιπιδικών διπλοστοιβάδων, αστάθεια που είναι συνέπεια του πολύ μικρού πάχους τους. Έτσι, η έρευνα πάνω σε αυτά τα συστήματα, περιστρέφεται και γύρω από την εξεύρεση τρόπων σταθεροποίησης των μεμβρανών. Σημαντική πρόοδος έχει πραγματοποιηθεί τελευταία στον σχεδιασμό, τις αναλυτικές εφαρμογές και την σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων που βασίζονται σε λιπιδικές μεμβράνες [D. P. Nikolelis, N. Psaroudakis, 2005 ; D. P. Nikolelis, D. A. Drivelos, 2004].

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, από τα βασικότερα μειονεκτήματα, είναι η μικρή σταθερότητα των λιπιδικών μεμβρανών, η οποία οφείλεται στην δομή τους. Συγκεκριμένα οι δύο λιπιδικές στοιβάδες από τις οποίες αποτελούνται είναι μικρού πάχους και ενώνονται μεταξύ τους με τις ασθενείς δυνάμεις Van der Waals. Επομένως, θα πρέπει να βρεθούν τρόποι που θα επιτρέψουν την σταθεροποίηση των μεμβρανών διατηρώντας την βιομιμητική τους ιδιότητα [M. Sugawara, K. Kojima, 1987]. Για παράδειγμα, η σταθεροποίηση των ΔΛΜ πάνω σε φίλτρα με μικροπόρους (κατασκευασμένα από υαλονήματα) [D. P. Nikolelis, C. G. Siontorou, 1995] επέτρεψε την διεξαγωγή πειραμάτων που πραγματοποιούνται με έγχυση, με την μορφή ενέσεων, του αντιγόνου του οποίου θέλουμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση, σε ρέοντα διαλύματα, των οποίων η ροή διακόπτεται κατά διαστήματα. [D.P. Nikolelis, C.G. Siontorou, 1995].

Η ανάγκη για διατήρηση της σταθερότητας της μεμβράνης, οδηγεί στην χρήση ευαίσθητων τεχνικών λήψης σήματος όπως είναι η ηλεκτροχημεία [K. Fisher and D. Branton, 1974] και η φασμαφωτομετρία. Με τις τεχνικές αυτές επιτυγχάνουμε την λήψη του σήματος, ενώ ταυτόχρονα διατηρείται η σταθερότητα, η εκλεκτικότητα και η βιομιμητική ικανότητα της μεμβράνης. [M. Sugawara, K. Kojima, 1987]. Ηλεκτροχημικές μετρήσεις γίνονται με το μεταβαλλόμενο εφαρμοζόμενο δυναμικό που μπορεί και εφαρμόζεται στα άκρα μιας μεμβράνης ώστε παραγόμενα ιόντα από μια καταλυτική αντίδραση να ωθούνται να διαπεράσουν μια μεμβράνη (π.χ. ιόντα ηλεκτρολύτη), αλλά και υπό σταθερό δυναμικό όταν τα ιόντα προέρχονται από αντιδράσεις συγγενείας διαπερνώντας αυθόρμητα το μεμβρανικό ιστό [A. Arya,

U.J.Krull, 1985]. Στις περιπτώσεις που έχουμε δημιουργία συμπλόκου ανάμεσα στον υποδοχέα και την αναλύομενη ουσία, παρατηρείται μια πολύ μεγάλη αύξηση του ιοντικού φορτίου που διαπερνά την μεμβράνη.

2.4 Υλικά Σχηματισμού Συνθετικών Διστρωματικών Λιπιδικών Μεμβρανών

Τα υλικά σχηματισμού συνθετικών ΔΛΜ μπορούν να καταταγούν σε τρεις κατηγορίες: αυτά που περιέχουν χαρακτηρισμένα φωσφολιπίδια, αυτά που περιέχουν μικτά συστατικά λιπιδίων και διαλύματα που δεν περιέχουν φωσφολιπίδια. Ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα φαίνονται στον **Πίνακα 3**

Ενώσεις που τροποποιούν τις ιδιότητες των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών χρησιμοποιούνται πολλές φορές σαν συστατικά για την σύνθεση των στοιβάδων τους. Για παράδειγμα όπως έχει αναφερθεί, ενώσεις σαν το 10-υδροξυστεατικό οξύ αυξάνουν την ιοντική διαπερατότητα μιας μεμβράνης, εξαιτίας της εισαγωγής πολικών περιοχών στο υδρόφοβο εσωτερικό της, με αποτέλεσμα η όδευση των ιόντων να ευνοείται λόγω των πολικών αλληλεπιδράσεων με τις ομάδες υδροξυλίου [R. Leventis, J. Gange, 1986; J. D. Brennan, D.P. Nikolelis, 1993]. Δηλαδή η αγωγιμότητα των ΔΛΜ, που καθορίζεται από μέγεθος του υφιστάμενου ενεργειακού φράγματος για την διέλευση ιόντων μέσα από το υδρόφοβο εσωτερικό τους [U.J. Krull, 1987], εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την χημική τους σύσταση [M. Smyth and J. Vos, 1987]. Άλλες ενώσεις, όπως για παράδειγμα η χοληστερόλη χρησιμοποιούνται γιατί αυξάνουν την μηχανική σταθερότητα της μεμβράνης. Οι ενώσεις αυτές αυξάνουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ακυλικών αλυσίδων, που βρίσκονται στο εσωτερικό της διπλοστοιβάδας, με αποτέλεσμα οι δύο στοιβάδες να πλησιάζουν περισσότερο, να μειώνεται η ρευστότητα στο εσωτερικό τους και να αυξάνει η σταθερότητα. Το πρόβλημα είναι ότι ταυτόχρονα μειώνεται και η ιοντική διαπερατότητα, λόγω της ακαμψίας που αποκτά η μεμβράνη. Η χρήση διαφόρων άλλων ενώσεων σαν συστατικά των διπλοστοιβάδων, μπορεί να οδηγήσει και στην τροποποίηση ενός πλήθους άλλων ιδιοτήτων όπως είναι η διηλεκτρική σταθερά του εσωτερικού της διπλοστοιβάδας, οι αλληλεπιδράσεις των πολικών κεφαλών, το πάχος, το επιφανειακό δυναμικό.

Σημαντικό ρόλο στις μελέτες και στην διεξαγωγή μετρήσεων έχει και η σύσταση των ηλεκτρικών διαλυμάτων που βρίσκονται εκατέρωθεν της διπλοστοιβάδας της μεμβράνης. Καταρχήν τα φωσφολιπίδια δεν αφήνονται σε ελεύθερη διασπορά σε υδατικά διαλύματα, γιατί τότε τείνουν να σχηματίζουν μικκύλια. Με διάφορους μεθόδους σχηματισμού τα φωσφολιπίδια τείνουν να

σχηματίσουν επίπεδες διπλοστοιβάδες, με τα λιπόφιλα τμήματα τους να προσανατολίζονται στο εσωτερικό της διπλοστοιβάδας και τις πολικές τους κεφαλές να προσανατολίζονται προς το υδατικό περιβάλλον.

Πίνακας 3: Υλικά Σχηματισμού Λιπιδικών Μembrανών
[D. P. Nikolelis, C. G. Siontorou, 1995]

Φωσφολιπίδιο	Στερόλη	Διαλύτης
1. Χαρακτηριστικά φωσφολιπίδια - Φωσφατιδυλοχολίνη αυγού - Διελαιικός εστέρας γλυκερόλης - Μονοπαλμιτικός εστέρας γλυκερόλης - Σφιγγομυελίνη - Φωσφατιδυλ-αιθανολαμίνη	Χοληστερόλη	κ-Δεκάνιο κ-Εξάνιο κ-Δεκάνιο α-tocopherol:χλωροφόρμιο: μεθανόλη (10 : 20 : 70) κ-Εξάνιο: αιθανόλη (30 : 70)
2. Μικτά Λιπίδια - Εκχύλισμα λευκής ουσίας βοδινού εγκεφάλου με χλωροφόρμιο: μεθανόλη (20:80) - λιπίδια ερυθροκυττάρων προβάτου υψηλής περιεκτικότητας σε ιόντα καλίου - Μίγμα φωσφολιπιδίων σόγιας («ασολεκτινη»)	Χοληστερόλη	α-tocopherol:χλωροφόρμιο:μεθανόλη (10 : 20 : 70) κ-Δεκάνιο κ-Δεκάνιο
3. Διαλύματα που δεν περιέχουν φωσφολιπίδια	7-δεϋδρο-χοληστερόλη	κ-Δωδεκάνιο Χλωροφόρμιο: κ-Δεκάνιο (50 : 50)

Παράδειγμα αποτελεί η τεχνική Langmuir – Blodgett, η οποία θα αναλυθεί παρακάτω. Στην τεχνική αυτή για να σχηματιστεί διπλοστοιβάδα, τα φωσφολιπίδια

τοποθετούνται σε μια οπή ενός διαφράγματος που παρεμβάλλεται μεταξύ δύο ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων. Στα υδατικά διαλύματα εκατέρωθεν των δύο πλευρών της μεμβράνης, υπάρχουν διαλυμένα τόσο μονοσθενή ανόργανα ιόντα (K^+ , Li^+ , Na^+ , Cl^-), όσο και πολυσθενή κατιόντα, όπως το Ca^{2+} και το Mg^{2+} . Τα μονοσθενή ιόντα βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 10^{-3} έως 1 M , και είναι απαραίτητα για τις ηλεκτροχημικές μελέτες αλλά και την ίδια την ηλεκτροστατική σταθεροποίηση των μεμβρανών. Τα πολυσθενή κατιόντα έχουν την ιδιότητα να συμπλέκουν τις πολικές κεφαλές των λιπιδίων και τα προσθέτουμε στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα όταν θέλουμε να μεταβάλλουμε την αναμιξιμότητα των λιπιδίων που συνθέτουν μια μεμβράνη [P. Mueller, D. Rudin, 1962]. Για παράδειγμα πολυσθενή κατιόντα χρησιμοποιήθηκαν κατά την σύνθεση του λιπιδίου που επιλέχτηκε στην ανίχνευση συγκεκριμένων αντιγόνων. Τα αντιγόνα αλληλεπιδρούσαν με τα αντισώματά τους, που είχαν τον ρόλο των υποδοχέων στις μεμβράνες και στο τέλος λόγω των ηλεκτροστατικών μεταβολών λαμβάνονταν τα μετρήσιμα σήματα. Έρευνες έδειξαν πολλαπλά παροδικά σήματα που συνέχιζαν να εμφανίζονται για μεγάλες περιόδους, οφείλονταν στις αλληλεπιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος σε λιπιδικές μεμβράνες που περιείχαν σε ποσοστό 35% το λιπίδιο διπαλμιτουλφωσφατιδικό οξύ (DPPA) και 65% φωσφατιδυλοχολίνη (PC). Οι αλληλεπιδράσεις σε αυτό το λιπιδικό μείγμα πραγματοποιήθηκαν παρουσία ιόντων ασβεστίου [D.P. Nikolelis and U.J. Krull, 1994]

2.5 Τεχνικές Σχηματισμού μη υποστηριζόμενων Συνθετικών Διστρωματικών Λιπιδικών Μεμβρανών

Οι τεχνικές σχηματισμού μη υποστηριζόμενων συνθετικών διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών περιλαμβάνουν:

- A) την τεχνική της ψύκτρας
- B) τη τεχνική του Langmuir – Blodgett
- Γ) την τεχνική σχηματισμού Λιποσωμάτων (Σφαιρικές διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες)

2.5.1 Τεχνική της ψύκτρας

Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ένα φύλλο μη αγώγιμου υλικού (π.χ., PTFE), το οποίο έχει μια οπή διαμέτρου περίπου 1 mm. Η οπή του φύλλου, που χωρίζει δύο ηλεκτρολυτικά διαλύματα, καλύπτεται, με την βοήθεια ενός μικρού πινέλου (ψήκτρα), με μια μικρή ποσότητα διαλύματος λιπιδίου σε οργανικό διαλύτη. Αρχικά σχηματίζεται ένα παχύ υμένιο, το οποίο όταν παρατηρείται με την βοήθεια ενός ανακλασιμέτρου, δίνει φάσμα με πολλές ραβδώσεις και χρώματα, λόγω φαινομένων συμβολής. Σταδιακά, ο οργανικός διαλύτης διαφεύγει, το υμένιο, αρχίζει να γίνεται λεπτότερο (**σχήμα 1**) και τελικά έχουμε το σχηματισμό της ΔΛΜ [M. Smyth and J. Vos, 1987]. Κατά την διαδικασία αυτή ενδέχεται οι σχηματιζόμενες ΔΛΜ να κατακρατήσουν στο εσωτερικό τους οργανικό διαλύτη, οπότε στην περίπτωση αυτή σχηματίζονται οι "μελανές" ΔΛΜ (**σχήμα 6**).

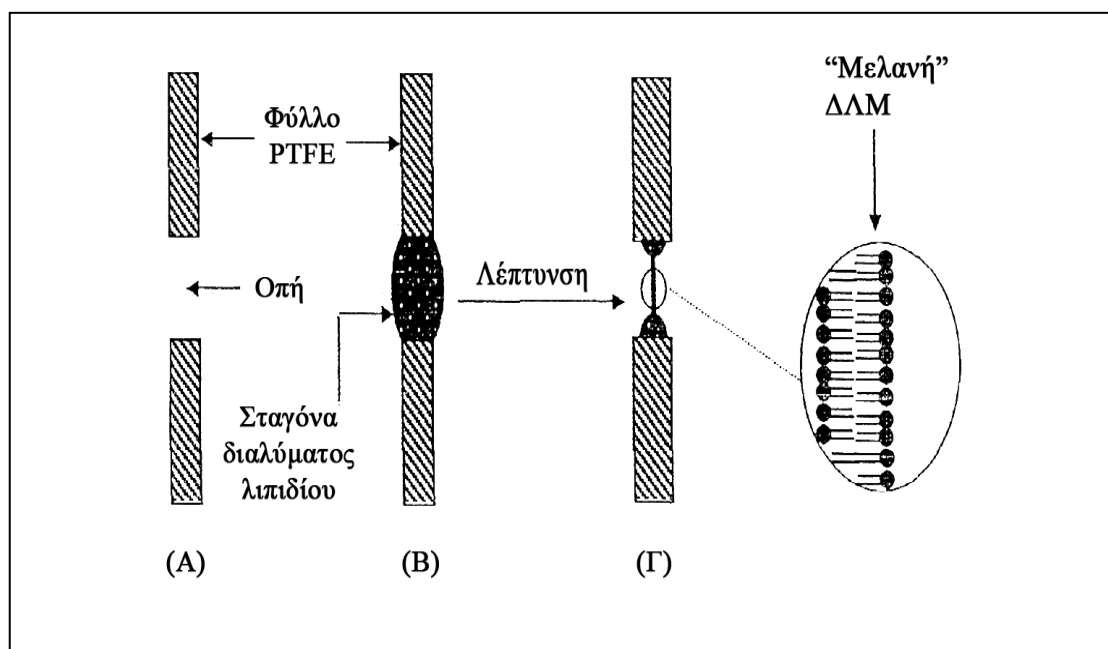
2.5.2 Τεχνική του Langmuir – Blodgett

Στην τεχνική αυτή αρχικά σχηματίζονται δύο μονοστοιβάδες στην μεσοεπιφάνεια αέρα-ηλεκτρολύτη (υδατική φάση) στο σκαφίδιο Langmuir-Blodgett. Ένα κινητό διάφραγμα, επάνω στο οποίο υπάρχει μια οπή διαμέτρου 1mm, βυθίζεται αργά στο υδατικό διάλυμα, με τις σχηματισμένες μονοστοιβάδες στην επιφάνειά του και σε κάθετη ως προς την επιφάνεια του ηλεκτρολύτη διεύθυνση (**σχήμα 7**). Η διπλοστοιβάδα σχηματίζεται με την απόθεση της μιας μονοστοιβάδας επάνω στην άλλη, στην επιφάνεια της οπής.

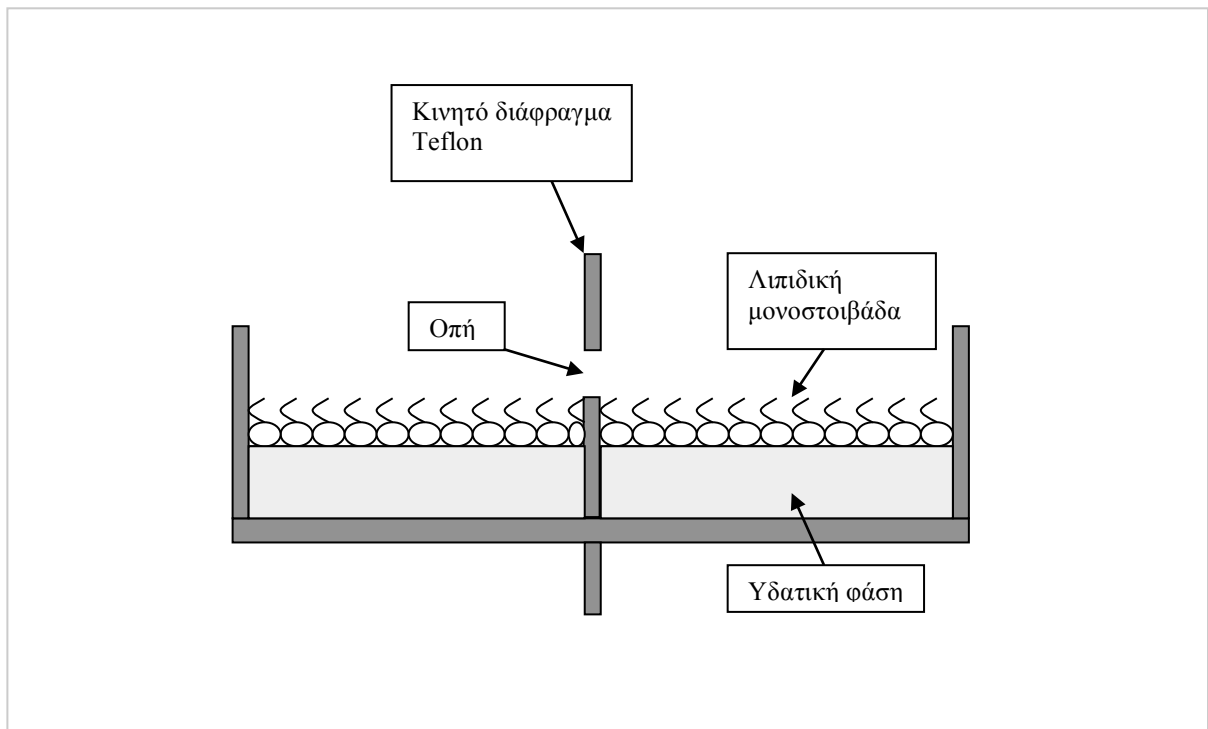
Η τεχνική του Langmuir – Blodgett σε σχέση με τη μέθοδο της ψήκτρας, έχει το πλεονέκτημα ότι σχηματίζει διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες, ελεύθερες διαλύτη ("solvent-free" lipid bilayers) [M. Montal and P. Mueller, 1972], ενώ με την τεχνική της ψήκτρας, σχηματίζονται μελανές μεμβράνες, δηλαδή μεμβράνες που έχουν κατακρατήσει

στο μη πολικό εσωτερικό τους, οργανικό διαλύτη. Αυτό συμβαίνει διότι στην τεχνική Langmuir – Blodgett μετά την απόθεση του λιπιδικού διαλύματος σχηματισμού στην ελεύθερη επιφάνεια του ηλεκτρολύτη και τον αυθόρμητο σχηματισμό των μονοστοιβάδων, ο οργανικός διαλύτης (που είναι πτητικός με μικρό MB) του λιπιδίου διαχέεται στο διάλυμα και στη συνέχεια, εξατμίζεται πλήρως,

Το κυριότερο μειονέκτημα της τεχνικής είναι το υψηλό κόστος. Η οργανολογία που χρησιμοποιείται, όπως το σκαφίδιο Langmuir-Blodgett, είναι αρκετά πολύπλοκη και δαπανηρή. Μια τροποποίηση της παραπάνω τεχνικής, παρουσιάστηκε από τους Νικολέλη και Krull [D.P. Nikolelis and U.J. Krull, 1992]. Το λιπιδικό διάλυμα προστίθεται μόνο στη μια κυψελίδα και η μεμβράνη σχηματίζεται με αναδίπλωση της ίδιας μονοστοιβάδας, μεταβάλλοντας τη στάθμη του ηλεκτρολύτη, με τη βοήθεια σύριγγας.



Σχήμα 6: Σχηματισμός "μελανών" ΔΛΜ με την μέθοδο ψήκτρας. (Α) Διάφραγμα από PTFE με οπή, που χωρίζει δύο ηλεκτρολυτικά διαλύματα. (Β) Η οπή καλύπτεται με διάλυμα λιπιδίου με μια μικρή ψήκτρα. (Γ) Με την πάροδο του χρόνου ο διαλύτης απομακρύνεται και σχηματίζεται αυθόρμητα ΔΛΜ.

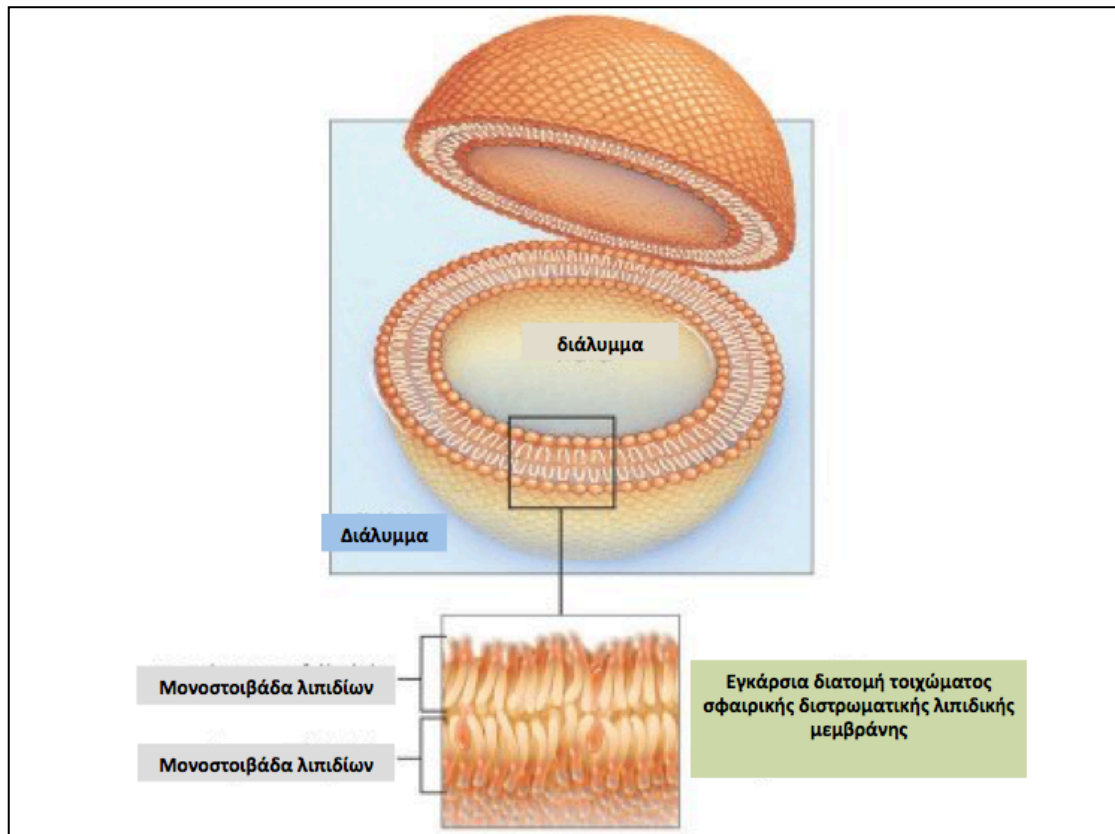


Σχήμα 7: Σκαφίδιο Langmuir-Blodgett

2.5.3 Τεχνική σχηματισμού λιποσωμάτων (σφαιρικές διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες)

Τα λιποσώματα είναι σφαιρικές διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες. Αποτελούνται ή μία διπλοστοιβάδα που έχει κυκλικό σχήμα ή από πολλές ομόκεντρες διπλοστοιβάδες, ανάλογα με την μέθοδο σχηματισμού (**σχήμα 8**). Για την παρασκευή τους, αρχικά διασπείρεται στερεό λιπίδιο σε ηλεκτρολυτικό διάλυμα και έπειτα γίνεται χρήση οργάνων όπως λουτρό υπερήχων ή αναδευτήρας τύπου vortex, έτσι ώστε να δημιουργηθούν οι σφαιρικές μεμβράνες.

Όσον αφορά τις ιδιότητές τους, είναι παρόμοιες με των επίπεδων διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών. Αυτό συμβαίνει επειδή έχουν πολύ μεγάλη ακτίνα καμπυλότητας, πολύ μεγαλύτερη των διαμέτρων των ιόντων ή άλλων αλληλεπιδρώντων μορίων. Οι τυπικές διαμέτροι των διπλοστοιβάδων τους είναι της τάξης των μερικών δεκάδων nm.



Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση λιποσώματος (σφαιρική διστρωματική λιπιδική μεμβράνη)

Διάφορες τεχνικές μετρήσεων, όπως φθορισμομετρία [H. Gaub, R. Buschl, H, 1984] ή διαφορική θερμιδομετρία σαρώσεως μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν γίνεται ανάλυση μειγμάτων ή προσδιορισμός ουσιών με την βοήθεια λιποσωμάτων σε ελεύθερη διασπορά.

2.6 Υποστρώματα Συνθετικών Διστρωματικών Λιπιδικών Μεμβρανών

Όπως έχει αναφερθεί, υπάρχει μία έμφυτη μηχανική αστάθεια των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών [A. Michaloliakos, G. Nikoleli, 2011]. Η αστάθεια αυτή τις καθιστά πολλές φορές ακατάλληλες για την διεξαγωγή πειραμάτων, για την χρήση τους σε πρακτικές εφαρμογές και για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων [Ch. Striebel, A. Brecht, 1994].

Με σκοπό την ελάττωση της μηχανικής και ηλεκτρικής αστάθειας των μεμβρανών πολλές φορές ο σχηματισμός τους πραγματοποιείται πάνω σε στερεά υποστηρίγματα. Όταν σκοπός είναι η κατασκευή ενός βιοαισθητήρα μιας χρήσης, τότε το υλικό του στερεού υποστηρίγματος είναι κάποια μεταλλική επιφάνεια ή αγαρόζη. Για πολλαπλές και συνεχείς μετρήσεις χρησιμοποιούνται φίλτρα.

2.6.1 Λιπιδικές μεμβράνες υποστηριζόμενες σε μεταλλική επιφάνεια

Η τεχνική των υποστηριζόμενων διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών σε μεταλλική επιφάνεια παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1989 από τους Tien και Salamon. Η μεταλλική επιφάνεια που υποστηρίζει τις μεμβράνες είναι ένα μεταλλικό ηλεκτρόδιο.

Αρχικά το ηλεκτρόδιο βυθίζεται στο λιπιδικό διάλυμα και ακροτομείται. Στην συνέχεια το ακροτομημένο άκρο προσελκύει τα πολικά τμήματα (κεφαλές) των λιπιδίων και έτσι δημιουργείται μια μονοστοιβάδα προσροφημένη στο μέταλλο. Έπειτα, η δημιουργία της διπλοστοιβάδας επιτυγχάνεται με την μεταφορά της απόληξης του ηλεκτροδίου σε υδατικό διάλυμα. Πρέπει να υπάρχει αναπαραγωγικότητα της ακροτόμησης του ηλεκτροδίου έτσι ώστε να υπάρχει αναπαραγωγικότητα και στην δημιουργία των υποστηριζόμενων λιπιδικών μεμβρανών [J. Lipkowski, 2012]

Το μεταλλικό ηλεκτρόδιο είναι από άργυρο ή πλατίνα, ενώ εξωτερικά είναι καλυμμένο με Teflon. Εκτός από ηλεκτρόδια με επικάλυψη από Teflon έχουν χρησιμοποιηθεί και ηλεκτρόδια με επικάλυψη κυανοακρυλικής κόλλας, τα οποία λειτουργούν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο [D.P. Nikolelis, S. Pantoulis, 2000; C.G. Siontorou, D.P. Nikolelis, 1997; D.P. Nikolelis and C.G. Siontorou, 1996]. Ο διαλύτης τις περισσότερες φορές είναι KCl 0,1-1 M ή κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα.

2.6.2 Λιπιδικές μεμβράνες υποστηριζόμενες σε φίλτρα

Στην περίπτωση αυτή τα λιπίδια που βρίσκονται στην μεσοεπιφάνεια αέρα-ύδατος εναποτίθενται στο κατακόρυφο φίλτρο από υαλώδεις ίνες (glass fiber filters) με τη ρύθμιση της επιφάνειας του διαλύματος. Η στάθμη του διαλύματος αρχικά κατεβαίνει κάτω από το επίπεδο του φίλτρου και κατόπιν ακαριαία να ανεβαίνει πάνω από αυτό [D.P. Nikolelis and C.G. Siontorou, 1995], με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μικρομεμβράνες στην επιφάνειά του. Αυτές οι μικρομεμβράνες σχηματίζουν ένα δίκτυο πάνω στο φίλτρο, αλλά ηλεκτροχημικά και φυσικοχημικά το σύστημα συμπεριφέρεται ως μια επίπεδη μεμβράνη.

2.7 Πολυμερισμένες Συνθετικές Λιπιδικές Μembrάνες

2.7.1 Δομή και ιδιότητες

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως οι πολυμερισμένες συνθετικές λιπιδικές μεμβράνες έχουν την δυνατότητα πολλαπλών χρήσεων, καθώς και δυνατότητα παραμονής τους για μεγάλο χρονικό διάστημα στον αέρα. Η σταθερότητα που τις διακρίνει είναι ακριβώς αποτέλεσμα της πολυμερισμένης δομής τους. Το λιπίδιο εγκλωβίζεται στο πολυμερές και συγκρατείται με ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Αυτές οι δυνάμεις που συγκρατούν το λιπίδιο στο πολυμερές, του δίνουν την δυνατότητα για πολλαπλή χρήση μετά από την παραμονή του στον ατμοσφαιρικό αέρα. Επίσης οι πολυμερισμένες μεμβράνες έχουν την ταχύτατη και εκλεκτική απόκριση που έχουν οι ελεύθερα αιωρούμενες ΔΛΜ. Η εξήγηση είναι η εξής: η φυσική δομή και κατάσταση της λιπιδικής μεμβράνης μπορεί να μεταβληθεί άμεσα μόλις έρθει σε επαφή με την ουσία διεγέρτη διότι τα λιπίδια της συνδέονται με ηλεκτροστατικούς δεσμούς. Έτσι υπάρχει μεγάλη ευαισθησία στην ανίχνευση ουσιών.

Για να μελετηθεί το πάχος και η διστρωματικότητα των πολυμερισμένων μεμβρανών προστέθηκε σε αυτήν η ουσία γραμισιδίνη [C.G Siontorou, D.P. Nikolelis, 1998]. Όταν έγινε προσθήκη της γραμισιδίνης-D, σε ποσότητες 1, 10 και 100 μM , στον ηλεκτρολύτη πολυμερισμένης λιπιδικής μεμβράνης δεν παρατηρήθηκε η δημιουργία καναλιών ιόντων. Είναι γνωστό ότι η γραμισιδίνη-D παρουσιάζει ένα αναμφισβήτητο αμφιφιλικό περιβάλλον. Έτσι λοιπόν μέσα σε λιποσώματα ή διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες παρουσιάζει διμερή ελικοειδή δομή με αποτέλεσμα την παραγωγή συνεχών καναλιών ιόντων μέσα σε διπλοστοιβάδες [C.G Siontorou, D.P. Nikolelis, 1998; C.G. Siontorou, V.G. Andreou, 2000]. Το μήκος του πεπτιδίου αυτού του επιτρέπει να διασχίζει μόνο διπλοστοιβάδες. Στην περίπτωση αυτή, διαπερνά την λιπιδική στιβάδα και ανοίγει τα αγωγή κανάλια. [M.I. Maguregui, R.M. Alonso, 1995]. Αφού λοιπόν στην πολυμερισμένη μεμβράνη δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην αγωγιμότητα ή τροποποίηση των καναλιών ιόντων σημαίνει ότι δεν έχουμε δομή διπλοστοιβάδας αλλά μάλλον πολυστοιβάδας. Η υπόθεση αυτή θα πρέπει να ερευνηθεί περαιτέρω με την μέθοδο της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σαρώσεως.

Επίσης τιμές πάχους της μεμβράνης αλλά και αποδείξεις για το αν έχουμε ή όχι διπλοστοιβάδα θα μπορούσαμε να αποκτήσουμε με μετρήσεις της χωρητικότητας της. Στην συγκεκριμένη όμως περίπτωση η ακριβής τιμή της χωρητικότητας C_m της μεμβράνης δεν

μπορεί να υπολογιστεί. Αυτό συμβαίνει γιατί δεν είναι γνωστό αν μια μονή λιπιδική μεμβράνη καλύπτει όλη την επιφάνεια του φίλτρου ή αν απροσδιόριστος αριθμός "μικρομεμβρανών" καλύπτουν τους πόρους του φίλτρου.

Τυπική τιμή της αντίστασης της λιπιδικής μεμβράνης στην μελέτη μας είναι της τάξεως των $10^7 \Omega \text{ cm}^2$. Αυτά τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν από την τιμή του ρεύματος στην κατάσταση ισορροπίας όταν εφαρμόζουμε βηματική αύξηση της τάσης 20 mV στην περιοχή 0 έως 300 mV. Αυτές οι τιμές είναι παρόμοιες με αυτές των ΔΛΜ σχηματιζόμενων με την μέθοδο αναδίπλωσης της μονοστοιβάδας .

Τελευταία, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες αλλά και αναλύσεις με την χρήση λιπιδικών μεμβρανών που σχηματίζονται με πολυμερισμό [D.P. Nikolelis and M. Mitrokotsa, 2002]. Παράδειγμα είναι η ανάπτυξη βιοαισθητήρων βασιζόμενων σε πρωτεΐνες μεμβρανών όπου χρησιμοποιήθηκε πολυμερισμένη διακετυλενική λεκιθίνη [P. Yager, 1986]. Επίσης, σε μεγάλο βαθμό έχουν χρησιμοποιηθεί τελευταία λιπιδικές μεμβράνες που σχηματίζονται με πολυμερισμό υποστηριζόμενες πάνω σε φίλτρα από υαλονήματα. Ο λόγος είναι ότι υπάρχει δυνατότητα πολλαπλών χρήσεων του ίδιου φίλτρου, καθώς και δυνατότητα παραμονής του για μεγάλο χρονικό διάστημα στον αέρα. Παράδειγμα αποτελεί η μέθοδος που χρησιμοποιείται και στην παρούσα εργασία κατά την οποία η σταθεροποίηση των ΔΛΜ επιτυγχάνεται πάνω σε φίλτρα με μικροπόρους (κατασκευασμένα από υαλονήματα). Η σταθεροποίηση των μεμβρανών επέτρεψε την διεξαγωγή πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν με έγχυση, με την μορφή ενέσεων, της προσδιοριζόμενης ουσίας σε ρέοντα διαλύματα, των οποίων η ροή διακοπτόταν κατά διαστήματα. [A. Arya, U.J.Krull, 1985]. Το πρόβλημα είναι ότι αυτά τα φίλτρα που στηρίζουν λιπιδικές μεμβράνες είναι ασταθή εκτός ενός ηλεκτρολυτικού διαλύματος και για αυτό δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή ενός σταθερού βιοαισθητήρα που θα μπορούσε να κυκλοφορήσει στο εμπόριο. Σημαντική πρόοδος παρόλα αυτά έχει πραγματοποιηθεί τελευταία στον σχεδιασμό, τις αναλυτικές εφαρμογές και την σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων που βασίζονται σε λιπιδικές μεμβράνες [D.P. Nikolelis and M. Mitrokotsa, 2002; D. P. Nikolelis, D. A. Drivelos, 2004].

2.7.2 Σχηματισμός συνθετικών λιπιδικών μεμβρανών με πολυμερισμό πάνω σε φίλτρα

Μία από τις κυριότερες μεθόδους που αναπτύχθηκαν για την σταθεροποίηση των μεμβρανών πάνω σε φίλτρα είναι ο πολυμερισμός του λιπιδίου. Μέθοδοι πολυμερισμού και τρόποι ακινητοποίησης λιπιδίων με την βοήθεια πολυμερών αναπτύχθηκαν και βασίστηκαν

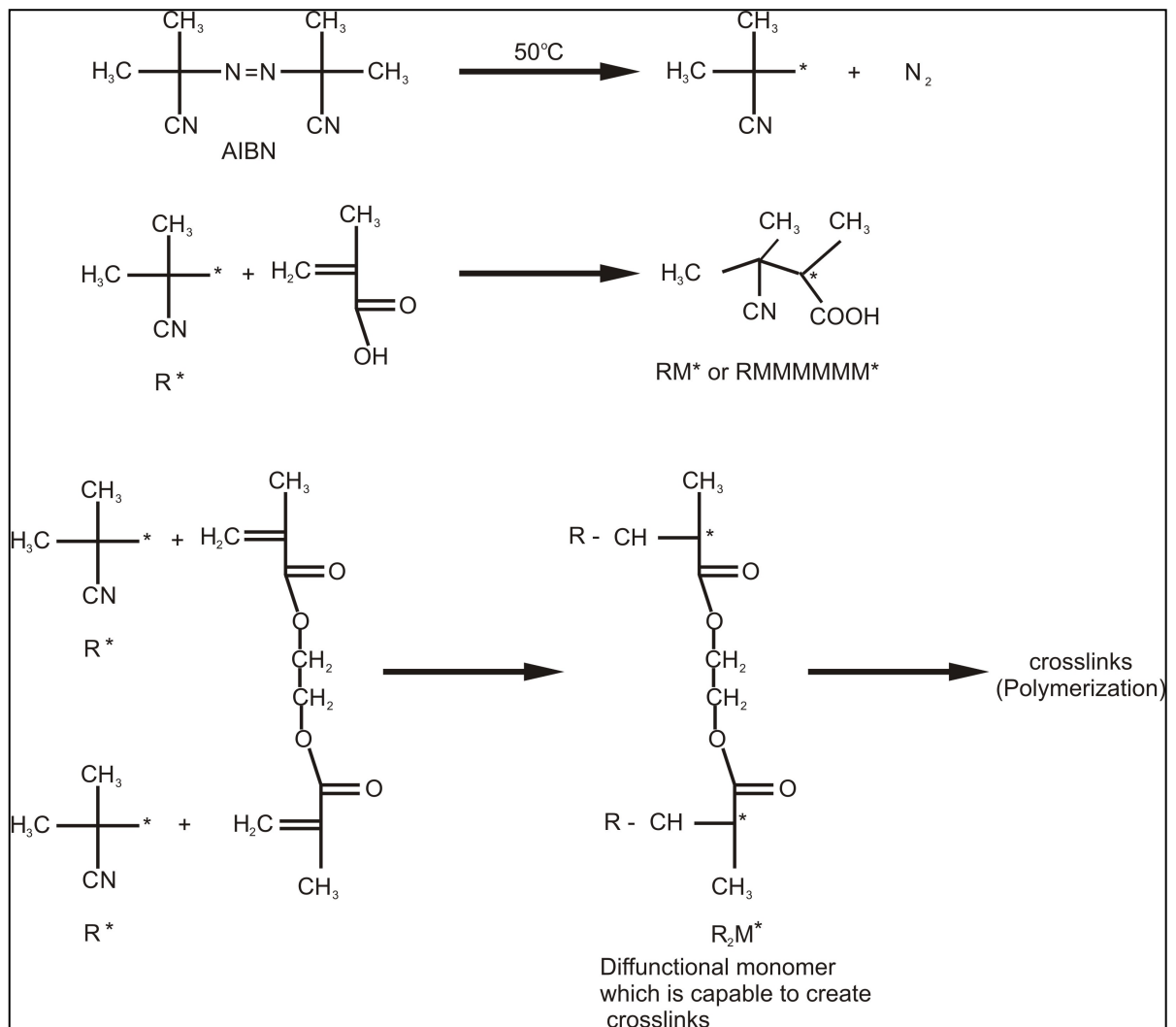
σε μελέτες πάνω στην ακινητοποίηση ενζύμων. Με τον όρο ακινητοποιημένο ένζυμο εννοείται το ένζυμο που είναι προσκολλημένο ή προσδεμένο σε ένα αδιάλυτο μέσο στήριξης που ονομάζεται φορέας ή περικλείεται μέσα στον φορέα ή η ακινητοποίηση επιτυγχάνεται μέσω της συσσωμάτωσης των ίδιων των μορίων του ενζύμου που συνδέονται μεταξύ τους με μια διαδικτυωμένη (cross-linked) σύνδεση, χωρίς απώλεια της ενεργότητας του ενζύμου. Υπάρχουν τρεις τεχνικές ακινητοποίησης ενζύμων: (α) τεχνικές που περιλαμβάνουν χημικές μεθόδους, όπου σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί είτε μεταξύ του ενζύμου και της επιφάνειας στήριξης, είτε μεταξύ δύο ενζύμων (β) φυσικές τεχνικές όπου η ακινητοποίηση πραγματοποιείται χωρίς τον σχηματισμό χημικών (ομοιοπολικών) δεσμών (γ) στις υβριδικές τεχνικές που είναι συνδυασμός των δύο μεθόδων. Παράδειγματα τέτοιων μεθόδων είναι ο εγκλεισμός, η διαδικτύωση, η ομοιοπολική σύνδεση, η μικροενθυλάκωση, η προσρόφηση, ο ηλεκτροπολυμερισμός και οι αυτοσυγκρατούμενες μονοστοιβάδες.

Με την μελέτη των ανωτέρω αναπτύχθηκε μέθοδος πολυμερισμού της λιπιδικής μεμβράνης πάνω σε ένα πορώδες φίλτρο υαλονημάτων. Η μέθοδος πολυμερισμού έχει περιγραφεί αναλυτικά στην βιβλιογραφία [*D.P. Nikolelis and M. Mitrokotsa, 2002; D. P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2006*]

Ο πολυμερισμός ακολουθεί το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών και γίνεται σε τρία στάδια (έναρξη, διάδοση και τερματισμός). Το μεθακρυλικό οξύ είναι το *μονομερές* προς πολυμερισμό, η διμεθακρυλική αιθυλενογλυκόλη είναι ο *διαδουκτιωτής* (crosslinker) και το 2,2'-αζωδισοβουτύρονιτρίλιο (AIBN) είναι ο *εκκινητής* (initiator). Το ακετονιτρίλιο προστίθεται στην παρασκευή του πολυμερούς, ως οργανικός διαλύτης, ενώ τα λιπίδια, δεν συμμετέχουν στις αντιδράσεις πολυμερισμού, αλλά εγκλωβίζονται μέσα στο πολυμερές και σταθεροποιούνται με ηλεκτροστατικούς δεσμούς.

Στο πρώτο στάδιο ο εκκινητής AIBN, υπό την επίδραση της θερμοκρασίας, σχηματίζει ελεύθερες ρίζες. Ακολουθεί αντίδραση των ελευθέρων ριζών με το μονομερές (μεθακρυλικό οξύ) και σχηματίζονται οι πρωταρχικές ρίζες. Στο στάδιο της διάδοσης, μόρια του μονομερούς προστίθενται με πολύ μεγάλη ταχύτητα στις πρωταρχικές ρίζες. Στον τερματισμό ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται.

Επειδή στο διάλυμα υπάρχει όχι απλό μεθακρυλικό οξύ, αλλά διμεθακρυλική αιθυλενογλυκόλη, η οποία είναι δραστικό μονομερές, δημιουργείται μια διδραστική πρωταρχική ρίζα. **(σχήμα 9)**. Κατά τη διάδοση του πολυμερισμού, σχηματίζονται διακλαδώσεις. Το τελικό πολυμερές είναι διακλαδισμένο. Μέσα σε αυτό εγκλωβίζονται τα λιπίδια [*R. Edenharder, P. Kurz, 1994*].



Σχήμα 9: Σχηματική αναπαράσταση ακινητοποίησης λιπιδίου σε επιφάνεια φίλτρου με πολυμερισμό (σχηματισμός σταθεροποιημένης λιπιδικής μεμβράνης).

2.8 Ιοντική Διαπερατότητα των Διστρωματικών Λιπιδικών Μembrανών

2.8.1 Μηχανισμοί μεταφοράς ιόντων

Οι σύνθετες διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες (ΔΛΜ), όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω προσομοιάζουν με τις φυσικές κυτταρικές μεμβράνες. Αποτελούνται, όπως και οι πλασμικές μεμβράνες των κυττάρων, από δύο επίπεδες αντικριστές μονοστοιβάδες. Όταν η λιπιδική μεμβράνη βρίσκεται σε υδατικό περιβάλλον (ηλεκτρολυτικό διάλυμα), οι μη πολικές αλυσίδες της κάθε μονοστοιβάδας προσανατολίζεται η μία απέναντι στην άλλη σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο το υδρόφοβο εσωτερικό της μεμβράνης, ενώ οι πολικές κεφαλές της κάθε στοιβάδας προσανατολίζονται προς το υδατικό περιβάλλον. Σχηματίζοντας τις δύο υδρόφιλες επιφάνειες. [A.L. Ottova and H.T. Tien, 1997; S. Kintzios, E. Pistola, 2001] **(σχήμα 4)**. Αυτή η διστρωματικότητα των συνθετικών λιπιδικών μεμβρανών καθώς και η επακόλουθη ομοιότητα των ιδιοτήτων τους με των φυσικών, τις καθιστά πολύ χρήσιμες στις επιστημονικές μελέτες, στον προδιορισμό και την μέτρηση ουσιών και στην κατασκευή βιοαισθητήρων. Η διστρωματικότητα μπορεί να αποδειχτεί με τη δράση της ουσίας γραμισιδίνη-D. Το μήκος του πεπτιδίου αυτού του επιτρέπει να διασχίζει μόνο διπλοστοιβάδες [D.P Nikolelis, U.J Krull, 1996]. Στην περίπτωση αυτή, διαπερνά την λιπιδική στοιβάδα και ανοίγει αγωγία κανάλια. Όταν υπάρχει διπλοστοιβάδα η παραπάνω δράση του πεπτιδίου σημαίνει αύξηση της ιοντικής διαπερατότητας.

Ο μηχανισμός λειτουργίας των φυσικών μεμβρανών βασίζεται στην δημιουργία καναλιού ιόντων. Αυτό συμβαίνει όταν οι πρωτεΐνες υποδοχείς της μεμβράνης, αναγνωρίζουν εκλεκτικά συγκεκριμένα μόρια. Διαμέσου αυτού του καναλιού ένας μεγάλος αριθμός από ιόντα περνά από το εξωτερικό στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα ιόντα αυτά ουσιαστικά αποτελούν χημικά σήματα, τα οποία μέσω της μεμβράνης περνούν από το εξωτερικό περιβάλλον στο εσωτερικό του. Στην συνέχεια η πληροφορία αυτές περνούν στο νευρικό σύστημα. Αντίστοιχα κανάλια ιόντων δημιουργούνται στις συνθετικές λιπιδικές μεμβράνες.

Σε μια συνθετική διστρωματική λιπιδική μεμβράνη, όπως και σε μια φυσική, δημιουργείται επιφανειακό ιοντικό φορτίο. Αυτό συμβαίνει διότι οι αλκυλικές αλυσίδες, που βρίσκονται στην εσωτερική υδρόφοβη περιοχή έχουν μικρή διηλεκτρική σταθερά [M. Montal and P. Mueller, 1972; M. Ashrafuzzaman and J. Tuszynski, 2012]. Επομένως τα φορτία, που δεν μπορούν να διαπεράσουν στο

εσωτερικό, συγκεντρώνονται στην επιφάνεια και δημιουργούν ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο εκτείνεται και στην υδατική φάση. Συνέπεια όλων αυτών είναι ότι ανάμεσα στην εσωτερική υδρόφοβη περιοχή και την υδρόφιλη επιφάνεια δημιουργείται διαφορά δυναμικού [U.J Krull, and M. Thompson, 1985].

Το δυναμικό που δημιουργείται (επιφανειακό δυναμικό) δεν αρκεί για να υπάρξει διέλευση ιόντων από την επιφάνεια προς το εσωτερικό. Αυτό συμβαίνει διότι όπως αναφέρθηκε η διηλεκτρική σταθερά των ομάδων της υδρόφοβης περιοχής είναι πολύ μικρή. Για να πραγματοποιηθεί η διέλευση ενός μικρού ιόντος, όπως είναι τα ιόντα K^+ , από το υδατικό διάλυμα στο εσωτερικό της μεμβράνης απαιτείται ενέργεια πολύ μεγαλύτερη από την μέση θερμική ενέργεια. Για να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα στην ιοντική διαπερατότητα που προκαλείται από το υδρόφοβο εσωτερικό [D.S. Dimitrov and R.K. Jain, 1984] απαιτείται η εφαρμογή ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Η επίδραση του εξωτερικού πεδίου θα έχει ως αποτέλεσμα να αυξηθεί το επιφανειακό φορτίο και το επιφανειακό δυναμικό και έτσι τα ιόντα που ξεπερνούν το ενεργειακό φράγμα κινούνται προς το εσωτερικό της μεμβράνης. Το ελάχιστο μέγεθος της εξωτερικής τάσης που πρέπει να εφαρμοστεί είναι 5-50 mV. Τότε ένας μικρός αριθμός ιόντων διαπερνά στο εσωτερικό και δημιουργείται ένα μικρό, αλλά μετρήσιμο ιοντικό ρεύμα, της τάξεως των 10^{-9} - 10^{-12} A/cm² [A.L. Ottova and H.T. Tien, 1987; S. Kintzios, E. Pistola, 2001].

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως πολύ σημαντικός στις φυσικές κυτταρικές λιπιδικές μεμβράνες είναι ο ρόλος των πρωτεϊνών. Εκτός από υποδοχείς που δεσμεύουν τα μόρια διεργέτες των μεμβρανών, συμπλέκονται με τα ιόντα και δημιουργούν τα ιοντικά κανάλια, μεταφέροντας με αυτόν τον τρόπο τα ιόντα στην εσωτερική περιοχή [Danielli, J. F, 1935; P. Lauger, 1972]. Για αυτόν τον λόγο η αγωγιμότητά των φυσικών λιπιδικών μεμβρανών είναι μεγαλύτερη από των συνθετικών λιπιδικών μεμβρανών. Οι συνθετικές λιπιδικές μεμβράνες επομένως, ενώ έχουν παρόμοιες ιδιότητες με αυτές των φυσικών μεμβρανών, διαφέρουν στην αντίσταση, η οποία είναι μεγαλύτερη σε αυτές απ' ότι στις φυσικές. Ουσίες που προκαλούν μετατόπιση όπως τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης, αλλάζουν τις ιδιότητες αγωγιμότητας της φυσικής μεμβράνης. Όταν οι ουσίες αυτές εισέλθουν στις συνθετικές μεμβράνες μπορούν να μειώσουν την αντίσταση τους στην τιμή των φυσικών κυτταρικών μεμβρανών.

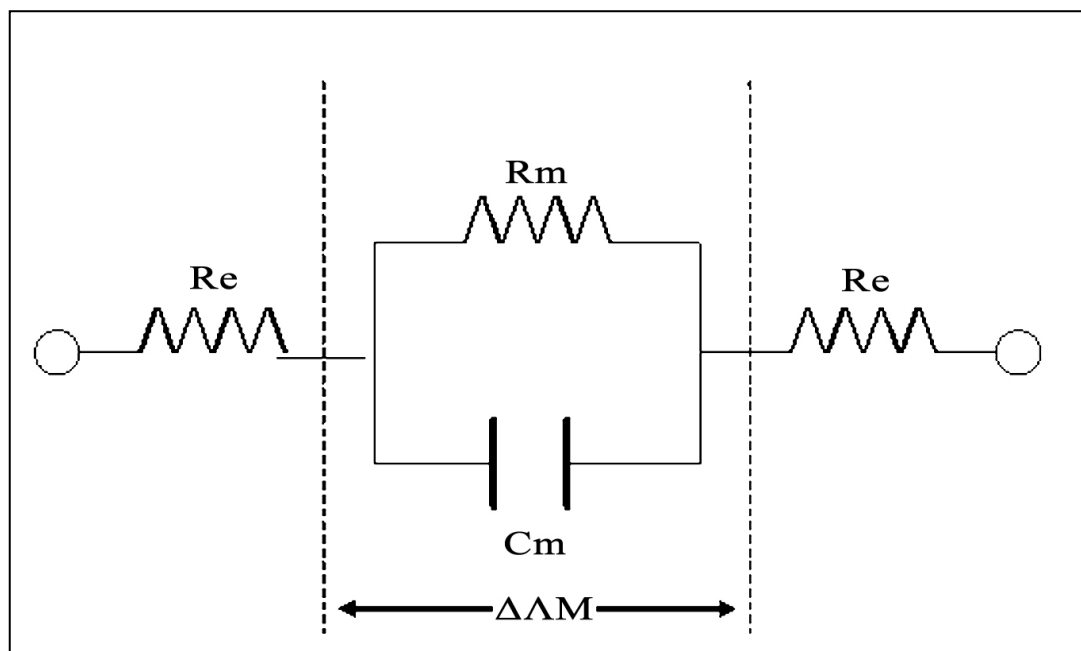
Όταν απουσιάζουν οι πρωτεΐνες φορείς, η μεταφορά των ιόντων μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο άλλους μηχανισμούς που μειώνουν το ενεργειακό φράγμα

και επιτρέπουν κάποια αγωγιμότητα. Ο ένας μηχανισμός είναι η προώθηση της κίνησης τους μέσα από πόρους, μόνιμους ή παροδικούς, που σχηματίζονται όταν στην επιφάνεια της μεμβράνης υπάρχει ανομοιογένεια [U.J Krull, 1985]. Ο άλλος μηχανισμός συνδέεται με την ύπαρξη πολικών ομάδων στις αλκυλικές αλυσίδες. Το ιόν μεταβαίνει από την μία πολική ομάδα στην άλλη (hopping mechanism) [T. Clemenz, A. Christianson, 1988].

Γενικά η μεταφορά ενός ιόντος μέσω της μεμβράνης, θεωρείται διαδικασία τριών σταδίων: κατανομή του ιόντος στην πολική περιοχή, μεταφορά μέσα στην υδρόφοβη περιοχή και αποβολή στο υδατικό διάλυμα.

2.8.2 Ηλεκτρικό κύκλωμα ισοδύναμο των διστρωματικών λιπιδικών μεμβρανών

Αν προσομοιάζαμε την ηλεκτρική συμπεριφορά της μεμβράνης μέσα στο ηλεκτρικό διάλυμα με ένα ηλεκτρικό κύκλωμα τότε θα προέκυπτε το κύκλωμα του σχήματος 10.



Σχήμα 10 : Ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα $\Delta\Lambda\text{M}$, με R_m η αντίσταση της μεμβράνης και R_e , η αντίσταση του φέροντος ηλεκτρολύτη και C_m , η ολική χωρητικότητα της μεμβράνης

Όπως φαίνεται και από το σχήμα, το σύστημα ηλεκτρολύτης-μεμβράνη-ηλεκτρολύτης, ισοδυναμεί με ηλεκτρικό κύκλωμα πυκνωτή χωρητικότητας, C_m και τριών αντιστάσεων. Ο πυκνωτής εκφορτίζεται μέσω της αντίστασης R_m που παριστάνει την αντίσταση της μεμβράνης και η οποία βρίσκεται παράλληλα με αυτόν και τις αντιστάσεις R_e που παριστάνουν τις αντιστάσεις του ηλεκτρολυτικού διαλύματος εκατέρωθεν της μεμβράνης και βρίσκονται σε σειρά με αυτόν.

Η ικανότητα της μεμβράνης να αποθηκεύει φορτία, οφείλεται στην ηλεκτροστατική έλξη των δύο μεσεπιφανειών και στην πόλωση που αναπτύσσεται στην περιοχή των αλκυλικών αλυσίδων [T. Clemenz, A. Christianson, 1988]. Η χωρητικότητα της μεμβράνης (C_m) είναι το μέτρο της ποσότητας του φορτίου Q , που πρέπει να μεταφερθεί από το ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα στο άλλο, ώστε να διαμορφωθεί διαφορά δυναμικού, V , στα άκρα της μεμβράνης.

$$C_m=Q/V$$

2.9 Φυσικοχημικοί Μέθοδοι Μηχανισμού Απόκρισης Βιοαισθητήρων Λιπιδικών Μεμβρανών

Η παραγωγή του τελικού αναλυτικού μετρήσιμου σήματος σε έναν βιοαισθητήρα, μέσω του οποίου μπορεί να ανιχνευτεί η προσδιοριζόμενη ουσία ή να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή της, βασίζεται στην εκλεκτική βιοχημική αντίδραση που πραγματοποιείται στην διστρωματική λιπιδική μεμβράνη. Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα της μεμβράνης, ο οποίος έχει ενσωματωθεί σε προηγούμενο στάδιο, με την προσδιοριζόμενη ουσία έχει σαν αποτέλεσμα την μεταβολή του ηλεκτροστατικού πεδίου, του δυναμικού και γενικότερα των ηλεκτρικών ιδιοτήτων της μεμβράνης. Η διαταραχή του πεδίου είναι εντονότερη στην περιοχή που βρίσκεται κοντά στο σύμπλοκο που δημιουργείται ανάμεσα στον υποδοχέα και τον υποκαταστάτη. Οι μεταβολές αυτές, που παρακολουθούνται με ηλεκτροχημικές μεθόδους σαν μεταβολές του διαμεμβρανικού ιοντικού ρεύματος ή με οπτικές μεθόδους έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή τελικού αναλυτικού σήματος [C.G. Siontorou, V.G. Andreou, 2000].

Η αλληλεπίδραση της προσδιοριζόμενης ουσίας με τον υποδοχέα, οδηγεί στην παραγωγή αναλυτικού σήματος, που εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της προσδιοριζόμενης ουσίας ή των προϊόντων [Danielli, J., 1935; C.G. Siontorou, V.G. Andreou, 2000; D.P. Nikolelis, T. Hianik, 1999]. Αυτό συμβαίνει διότι το επιφανειακό δυναμικό, που είναι βασικός παράγοντας στην παραγωγή αναλυτικού σήματος, εξαρτάται από τα φορτισμένα στοιχεία της μεμβράνης [J.M. Boggs, 1987; D.P. Nikolelis, J.D. Brennan, 1991] και την αλληλεπίδραση υποδοχέα-διεγέρτη ή προϊόντων-διεγέρτη [M.B. Abramson, R. Katzman, 1964].

Εκτός από την φύση και την συγκέντρωσή της προσδιοριζόμενης ουσίας, καθώς και την αλληλεπίδρασή της με τον υποκαταστάτη, ο μηχανισμός παραγωγής σήματος εξαρτάται και από τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και τη ρευστότητα της μεμβράνης. Η εξήγηση είναι ότι η ιοντική μεταφορά μέσω των ιοντικών καναλιών, επηρεάζεται εκτός από τις μεταβολές του επιφανειακού και του διπολικού δυναμικού, από τη ρευστότητα και τη διαθεσιμότητα διάκενων (πόρων) στο εσωτερικό της μεμβράνης, που με την σειρά τους προφανώς εξαρτώνται από την μοριακή οργάνωση της μεμβράνης [J. Del Castillo, A. Rodriguez, 1966; D.P. Nikolelis, J.D. Brennan, 1992; D.P. Nikolelis and U.J. Krull, 1992] και τις διαμοριακές δυνάμεις. Για

την ενίσχυση λοιπόν του τελικού μετρήσιμου σήματος απαιτείται τόσο η αύξηση του επιφανειακού δυναμικού όσο και η αύξηση της ρευστότητας [D.P. Nikolelis, M.G. Tzanelis, 1993; D.P. Nikolelis, M.G. Tzanelis, 1994; M. Blank, 1987]. Ας υποθέσουμε ότι πραγματοποιείται αντίδραση του υποδοχέα της μεμβράνης με τον διεγέρτη. Τότε η συγκέντρωση των κατιόντων στην επιφάνεια της μεμβράνης θα αυξηθεί. Η μεταφορά αυτών των ιόντων θα γίνει μέσω των πόρων, δηλαδή μέσω των δομικών ατελειών που δημιουργούνται στο εσωτερικό της. Όσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα διάνοιξης των πόρων και όσο μεγαλύτερη είναι η διάχυση των ιόντων από την επιφάνεια της μεμβράνης στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα, τόσο μεγαλύτερο θα είναι το ποσοστό των ιόντων που θα περάσουν μέσα από τον πόρο. Αν η διάνοιξη του πόρου είναι αργή, τότε το μεγαλύτερο ποσοστό ιόντων θα επιστρέψει στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα, ενώ αν είναι ταχεία, θα προκαλέσει διέλευση μεγάλου αριθμού ιόντων μέσα από τη μεμβράνη [M. Blank, 1987; X. Σιοντόρου, 2000].

Η αλληλεπίδραση υποδοχέα-υποκαταστάτη έχει σαν αποτέλεσμα την μεταφορά ιόντων προς το υδρόφοβο εσωτερικό της μεμβράνης, οδηγεί δηλαδή σε αύξηση του ηλεκτροστατικού φορτίου, της αγωγιμότητας και της ιοντικής διαπερατότητας της μεμβράνης, έχουμε δηλαδή αύξηση του ιοντικού ρεύματος. [D.P. Nikolelis, J.D. Brennan, U.J. Krull 1992, -- D.P. Nikolelis, M.G. Tzanelis, U.J. Krull, 1993] Αυτή η μεταβολή στο ιοντικό ρεύμα, δηλαδή η τιμή του μετά την αλληλεπίδραση υποδοχέα-διεγέρτη σε σχέση με την αρχική του τιμή, δηλαδή την τιμή του απουσία του διεγέρτη, μετριέται και μας δίνει το τελικό αναλυτικό σήμα. [D.P. Nikolelis, M.G. Tzanelis, 1993]. Το σταθερό ιοντικό ρεύμα της μεμβράνης απουσία διεγέρτη που ονομάζεται βασικό ιοντικό ρεύμα δεν είναι το ίδιο για όλες τις διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες αλλά επηρεάζεται από την σύστασή τους. Έτσι, χρησιμοποιώντας διάφορα λιπιδικά μείγματα ή διαφορετικές μοριακές αναλογίες λιποειδών, είναι δυνατή η κατασκευή αγωγίμων ή όχι μεμβρανών.

Όπως αναφέρθηκε, η αλληλεπίδραση διεργέτη-υποκαταστάτη έχει σαν αποτέλεσμα μεταβολές στις ιδιότητες της μεμβράνης και τελικά την παραγωγή του τελικού αναλυτικού σήματος. Για είναι μετρήσιμο το σήμα αυτό θα πρέπει να έχει μέγεθος τουλάχιστον τριπλάσιο του θορύβου [D.P. Nikolelis, C.G. Siontorou, 1997]. Επομένως υπάρχει μία ελάχιστη συγκέντρωση που ανιχνεύεται μέσω της διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης. Για παράδειγμα, το όριο ανίχνευσης των τριαζινών είναι 10^{-9} M [X. Σιοντόρου, 2000]. Στόχος είναι η ανακάλυψη μεθόδων

αύξησης του λόγου σήματος-θορύβου ώστε να ανιχνεύονται ακόμα μικρότερες συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών.

Όσον αφορά την εκλεκτικότητα, αυτή εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Καταρχήν από την φύση της προσδιοριζόμενης ουσίας. Οι διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες εμφανίζουν μεγάλη εκλεκτικότητα προς ουσίες που σχηματίζουν συσσωματώματα μορίων, διότι η προσρόφηση αυτών των ουσιών είναι ευκολότερη. Μερικές φορές τα συσσωματώματα δεν δημιουργούνται μεταξύ των μορίων της προσδιοριζόμενης ουσίας αλλά μεταξύ των μορίων της και των μορίων του υποδοχέα της μεμβράνης. Κατά την διαδικασία αυτή της συσσωμάτωσης μπορεί να πραγματοποιείται μια ταχύτατη αλλαγή της ηλεκτροστατικής δομής και της δομής των φάσεων στην επιφάνεια της μεμβράνης, κάτι ανάλογο δηλαδή με την πυρήνωση σε ένα υπέρκορο διάλυμα.

Γενικά, η μεμβράνη παρουσιάζει εκλεκτικότητα κατά την ανίχνευση και τον προσδιορισμό λιπόφιλων ενώσεων ή ενώσεων που περιέχουν φορτισμένες ομάδες, π.χ. αμινομάδες. Η εκλεκτικότητα της μεμβράνης εκτός από την φύση της ουσίας μπορεί να επηρεαστεί και από άλλους παράγοντες, όπως είναι η θερμοκρασία και το pH [X. Σιοντόρου, 2000; D.P. Nikolelis, C.G. Siontorou, 1997].

Στόχος των επιστημόνων είναι οι συνθετικές διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες που κατασκευάζουν να έχουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, ώστε να μπορούν να δίνουν μετρήσεις της προσδιοριζόμενης ουσίας χωρίς παρεμποδίσεις ακόμα και σε φυσικά δείγματα. Επίσης, σημαντικό είναι να μπορούν οι μεμβράνες να ανιχνεύουν όσο το δυνατόν μικρότερες συγκεντρώσεις της αναλυόμενης ουσίας. Μελέτες πραγματοποιούνται για να βρεθούν μηχανισμοί αύξησης της ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας των μεμβρανών, ώστε αυτές να χρησιμοποιηθούν σε νέα τελειότερα και αυτοματοποιημένα συστήματα βιοαισθητήρων που θα αντικαταστήσουν τα κλασσικά συστήματα ανάλυσης.

Το τελικό αναλυτικό σήμα που λαμβάνουμε από τις σύνθετες διστρωματικές μεμβράνες μπορεί να έχει διάφορες μορφές ανάλογα με τις μετρήσιμες ιδιότητες και την μέθοδο μέτρησης. Οι φυσικοχημικές μέθοδοι μηχανισμού απόκρισης βιοαισθητήρων λιπιδικών μεμβρανών είναι ηλεκτροχημικές, οπτικές, φασματοσκοπικές (IR Spectroscopy, RAMAN Spectroscopy), η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy) και η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΝΑΝΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΣΕ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

3.1 Εισαγωγή

Η 'αγορά' στην κλινική διαγνωστική όπως και αυτή των εμφυτεύσιμων οργάνων αποτελούν μοναδική ευκαιρία για τη χρήση των νανοαισθητήρων σε ευρεία βάση τόσο ερευνητική όσο και εμπορική. Η ανάγκη για χρήση των χημικών αισθητήρων, βασισμένη πλέον στη νανοτεχνολογία, θα πρέπει να διερευνηθεί σε βάθος έτσι ώστε να εκτιμηθεί προς ποία κατεύθυνση θα πρέπει να στοχεύσει η τεχνολογία των βιοαισθητήρων από τη βασική έρευνα ως το επίπεδο παραγωγής εμπορικών μονάδων. Στοιχεία που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την αξιολόγηση χημικών αισθητήρων βασισμένων σε νανοδομές, είναι ο έλεγχος της ποιότητας, το είδος του μηχανολογικού εξοπλισμού και η επιλογή παραμέτρων αξιολόγησης.

Οι βασικές μονάδες ή υπομονάδες κυττάρων και ιστών ορίζονται στη νανοκλίμακα εξυπηρετώντας έτσι την ανάπτυξη νέων συστημάτων που μιμούνται τη σύμπλοκη δομή των φυσικών ιστών. Συνεπώς η αλληλεπίδραση της νανοτεχνολογίας και της βιολογίας μπορεί λύσει πολλά βιοϊατρικά θέματα και να δώσει μία νέα διάσταση στον τομέα της υγείας και της ιατρικής. Η νανοτεχνολογία χρησιμοποιεί υλικά τα οποία έχουν τουλάχιστον μία φυσική διάσταση στη νανομετρική κλίμακα, ώστε να δημιουργηθούν δομές, και συστήματα με νέες αρχές. Πολλά βιολογικά στοιχεία όπως το DNA, περιλαμβάνουν τη νανοδιάσταση στις δομές τους καθιστώντας λογικό το ενδιαφέρον για τη χρήση νανοϋλικών στη μηχανική ιστών. Για παράδειγμα υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρακολούθηση της βιοδιανομής κυττάρων. Ακόμη πιο ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα νανοϋλικά μπορεί να είναι αποτελέσουν πολυλειτουργικά συστήματα, ικανά τόσο να εντοπίζουν και να απεικονίζουν. Νανοϋλικά από άνθρακα συγκεκριμένα έχουν το δυνητικό πολλαπλών χρήσεων στη μηχανική των ιστών [Jeff WM Bulte, Trevor Douglas, 2001; Harrison BS, Atala.A, 2007].

Γενικά τα νανوسύμπλοκα πολυμερών αποτελούν συνδυασμό πολυμερών με ανόργανα ή οργανικά νανοφίλτρα. Η αλληλεπίδραση νανοδομών με την θεμέλια ουσία αποτελεί τη βάση των μηχανικών και λειτουργικών αρχών των νανοσυμπλόκων δομών. Οι νανοσύμπλοκες δομές δείχνουν έναν άριστο συμβιβασμό μεταξύ δύναμης και αντοχής ενός υλικού, συγκρινόμενα με κάθε συστατικό τους ξεχωριστά. Για παράδειγμα η θεμέλια ουσία του οστίτη ιστού είναι ένα σύμπλοκο

οργανικής και ανόργανης δομής κολλαγόνου και απατίτη. Κατά συνέπεια τα σύνθετα ή συνδυασμένα υλικά αυτού του είδους αποτελούν άριστες επιλογές εμφυτεύσιμων υλικών στην οστική μηχανική.

Οι μηχανικές ιδιότητες των διαθέσιμων πολυμερών που χρησιμοποιούνται ως ικριώματα έχουν δείξει ανεπαρκή δυσκαμψία και αντοχή σε συμπιεστικά φορτία, συγκρινόμενα με το ανθρώπινο οστό, συνεπώς η χρήση ανόργανων / οργανικών νανοδομών μέσα σε βιοδιασπώμενα πολυμερή θα μπορούσε να αυξήσει και να διαφοροποιήσει τις μηχανικές, ηλεκτρικές, και τις ιδιότητες αποδόμησης τους. Η επιφάνεια συνοχής μεταξύ νανοσωματιδίων και πολυμερών της θεμέλιας ουσίας αποτελεί το μεγαλύτερο παράγοντα που επηρεάζει τις αρχές των νανοσυμπλεγμάτων. Οι μηχανικές ιδιότητες των νανοσυμπλόκων ελέγχονται από αρκετές μικροδομικές παραμέτρους, όπως οι ιδιότητες της θεμέλιας ουσίας, οι ιδιότητες και η κατανομή των φίλτρων, η διεπιφανειακή συγκόλληση, όπως επίσης και από τη σύνθεση ή τις μεθόδους προετοιμασίας. Οι επιφάνειες μπορεί να επηρεάσουν την ικανότητα μεταφοράς φορτίων από τα πολυμερή στις νανοδομές, για αυτό τροποποίηση των επιφανειών των νανοδομών είναι απαραίτητη για να προωθηθεί καλλίτερη διασπορά των φίλτρων και να ενισχυθεί η διεπιφανειακή συγκόλληση μεταξύ της θεμέλιας ουσίας και της νανοφάσης και προς αυτή την κατεύθυνση ποικίλες μέθοδοι έχουν δοκιμαστεί [Hong Z, Zhang P, He C, 2005; Li, X.L.Lu, Y.F. Zheng, 2008; Armentano I, Del Gaudio C, 2009]. Σχετικά πρόσφατα ποικιλία νανοσυμπλόκων βασισμένων σε πολυεστερικές δομές και ανθρακούχες νανοδομές έχουν μελετηθεί για δυνητική χρήση ως ικριωμάτων [Armentano I, Del Gaudio C, 2009; A Bianco, E Di Federico - 2009].

3.2 Η έννοια του νανϋποδοχέα

Οι εμφυτεύσιμοι χημικοί νανοϋποδοχείς βασίζονται στη δομή τριών διαφορετικών υλικών. Αυτά είναι τα νανοσύρματα οξειδίου του ψευδαργύρου, το γραφένιο και οι ανθρακούχοι νανοσωλήνες. Οι χημικοί αισθητήρες που χρησιμοποιούν νανοσύρματα οξειδίου του ψευδαργύρου είναι ποτενσιομετρικοί και πιεζοηλεκτρικοί, ενώ αυτοί που χρησιμοποιούν γραφένιο και ανθρακούχους νανοσωλήνες είναι επαγωγικοί. Οι μελλοντικοί χημικοί αισθητήρες θα στηρίζονται σε ασύρματη τεχνολογία μετάδοσης σημάτων από το όργανο στο οποίο θα εμφυτεύονται, σε βάση δεδομένων ώστε να αναπροσαρμόζεται η λειτουργικότητα του οργάνου στο οποίο είναι εμφυτευμένοι. Ένα παράδειγμα χρήσης των πιεζοηλεκτρικών αισθητήρων αποτελεί η εφαρμογή (εμφύτευση) νανοσυρμάτων οξειδίου του ψευδαργύρου στον καρδιακό μυ για τη μέτρηση του καρδιακού ρυθμού ή στην επιφάνεια άλλων οργάνων ώστε να γίνεται αυτόματα αντιληπτό το οίδημα που μπορεί να προκληθεί από μια φλεγμονώδη κατάσταση. Τα πιεζοηλεκτρικά σήματα στέλνονται και αναλύονται για ανάδραση ώστε να ρυθμιστεί ο καρδιακός ρυθμός. Το οίδημα επίσης μπορεί να γίνει αντιληπτό μέσω του μηχανισμού τάσης-έντασης επί της επιφάνειας τους μυός (συμπεριλαμβανομένων και μεταμοσχευμένων δομών-ολοκλήρων οργάνων ή μυϊκών ή σύνθετων κρημών) και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο διάφορων λειτουργιών. Άλλοι ηλεκτροχημικοί ή χημικοί αισθητήρες ταυτοποιούν διάφορους βιολογικούς δείκτες (πχ χοληστερόλη, γλυκόζη, ουρικό οξύ, ένζυμα, βακτήρια, ιούς, κλπ) μέσω εμφυτεύσιμων αισθητήρων.

3.3 Βιοαισθητήρες σε κλινική βάση

Η πρόκληση στην ερευνητική κοινότητα είναι να επιτευχθεί η μέτρηση σύνθετων μοριακών σημάτων σε κλινική βάση και φαίνεται ότι η τεχνολογία των χημικών αισθητήρων μπορεί να βοηθήσει σ' αυτή την κατεύθυνση. Μία από τις πολλά υποσχόμενες εφαρμογές των χημικών αισθητήρων είναι το POCT (point of care testing). Με απλά λόγια αποτελεί διαγνωστικό έλεγχο στο σώμα του ασθενούς με αποτελέσματα που λαμβάνονται άμεσα και τροποποιούν τη θεραπεία άμεσα. Το POCT θα προσφέρει το δυναμικό της γρήγορης, φτηνής αλλά και ακριβούς διαγνωστικής σε όλα τα επίπεδα, επιτρέποντας αυξημένο επίπεδο θεραπευτικής προσέγγισης σε παραδοσιακά υποβαθμισμένες υγειονομικά περιοχές παγκόσμια. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, όλοι οι χημικοί αισθητήρες βασίζονται σε σύστημα δύο στοιχείων. Το ένα είναι η μονάδα βιολογικής αναγνώρισης, η οποία διευκολύνει εκλεκτικό εγκλωβισμό ή ειδική βιοχημική αντίδραση του στόχου, και το δεύτερο στοιχείο είναι ο μετατροπέας του σήματος.

Οι βιοαισθητήρες είναι μοριακοί αισθητήρες που συνδυάζουν το μηχανισμό της βιολογικής αναγνώρισης με το μηχανισμό της μετατροπής σήματος. Παρέχουν έτσι μια νέα τάξη φθηνών, φορητών εργαλείων που πραγματοποιούν πολύπλοκες αναλυτικές μετρήσεις γρήγορα και παντού. Παρόλα αυτά η χρήση των βιοαισθητήρων επί του παρόντος είναι περιορισμένη μόνο στον έλεγχο της τιμής της γλυκόζης στο αίμα, καθώς για άλλες εφαρμογές το κόστος είναι μεγάλο και υπάρχει έλλειψη ευαισθησίας και διαθέσιμων μεθόδων μετατροπής του σήματος.

3.4 Ταξινόμηση και ιδιότητες των εμφυτεύσιμων υλικών

3.4.1 Σύγχρονη χρήση πολυμερών για βιο-νανοαισθητήρες

Τα πολυμερή αποτελούν τα πρωτογενή υλικά στην κατασκευή ικριωμάτων στις εφαρμογές της ιστικής μηχανικής, με πολλούς τύπους βιοδιασπόμενων πολυμερών να έχουν χρησιμοποιηθεί σ' αυτό το πεδίο. Ταξινομούνται ως: (1) φυσικά υλικά συμπεριλαμβανομένων των πολυσακχαριτών (άμυλο, αλγινικό, χιτίνη/χιτοζάνη, παράγωγα του υαλουρονικού οξέος), ή των πρωτεϊνών (σόγια, κολλαγόνο, γέλη ινικής, μετάξι). (2) Συνθετικά πολυμερή όπως πολυ (γαλακτικό) οξύ [PLA], πολυ(γλυκολικό) οξύ [PGA], πολυ (καπρολακτόνη) [PCL], πολυ (υδροξυλβουτιρικό) [PHB] [H Shin, S Jo, A Mikos, 2003; X Wen, Patrick A, 2005].

Τα πλεονεκτήματα αλλά και τα μειονεκτήματα που χαρακτηρίζουν αυτές τις δύο ομάδες των βιοϋλικών είναι πολλά. Τα συνθετικά πολυμερή, έχουν σχετικά καλή μηχανική αντοχή, με το σχήμα τους και το ρυθμό αποδόμησης να τροποποιείται πολύ εύκολα. Οι επιφάνειές τους όμως είναι υδρόφοβες και δεν μπορούν να αναγνωρίσουν κυτταρικά σήματα. Από την άλλη πλευρά τα φυσικά πολυμερή έχουν το δυνητικό πλεονέκτημα της βιολογικής αναγνώρισης, το οποίο επηρεάζει θετικά τη συγκόλληση και την τροποποίηση της λειτουργίας των κυττάρων, αλλά έχουν πτωχές μηχανικές ιδιότητες. Επίσης σε πολλά από τα φυσικά πολυμερή υπάρχει περιορισμένη διαθεσιμότητα και συνεπώς αυξημένο κόστος.

Τα συνθετικά πολυμερή (PGA, PLA) και τα προϊόντα τους (PLGA) αποτελούν ομάδα γραμμικών αλειφατικών πολυεστέρων που χρησιμοποιούνται στην ιστική μηχανική [Koezler WS, 2004; Chu CF, 1999; Zhang R, 2001; Pachene JM, 2000; Benjamin J.R.F, 2008]. Έχει αποδειχθεί ότι είναι βιοσυμβατοί και διασπώνται σε μη τοξικά προϊόντα, με ελεγχόμενο ρυθμό βιοαποδόμησης, έχοντας πάνω τους μακρόχρονη ιστορία χρήσης, σε αποδομούμενα χειρουργικά ράμματα (έχοντας πάρει έγκριση FDA). Αυτό το είδος των πολυμερών διασπάται μέσω του μηχανισμού της υδρόλυσης του εστερικού δεσμού τους, και τα προϊόντα αποδόμησης απομακρύνονται από το ανθρώπινο σώμα με τη μορφή του διοξειδίου του άνθρακα και νερού. Ο ρυθμός αποδόμησης μπορεί να τροποποιηθεί, ανάλογα των αναγκών, από μερικές εβδομάδες σε μερικά χρόνια, τροποποιώντας τη χημική τους σύνθεση και το μοριακό τους βάρος.

Το πολυγλυκολικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως για παρασκευή ικτριωμάτων λόγω της σχετικά υδρόφιλης φύσης του, αποδομείται γρήγορα σε υδατοδιαλυτά διαλύματα και χάνει τις μηχανικές του ιδιότητες μεταξύ δύο και τεσσάρων εβδομάδων [S LI, 1999]. Η επιπλέον μεθυλική ομάδα στο πολυγαλακτικό οξύ το μετατρέπει σε πίο υδρόφοβο, συγκρινόμενο με το πολυγλυκολικό οξύ, ελλαττώνει τη μοριακή συνάφεια με το νερό και καταλήγει σε βραδύτερο ρυθμό υδρόλυσης. Το πολυγαλακτικό οξύ αποδομείται με υδρολυτική αποστεροποίηση σε γαλακτικό οξύ. Η μορφολογία και η κρυσταλλικότητα επηρεάζουν ισχυρά το ρυθμό βιοδιάσπασης του πολυγαλακτικού οξέος όπως επίσης και τις μηχανικές του ιδιότητες, επιτρέποντας έτσι την αποδόμηση του πολύ αργά, τόσο σε τεχνητό περιβάλλον όσο και σε ζώντες οργανισμούς. Διατηρεί έτσι τη μηχανική ακεραιότητα του αρκετούς μήνες μετά την εμφύτευσή του. [Wei G, 2004; Ma PX, 2004]. Με σκοπό την επίτευξη ενός ενδιάμεσου ρυθμού βιοδιάσπασης μεταξύ του πολυγλυκολικού και πολυγαλακτικού οξέος, έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλες αναλογίες γλυκολικού και γαλακτικού οξέος ώστε να συντεθεί το πολυγλυκολικο-γαλακτικό οξύ [Zhang R, 2000; Sun BL, 2008; Park GE, 2005]. Τα συμπολυμερή του πολυγλυκολικο-γαλακτικού οξέος χρησιμοποιούνται επί του παρόντος στην ιστική αναγέννηση του δέρματος [Rodney, M, 2006]. Αυτά τα πολυμερή είναι από τα ελάχιστα που έχουν πάρει έγκριση για συγκεκριμένες εφαρμογές στο ανθρώπινο σώμα.

Υπάρχουν επίσης άλλοι αλειφατικοί πολυεστέρες, όπως της πολυκαπρολακτόνης και το πολυ-υδρόξυλοβουτυρικό που επίσης χρησιμοποιούνται στην ιστική μηχανική. Η πολυκαπρολακτόνη αποδομείται σε σημαντικά χαμηλότερο ρυθμό από το πολυγλυκολικό, πολυγαλακτικό και πολυγλυκο-γαλακτικό οξύ [Kang X, Xie Y 2007] Αυτός ο αργός ρυθμός αποδόμησης της πολυκαπρολακτόνης την κάνει λιγότερο ελκυστική για βιοϊατρικές εφαρμογές, αλλά πιο κατάλληλη για μακρόχρονα εμφυτεύματα. Η πολυκαπρολακτόνη παρήχθη πρόσφατα και έχει χρησιμοποιηθεί σαν υλικό ραμμάτων, αλλά και σαν μακράς διάρκειας σύστημα προσαγωγής φαρμάκων ή ουσιών εν γένει. Οι ιδιότητες αυτές της πολυκαπρολακτόνης την καθιστούν σαν ένα υποψήφιο πολυμερές στην οστική μηχανική, καθόσο έχει δείξει επαρκή μηχανική αντοχή για να χρησιμοποιηθεί σαν ικρίωμα σε εφαρμογές όπως οστικό υποκατάστατο (πλήρωση οστικών κενών) καθόσο οι φυσικές και μηχανικές του ιδιότητες πρέπει να διατηρηθούν για έξι μήνες (μέχρις ότου αντικατασταθεί από φυσικό οστό, μέσω του μηχανισμού της οστικής απορρόφησης-οστικής αναγέννησης) [Fang Yang, Sanne K. Both, 2009, Erman P, 2008].

Πίνακας 4 : Ιδιότητες βιοδιασπώμενων πολυμερών χρησιμοποιούμενων ως ικρίωματα

Πολυμερή	Σημείο που λειώνουν (°C)	Χρόνος Αποδόμησης (μήνες)	Εφαρμογές	Δομική μονάδα του πολυμερούς
Πολυακρικό οξύ (Polylactic acid, PLA)	173-178	12-18	Οστεοσύνθεση καταγμάτων, κοχλίες διεπαφής, ράμματα αγκυρών, μηνισκική αποκατάσταση	
Πολυγλυκολικό οξύ (Polyglycolic acid, PGA)	225-230	3-4	Ράμματα αγκυρών, συρραφή μηνίσκου, ιατρικές συσκευές, προσαγωγή φαρμάκων	
Πολυκαπρολακτόνη (Polycaprolactone, PCL)	58-63	>24	Ράμματα αγκυρών, συρραφή μηνίσκου, ιατρικές συσκευές, προσαγωγή φαρμάκων	
Πολυλακτοκογλυ-γλυκολικό (Poly-lactic-co-glycolic, PLGA) 50/50	Άμορφο	3-6	Ράμματα, συσκευές παροχής φαρμάκων	
Πολυλακτοκογλυ-γλυκολικό (Poly-lactic-co-glycolic, PLGA) 85/15	Άμορφο	3-6	Κοχλίες διεπαφής, ράμματα αγκυρών, Τεχνητός πρόσθιος χιαστός σύνδεσμος	
Πολυλακτοκογλυ-γλυκολικό (Poly-lactic-co-glycolic, PLGA) 90/10	Άμορφο	>24	Τεχνητό δέρμα, ράμματα	
Πολύ(προπυλένοφουμαρικό (PolyPropylene Fumarate) PPF	30-50	Αρκετοί μήνες	Οδοντικά εμφυτεύματα, αφρός κάλυψης, συσκευές παροχής φαρμάκων	

Ικρίώματα μπορεί να χρησιμοποιηθούν στην οστική αναγέννηση και η διαδικασία αυτή να διευκολυνθεί από την προσθήκη ανθρακικού απατίτη (κύριο στοιχείο ανόργανης φάσης των οστών) [Aishwarya S, 2008; Ma PX., 2004]. Τα πλέον συχνά βιοδιασπώμενα πολυμερή μαζί με τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά τους παρατίθενται στον πίνακα 4.

3.4.2 Σύγχρονες νανοδομές για βιοσυνθέσεις

3.4.2.1 Υδροξυαπατίτης

Ο υδροξυαπατίτης (HA) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως βιοσυμβατό κεραμικό υλικό σε πολλά πεδία της ιατρικής επιστήμης, αλλά κύρια σε επιφάνειες υλικών για επαφή με οστίτη ιστό, κυρίως λόγω της ομοιότητάς του με το οστό [Freed L, 1994]. Από υδροξυαπατίτη αποτελείται η μεγαλύτερη ποσότητα των σκληρών ιστών του ανθρώπου (πχ οστά, χόνδροι κλπ). Μπορεί να είναι φυσικός ή συνθετικός, έχει εξαιρετική βιοσυμβατότητα με οστά, δόντια, μύες τόσο εντός ζώντων οργανισμών, όσο και σε τεχνητό περιβάλλον. Ο υδροξυαπατίτης λόγω αυτών των ιδιοτήτων του μπορεί να ευοδώσει την παραγωγή νέου οστού το οποίο με τη σειρά του να αποκτήσει τις ιδιότητες του οστού ακόμη και σε τεχνητό περιβάλλον, όταν η αναλογία ασβεστίου / φωσφόρου βρίσκεται μέσα σε όρια γνωστά ότι προάγουν την οστική αναγέννηση. Ο Υδροξυαπατίτης είναι βιοσυμβατός, οστεοεπαγωγικός και χρησιμοποιείται ευρέως για την οστική ανακατασκευή κυρίως στην ορθοπαιδική χειρουργική (ολικές αρθροπλαστικές, πλήρωση οστικών ελλειμμάτων κλπ) όσο και στην οδοντιατρική (τεχνητά εμφυτεύματα δοντιών) [K. Rezwan, Q.Z. Chen, 2006;- C. P. A. T. Klein, 2004].

Συνθέσεις ανόργανων και οργανικών στοιχείων σε διάφορες αναλογίες έχουν χρησιμοποιηθεί ώστε να μιμούνται τη σύμπλοκη σύσταση του οστού, συνδυάζοντας την σκληρότητα της πολυμερούς φάσης με την αντοχή σε συμπιεστικά φορτία του ανόργανου στοιχείου, ώστε να αναπτυχθούν βιοενεργά υλικά με βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες και καλλίτερο προφίλ αποδόμησης. Για τέτοιου είδους συνθέσεις η αλκαλικότητα των ανόργανων σωματιδίων, όπως ο υδροξυαπατίτης ουδετεροποιεί την οξύτητα της αυτοκαταλυτικής αποδόμησης των πολυμερών, όπως το πολυγαλακτικό οξύ, αξιοποιώντας με βιοενεργή λειτουργία [Ferraz MP, 2004].

Στην τρέχουσα περίοδο βιοϋλικά από φωσφορικό ασβέστιο χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη με τη μορφή πούδρας, κόκκων, σκληρών πορωδών τεμαχίων, αλλά και άλλων συνθέσεων. Υλικά από φωσφορικό ασβέστιο αποτελούν το κύριο μεταλλικό στοιχείο των ασβεστοποιημένων ιστών. Ο ΗΑ έχει ήδη χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη λόγω της ομοιότητάς του με το μεταλλικό στοιχείο του οστού τόσο σε δομή όσο και σύσταση. Ευοδώνει ταχύτερη οστική αναγέννηση και άμεση συγκόλληση με το νεοπαραχθέν οστό χωρίς την παρεμβολή ενδιάμεσου συνδετικού ιστού.

3.4.2.2 Μεταλλικά νανοσωματίδια

Τα νανοσωμάτια των ευγενών μετάλλων έχουν μελετηθεί με ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς παρουσιάζουν ιδιάζουσες φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες από τις αντίστοιχες μεγαλοδομές τους. Οι βιοιατρικές εφαρμογές των νανοσωματιδίων κυριάρχησαν με τη χρήση νανοβιοσυζευγμάτων από το 1971 [Faulk WP, 1971]. Στην τρέχουσα φάση νανοσυζεύματα βασισμένα σε μεταλλικά στοιχεία χρησιμοποιούνται σε ποικίλες βιοιατρικές εφαρμογές, όπως στυλεοί (καθετήρες) ηλεκτρονικών μικροσκοπίων ώστε να μπορεί κάποιος να δει μέσα στο κυτταρικό περβάλλον, στην παράδοση φαρμακευτικών ουσιών σε εντοπισμένους στόχους αλλά και στη διάγνωση και θεραπεία νοσολογικών οντοτήτων. Παρόλα αυτά θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι βιολογικές ιδιότητες των μεταλλικών νανοσωματιδίων παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητες.

3.4.2.3 Νανοδομές από άνθρακα.

Οι ανθρακούχες νανοδομές είναι τα πλέον διαδεδομένα προϊόντα της νανοτεχνολογίας σήμερα μετά την ανακάλυψη των φουλερενίων, των ανθρακούχων νανοσωλήνων, των ανθρακούχων νανοϊνιδίων, του γραφενίου και μεγάλης ποικιλίας ανθρακούχων μορφών. Οι ανθρακούχοι νανοσωλήνες είναι σωλήνες φτιαγμένοι από μονό φύλλο γραφενίου, ή από πολλά φύλλα. Η συνήθης γεωμετρία τους δίνει άριστες μηχανικές και ηλεκτρικές ιδιότητες, καθιστώντας τους πολύ ελκυστικά υλικά στην ανάπτυξη πρωτοποριακών συσκευών σε πολλά εφαρμοσμένα πεδία, όπως νανოსυνθέσεις, αισθητήρες, και ηλεκτρονικές δομές σε νανοκλίμακα.

Παρόλα αυτά, ευρεία προσοχή έχει δοθεί στη διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων των ανθρακούχων νανοσωλήνων με ζώντες ιστούς. Επιπλέον, τεράστιο ενδιαφέρον έχει εκδηλωθεί στην επιστημονική κοινότητα στη χρήση των

ιδιοτήτων των ανθρακούχων νανοσωλήνων σε πολλά υποσχόμενες βιολογικές εφαρμογές. Υπάρχουν πρόσφατες έρευνες σχετικά με τη χρήση ανθρακούχων νανοσωλήνων σε βιολογικές εφαρμογές και την είσοδό τους σε βιολογικά συστήματα, εκμεταλευόμενοι το πλεονέκτημα ότι όλοι οι ζώντες οργανισμοί βασίζονται στον άνθρακα και τις ενώσεις του επιπροσθέτως του γεγονότος ότι οι νανοσωλήνες είναι αποκλειστικά φτιαγμένοι από άνθρακα με παρόμοια αναλογία μεγέθους όπως το DNA [W. Huang, S. Taylor, 2002]. Ανθρακούχοι νανοσωλήνες θα μπορούσε να αποτελέσουν ιδανικό υλικό στο σχεδιασμό νέων προϊόντων ιστικής μηχανικής για βιολογικές εφαρμογές. Πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα θα μπορούσε να αναμένονται, εισαγάγοντας τους ώστε να ενισχυθούν τα ικριώματα που χρησιμοποιούνται στη μηχανική των ιστών. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι οι πληροφορίες που συλλέγονται από τη χρήση τους σε τεχνητό περιβάλλον μπορεί να είναι διαφορετικές από πιθανή χρήση σε ζώντες οργανισμούς (ενδεχομένως μη εφαρμόσιμες) καθώς δεν είναι γνωστή η τοξικότητά τους.

Η πρώτη εφαρμογή της τεχνολογίας των νανοσωλήνων έλαβε χώρα σε πειραματικά μοντέλα στις νευροεπιστήμες. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες πολλαπλών φύλλων γραφενίου για τη διευκόλυνση της ανάπτυξης εμβρυονικών νευρώνων από νευρώνες εγκεφάλου αρουραίων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι νανοσωλήνες αυτοί χρησιμοποιήθηκαν χωρίς τροποποιήσεις, οι νευρώνες που αναπτύχθηκαν μπορούσαν να επεκταθούν σε έναν ή δύο νευρίτες, σε αντίθεση με τη χρήση νανοσωλήνων που ήταν επενδεδυμένοι με βιοενεργά μόρια και μπορούσαν να 'επεξεργαστούν' πολλαπλούς νευρίτες οι οποίοι με τη σειρά τους παρουσίαζαν εκτεταμένη ανάπτυξη νευρώνων. Τα ευρήματα αυτά καθιέρωσαν την ικανότητα χρήσης των νανοσωλήνων ως υποστρωμάτων για τη νευρική αναγέννηση αλλά και σαν στυλεών νευρωνικής λειτουργίας σε νανόσκαλα [Matson MPI, 2005]. Επιπλέον υπάρχουν πολλές ερευνητικές εργασίες που έχουν καταδείξει ότι με τη χρήση των νανοσωλήνων αλλά και την τροποποίηση του περιβάλλοντος ανάπτυξης (με ουσίες ή διαλύματα που ενισχύουν τη νευρική αναγέννηση) ευοδούται εκθετικά η νευρική αναγέννηση. Πραγματοποιώντας ένα βήμα πιο πέρα έχει καταδειχθεί ερευνητικά, αλλά και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην κλινική πράξη, η χρήση των ανωτέρω εφαρμογών στην κάλυψη νευρικών κενών – αν και περιορισμένων σε μέγεθος – όταν η δυνατότητα χρήσης αυτόλογων ή ετερόλογων νευρικών μοσχευμάτων είναι περιορισμένη. Επίσης έχει καταδειχθεί η δυνατότητα ανάπτυξης κυτταρικών πληθυσμών διαφορετικής προέλευσης σε τεχνητό περιβάλλον, μέσα σε νανοσωλήνες

ή σε συνθέσεις νανοσωλήνων. Η χρήση των πληροφοριών αυτών έστρεψε τη το ενδιαφέρον για τη χρήση των νανοσωλήνων ως υποστηρικτικές συσκευές για τη γεφύρωση ή την ενσωμάτωσή τους σε λειτουργικό δίκτυο νευρώνων in-vitro. Επιπλέον έρευνα της διάδρασης των νανοϋλικών με τη νευρική λειτουργία και το νευρικό ιστό δίνει τη δυνατότητα ανάπτυξης εξαιρετικά μικρών ηλεκτροδίων ώστε να προκαλούν νευροδιέγερση στους νευρώνες της σπονδυλικής στήλης με το αντίστοιχο αποτέλεσμα στην περιφέρεια, δίνοντας έτσι λύση σε χρόνιες φλεγμονώδεις ή εκφυλιστικές καταστάσεις της σπονδυλικής στήλης ή σε περιπτώσεις τραυματισμού του νωτιαίου μυελού [Lovat VI, 2005].

Μήτρες από νανοσωλήνες πολλαπλών φύλλων γραφενίου (MWCNTs) σε σχηματισμό διάταξης κυψελών έχουν κατασκευαστεί σαν δυνητικά ικρίωματα στην ιστική μηχανική [Mwenifumbo S, 2007]. Άλλο παράδειγμα βιοϊατρικής χρήσης αυτών των συσκευών, αποτελεί η καλλιέργεια ινοβλαστών από ινδικά χοιρίδια σε δίκτυο νανοσωλήνων. Μετά από επτά ημέρες σχηματίστηκε μία επιφάνεια από ινοβλάστες, χωρίς να παρατηρηθούν τοξικά φαινόμενα. Αυτά τα δίκτυα των νανοσωλήνων μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως βιοσυμβατό πλέγμα για την αποκατάσταση, διατήρηση ή ενίσχυση κατεστραμμένων ιστών [Miguel A. Correa-Duarte, Nicholas Wagner, 2004].

3.5 Τεχνολογία ανάπτυξης συμβατών βιοαισθητήρων

Οι ιστοί του ανθρώπινου σώματος είναι οργανωμένοι σε τρισδιάστατες δομές, σαν λειτουργικά όργανα ή συστήματα οργάνων. Για να κατασκευαστούν λειτουργικοί ιστοί και όργανα μέσω της ιστικής μηχανικής, τα ικρίωματα που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να διευκολύνουν τη διανομή των κυτταρικών πληθυσμών, και να οδηγούν την ιστική αναγέννηση σε τρεις διαστάσεις. Τα ικρίωματα αυτά δίνουν την δυνατότητα δομικής υποστήριξης και παρέχουν επαρκή μάζα για μεταφορά των κυτταρικών πληθυσμών και την καθοδήγηση της ιστικής αναγέννησης [Scott J. Hollister, 2005]. Το ικρίωμα επίσης λειτουργεί σαν τρισδιάστατο πατρών για τη συγκόλληση των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό τους, τη διαφοροποίηση τους και το σχηματισμό εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ως επίσης παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για το νεοσχηματισμένο ιστό. Γενικότερα το ιδανικό ικρίωμα για ιστική αναγέννηση θα πρέπει να έχει καλή βιοσυμβατότητα, βιοδιάσπαση με ελεγχόμενο ρυθμό αποδόμησης, ευκολία κατασκευής και επαρκείς μηχανικές ιδιότητες.

3.5.1 Νανοσύνθετα φιλμ

Η στρατηγική της ανάπτυξης πυκνών φιλμ σε αντιπαράθεση των τρισδιάστατων ικριωμάτων φαίνεται αρκετά χρήσιμη καθώς διευκολύνει την εισαγωγή μιας μόνο μεταβλητής με σκοπό την παρατήρηση και την επίδρασή τους στην ανάπτυξη των κυττάρων.

Νανοσύνθετα φιλμ που περιέχουν νανοσωμάτια από ασήμι έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για να εμποδίσουν τη διασπορά μικροοργανισμών ή βακτηρίων ώστε να μειωθεί ο ρυθμός των λοιμώξεων, αν και είναι σε συζήτηση η εξήγηση του ανασταλτικού χαρακτήρα του ασημιού στα βακτήρια [Rai M, Yadav A, 2009]. Ως εκ τούτου η διασπορά νανοσωματίων από ασήμι σε βιοδιασπώμενα πολυμερή θα επέτρεπε να κατασκευαστούν στοιχεία ικανά να απελευθερώνουν ασήμι σε ελεγχόμενο ρυθμό αποδίδοντας αντηβακτηριακές ιδιότητες για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

3.5.2 Πορώδη ικρίωματα

Ως ικρίωματα ορίζονται τεχνητές δομές ικανές να στηρίζουν έναν τριδιάστατο ιστικό σχηματισμό και που επιτρέπουν κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση,

μεταφορά και διατήρηση κυττάρων και βιοχημικών παραγόντων, διευκολύνουν τη διάχυση ζωτικών κυτταρικών θρεπτικών στοιχείων και προϊόντων παραγωγής. Για να επιτευχθεί ο στόχος της ιστικής ανακατασκευής τα ικρίωματα θα πρέπει να διατηρούν μερικές παραμέτρους. Υψηλού βαθμού πορώδης επιφάνεια με επαρκές μέγεθος πόρου είναι απαραίτητη ώστε να διευκολυνθεί η διασπορά των κυττάρων αλλά και η διάχυση σε όλη τη δομή των επιφανειών αυτών κυττάρων και θρεπτικών παραγόντων.

Για να συνδυασθεί η οστεοεπαγωγικότητα του φωσφορικού ασβεστίου με τους πολυεστέρες, αναπτύχθηκαν ικρίωματα από συνδυασμό πολυμερών και κεραμικών για χρήση στη οστική ιστική μηχανική. Τα κεραμικά νανοσωματίδια χρησιμοποιήθηκαν σε ικρίωματα για να αυξήσουν τις μηχανικές ιδιότητες της μήτρας των πολυμερών και να αυξήσουν τις οστεοεπαγωγικές ιδιότητές τους [Yang Cui, Yi Liu C, 2009; Nejati E, Mirzadeh H, 2008]. Έτσι παρουσιάζουν καλή βιοενεργότητα στη χειραγώγηση και τον έλεγχο τόσο σε μακροδομές αλλά και σε μικροδομές ώστε να είναι εύπλαστο το σχήμα τους για να μπορούν να καλύπτουν ποικίλα οστικά ελλείμματα. Παρόλα αυτά πλείστα των αποτελεσμάτων δείχνουν ότι αν και η ενσωμάτωσή της κεραμικής φάσης βελτίωσε τη βιοενεργότητα του πολυμερούς ικρίωματος, το πλεονέκτημα αυτό δεν συνδυαζόταν με ανάλογη βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων του συμπλόκου [Azevedo M, Reis, RL, 2003].

Πρόσφατα νανοσύνθετα κεραμικών-πολυμερών, ιδιαίτερα με ενίσχυση νανο-υδροξυαπατίτη και μήτρας πολυμερούς, γνώρισαν ιδιαίτερης προτίμησης τόσο λόγω της σύστασής τους και ομοιότητας της δομής τους με το φυσικό οστό, αλλά όσο και των μοναδικών λειτουργικών ιδιοτήτων τους, όπως η μεγαλύτερη επιφάνειά τους αλλά και η ανωτερότητα της μηχανικής αντοχής σε σχέση με αντίστοιχα ενός συστατικού. Ικρίωματα νανοσυνθέσεων βασισμένα σε σχηματισμούς ράβδων νανο-υδροξυαπατίτη αναπτύχθηκαν με σκοπό να μιμηθούν τη μορφολογία του απατίτη του φυσικού οστού [Nejati E, Mirzadeh H, 2008]. Η ενσωμάτωση τεχνητού νανουδροξυαπατίτη αντί ενίσχυσης με μικροϋδροξυαπατίτη έδωσε την ευκαιρία ώστε τα σύνθετα ικρίωματα να προβάλλουν υψηλότερη μηχανική αντοχή και περισσότερο φυσιολογική μικρο-αρχιτεκτονική λόγω της μεγαλύτερης διεπιφάνειας, επιφάνειας αμέσου ανάδρασης και πολύ λεπτών δομών. Θα μπορούσε να προταθεί ότι ανάπτυξη σύνθετων ικριωμάτων από PLLA/n-HA πληρούν τις περισσότερες των απαιτήσεων για κατάλληλα οστικά υποκατάστατα στις εφαρμογές της ιστικής μηχανικής των οστών [Nejati E, Mirzadeh H, 2008].

Η ομάδα του Ma και συνεργατών ανέπτυξε ποικιλία ικριωμάτων χρησιμοποιώντας θερμότητα για το διαχωρισμό των συνθετικών φάσεων (thermally induced phase separation- TIPS) [IO Smith, XH Liu, 2009; Ma PX, Zhang R, 2001]. Η ελεγχόμενη διαδικασία TIPS αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την προπαρασκευή πορωδών μεμβρανών πολυμερούς. Η τεχνική πρόσφατα εφαρμόστηκε στην κατασκευή βιοδιασπώμενων τρισδιάστατων πολυμερών ικριωμάτων. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε HA δεν επηρέασε την κρυσταλλοποίηση του διαλύτη αρκετά ώστε να αλλάξει η πορώδης δομή του. Τα αποτελέσματα αυτά συστήνουν ότι τα νεότερα σύνθετα ικρίωματα από n-HA/polymer μπορεί να αποτελούν καλλίτερες επιλογές στην οστική μηχανική.

Πρόσφατα ποικίλες νανοσυνθέσεις με πολυπροπυλένιο (PPF) και ανθρακούχους νανοσωλήνες μονού τοίχους γραφενίου μελετήθηκαν για το δυνητικό χρήσης τους σαν υλικό ικριωμάτων [Shi X F, Hudson J L, 2005; B. Sitharaman, X. Shi, L.A 2007]. Τα νανοςύνθετα αυτού του είδους είναι ενέσιμα, μπορούν να συνδεθούν θερμικά και είναι συμβατά με το κυτταρόπλασμα *in vitro*, δίνοντας πολλές υποσχέσεις για οστική ανακατασκευή. Τα SWCNTs και ιδιαίτερα τα πολύ βραχέα SWCNTs, ενισχύουν σημαντικά τα πολυμερή από πολυπροπυλένιο (PPF), των οποίων η χαμηλή μηχανική τους αντοχή περιορίζει την χρήση τους σε πορώδη ικρίωματα για χρησιμοποίησής τους σε εφαρμογές που απαιτούν μεταφορά φορτίων (πχ πλήρωση οστικών ελλειμμάτων). Κατά συνέπεια θα πρέπει να υπάρξει χρυσή συνισταμένη μεταξύ των συνιστωσών που απαιτούν υψηλή πορώδη επιφάνεια για διάχυση, καλλίτερη ανάπτυξη ιστών και καλές μηχανικές ιδιότητες του ικριώματος.

3.5.3 Νανοϋβριδικές μεμβράνες

Το electrospinning είναι τεχνική που βασίζεται στη εφαρμογή υψηλού ηλεκτρικού φορτίου σε διάλυμα πολυμερούς, με σκοπό την παραγωγή φορτισμένου υλικού που συλλέγεται με τυχαία κατανομή σε γειωμένο στόχο [Audrey Frenot, Ioannis S.Chronakis, 2003]. Η τεχνολογία αυτή αποτελεί απλή μέθοδο παρασκευής εξαιρετικά λεπτών ινών από διαλύματα πολυμερούς. Η διάμετρος των ινών ποικίλει από μερικά νανόμετρα σε λίγα μικρόμετρα. Τα νανοϊνίδια πολυμερούς που παράγονται με την τεχνική αυτή διαθέτουν εξαιρετικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων της μικρής διαμέτρου, μεγάλης επιφάνειας, υψηλού βαθμού δομικής τελειότητας και υψηλή μηχανική αντοχή. Αυτού του είδους τα πολυμερή (μη 'υφασμένα', μη συνδεδεμένα όπως οι ίνες του υφάσματος) προσδίδουν μοναδική

ικανότητα να ελέγχουν το μέγεθος των πόρων που δημιουργούνται από τα νανοϊνίδια [Su Yan, Li Xiaoqiang, 2009].

Πρόσφατα η τεχνική αυτή προσέλκυσε το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας καθώς επιτρέπει την παραγωγή ινώδους μη πλεκτού νάνομεμβράνης για χρήση στη μηχανική των ιστών, λόγω της δομικής τους ομοιότητας με ιστική εξωκυτάρια θεμέλια ουσία. Πολλές μελέτες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με τη συμπεριφορά των υλικών από νανοϊνίδια στο να οδηγήσουν κύτταρα, αρχικά να προσκολληθούν και να διασπαρούν πάνω στο υλικό και κατόπιν σε να πυροδοτήσουν τη διαδικασία έκκρισης των κατάλληλων ECM μορίων που στοχεύουν διάφορους ιστούς, όπως δέρμα, αγγεία, χόνδρο, μυς, λιπώδη ιστό, νεύρα και οστά.

Βασισμένα στην τεχνική του electrospun νανοσύμπλοκα ικρίωματα ενσωματωμένα σε βιοδιασπώμενα πολυμερή και σωματίδια υδροξυαπατίτη, επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό οστεοβλαστών όπως επίσης και τη διαφοροποίησή τους και θεωρούνται ως πολλά υποσχόμενα στην ιστική μηχανική [W.E. Teo, S. Ramakrishna, 2009; Teo WE, 2009; Jang JH, 2009; Venugopal J, Low S, 2008; Greiner A, 2007].

Μεγάλη προσπάθεια έχει γίνει στην κατασκευή βιοϋλικών που να πληρούν συγκεκριμένες κλινικές απαιτήσεις. Πιο συγκεκριμένα με την τεχνική του electrospinning κατάφεραν να ενσωματώσουν πολυστοιβαδικούς ανθρακούχους νανοσωλήνες με νανοσωμάτια υδροξυαπατίτη μέσα σε PLLA και να κατασκευάσουν σύνθετη μεμβράνη που πληρεί ειδικές απαιτήσεις καθοδηγούμενης ιστικής αναγέννησης [Fang Mei, Jinsheng Zhong, 2007].

3.6 Αποστείρωση των συμβατών νανοβιοαισθητήρων

Για τη χρήση στο ανθρώπινο σώμα θα πρέπει τα ικρίσματα από νανοσύμπλοκα να αποστειρώνονται εύκολα και με ακρίβεια ώστε να αποφεύγονται οι λοιμώξεις. Θα πρέπει όμως οι μέθοδοι αποστείρωσης να μην παρεμβαίνουν στη βιοενεργότητα των υλικών αυτών ή να αλλάζουν τη χημική τους σύσταση, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει τη βιοσυμβατότητά τους αφενός και τις ιδιότητες αποδόμησής τους αφετέρου. Η επιλογή της μεθόδου αποστείρωσης αποτελεί ένα πολύ σημαντικό βήμα για τη χρήση των πολυμερών και των νανοσύμπλοκων φιλμ και ικριωμάτων σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Πολλή έρευνα έχει εκπονηθεί στην επίδραση των μεθόδων αποστείρωσης επί των ιδιοτήτων των πολυμερών. Στην πραγματικότητα κάθε μέθοδος έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, καθιστώντας την επιλογή της πολυπαραγοντικά εξαρτώμενη, συμπεριλαμβανομένων των ιδιοτήτων των υλικών προς αποστείρωση και της αντίστασης του υλικού στη διαδικασία αποστείρωσης [Deenu Kanjickal, Stephanie Lopina, 2008; Amanda K. Andriola Silva Brun-Graeppi, 2009]. Όποια μέθοδος και αν επιλεγεί έχει χωρίς αμφιβολία επίδραση στις ιδιότητες της βιοαποδόμησης των πολυμερών και των ικριωμάτων, καθιστώντας ικανή και αναγκαία συνθήκη την επιλογή της μεθόδου με τις λιγότερες συνέπειες επί των υλικών αυτών.

Η αποστείρωση μπορεί να επιτευχθεί είτε σε περιβάλλον ατμού, με οξείδιο του αιθυλενίου, γ-ακτινοβολία, e-beam ακτινοβολία, υπέρυθη ακτινοβολία ή και θερμική αποστείρωση. Λόγω της μεγάλης θερμοκρασίας που χρησιμοποιείται, η θερμική αποστείρωση, όπως και η αποστείρωση σε ατμό, μπορεί να λιώσει τα πολυμερή ή να αλλάξει δραματικά τις μορφολογικές δομές των υλικών. Ενεργειακού τύπου μέθοδοι όπως η χρήση γ-ακτινοβολίας ή e-beam ακτινοβολίας, είναι άμεσες μέθοδοι, πολύ διεισδυτικές, μη τοξικές, αλλά έχουν το δυνητικό των αλλαγών στη μοριακή μορφολογία των πολυμερών [R. L. Clough, 2001]. Ενδεχομένως η γ-ακτινοβολία είναι πλέον δημοφιλής για το τελικό στάδιο αποστείρωσης σε θερμικά ευαίσθητες ιατρικές συσκευές. Η αποστείρωση με ιονίζουσα ακτινοβολία γίνεται τυπικά με τη χρήση ακτίνων γ, η οποία είναι φωτόνια ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε εύρος 1KeV-10MeV. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η χρήση γ – ακτινοβολίας προκαλεί ουσιαστική αποδόμηση των πολυεστερικών αλυσίδων με αυξημένες δόσεις ακτινοβολίας. Με τη χρήση γ-ακτινοβολίας παρατηρείται μια

πολυωνυμική σχέση μεταξύ δόσης και μοριακού βάρους σε πολυμερή από PLLA, στα οποία το μοριακό βάρος ελαττωνόταν με αύξηση της δόσης ακτινοβολίας. Ξεκάθαρα η ακτινοβολία του PLLA προκαλεί σημαντική μοριακή καταστροφή επηρεάζοντας όλο το φάσμα των μηχανικών του ιδιοτήτων [Kimberly A. Hooper, 1997].

Βιοϊατρικές συσκευές αποτελούμενες από βιοδιασπώμενα πολυμερή συνήθως αποστειρώνονται με οξείδιο του αιθυλενίου (ETO). Η αποστείρωση με αέριο ETO χρησιμοποιείται αποκλειστικά σε βιοαπορροφήσιμες ιατρικές συσκευές και θεωρείται ότι έχει τις λιγότερο καταστρεπτικές συνέπειες στις ιδιότητες των υλικών αυτών [Juha- Pekka Nuutinen, 2002]. Σε αντιδιαστολή η γ-ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει διάσπαση των εστερικών αλυσίδων και διασύνδεση και επανασύνδεσή τους σε ανώμαλη μορφή με δόσεις ακτινοβολίας 2.5 Mrad [F. R. Rozema, R. R. M. Bos, 2009]. Άλλες μέθοδοι αποστείρωσης όπως θερμική, ατμού ή οξέων προκαλούν εκτεταμένη παραμόρφωση των συσκευών που αποστειρώνονται και επιταχύνουν έτσι την αποδόμησή τους. Η αποστείρωση με οξείδιο του αιθυλενίου (ETO) παρουσιάζει περιορισμούς, καθώς και αυτή η μέθοδος επιταχύνει την αποδόμηση των πολυμερών, όπως επίσης αφήνει αέριο υπόλειμμα οξειδίου του αιθυλενίου μέσα στη μάζα της συσκευής που αποστειρώνεται.

Διαλύματα ισοπροπανόλης μπορεί να αποτελέσουν εναλλακτική μορφή αποστείρωσης πολυμερών, όπως επίσης και η αιθανόλη, αν και ο βαθμός αποστείρωσης μπορεί να μην είναι επαρκής [Holy CE, Cheng C, Davies JE, 2001]. Απολύμανση σε διάλυμα αιθανόλης 70% για 30 λεπτά χρησιμοποιείται συχνά in-vitro και έχει καταδειχτεί ότι δεν προκαλεί μορφολογικές ή/και χημικές βλάβες στα πολυεστερικά ικρίωματα. Παρά το γεγονός ότι gram (+), gram(-) και οξεάντοχα βακτήρια, όπως και λιποφιλικό ιοί παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία σε υδρικές συγκεντρώσεις αιθανόλης από 60%- 80%, οι υδρόφιλοι ιοί και βακτηριακοί σπόροι είναι ανθεκτικοί στις αντιμικροβιακές ιδιότητες της αιθανόλης. Έτσι τα διαλύματα αιθανόλης θεωρούνται χημικά απολυμαντικά των προς αποστείρωση υλικών και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθούν in-vivo σε βιοιατρικές συσκευές.

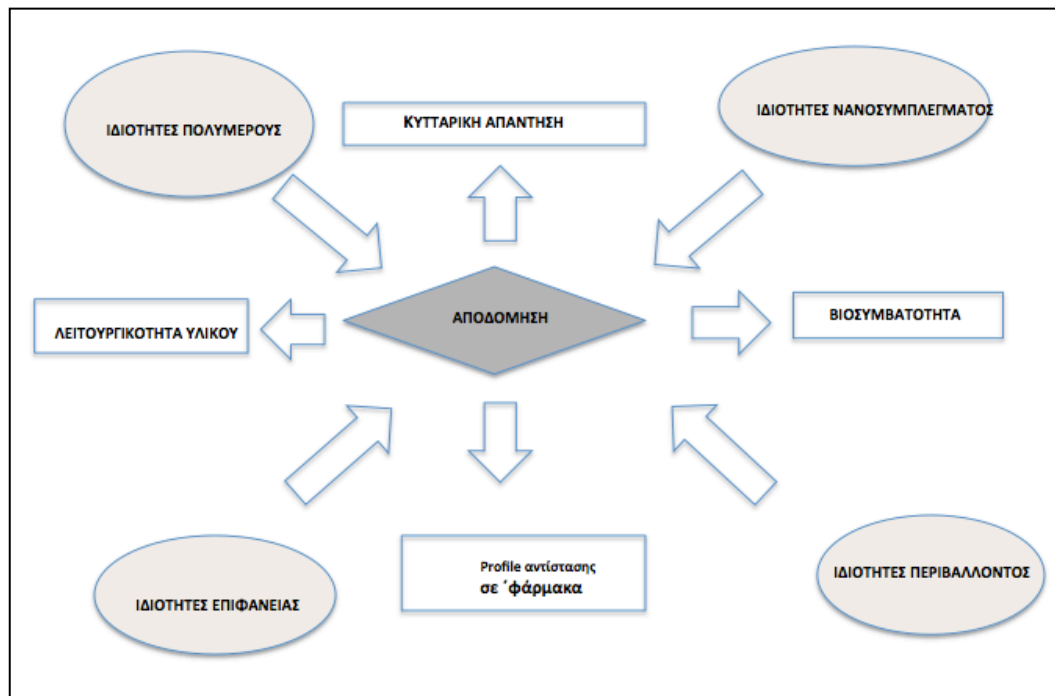
3.7 In-vitro βιοδιάσπαση των συμβατών νανοβιοαισθητήρων

Οι ιδιότητες αποδόμησης των νανοσυμπλόκων είναι επίσης υψίστης σημασίας στην επιλογή τους ως βιοϋλικών και της χρήσης τους στην μηχανική των ιστών [Hurrell, S., Cameron, R.E., 2009]. Ένα ικρίωμα νανοσύμπλοκου πολυμερούς πρέπει να έχει συγκεκριμένο σχεδιασμό μαζί με λειτουργικά κριτήρια, όπως βιοσυμβατότητα, ειδικό προφίλ βιοδιάσπασης, ικανές μηχανικές ιδιότητες και σε κάποιες περιπτώσεις αισθητική συνιστώσα. Η λύση για τη χρήση τέτοιων ικριωμάτων είναι η σωστή επιλογή χημικής σύνθεσης της θεμέλιας ουσίας του πολυμερούς, ο τύπος του φίλτρου και η αλληλεπίδραση του φίλτρου με τη θεμέλια ουσία, στην οποία θα προσαρμοσθεί η διαδικασία αποδόμησης [Jeanie L. Drury, David J. 2003].

Η υπάρχουσα εκτενής βιβλιογραφία στη βιοδιάσπαση των πολυμερών αποδुकνύει τη μεγάλη πολυπλοκότητα του μηχανισμού υδρόλυσης. Στο μηχανισμό και τη διαδικασία αυτή είναι απαραίτητο να γίνει κατανοητό όχι μόνο ο χρόνος που το υλικό αρχίζει να βιοδιασπάται αλλά επίσης και υπό ποιές συνθήκες συμβαίνει σε σχέση με τη χημική σύνθεση του, το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται, η θερμοκρασία, το μέγεθος και το σχήμα, η ύπαρξη ενισχυτικών σωματιών και η λειτουργικότητά τους σε όλο το σύμπλεγμα [Dunn S, Campell P, 2001]. Το **σχήμα 11** δείχνει τη διαδικασία βιοαποδόμησης σε σχέση με τους παράγοντες που την επηρεάζουν και τη σημασία τους σε βιοιατρικές εφαρμογές. Όταν μόρια νερού προσβάλλουν τους εστερικούς δεσμούς στις αλυσίδες των πολυμερών, το μέσο μήκος της αποδομούμενης αλυσίδας γίνεται μικρότερο. Η διαδικασία έχει σαν αποτέλεσμα μικρά τεμάχια της αλυσίδας με καρβοξυλικές ομάδες στα άκρα τους να ενσωματώνονται στα διαλυτά πολυμερή στο νερό. Πολύ συχνά το μοριακό βάρος τέτοιων τεμαχίων είναι σχετικά μεγάλο κάνοντας το ρυθμό διάλυσης αρκετά αργό με αποτέλεσμα τα υπολειπόμενα oligομερή να υποβιβάζουν το τοπικό pH και να καταλύουν έτσι τη διαδικασία της αποδόμησης. Ο μηχανισμός αυτός περιγράφεται ως αυτοκατάλυση και συχνά παρατηρείται σε ογκώδη βιοδιασπώμενα υλικά [Bikiaris, D. N.; Chrissafis K, 2007].

Η αποδόμηση ημικρυσταλλικών πολυεστέρων γίνεται εκλεκτικά μέσα σε άμορφες περιοχές λόγω της μεγαλύτερης πρόσληψης νερού στον ελεύθερο όγκο απ' ότι στις κρυσταλλικές περιοχές. Τα αποδομούμενα τμήματα μπορούν μετά να διαχυθούν και να επανακρυσταλοποιηθούν. Αυτή η αύξηση της κρυσταλλικότητας

κατά τη διαδικασία της υδρολυτικής αποδόμησης γίνεται αντιληπτή από τη λεύκανση του υλικού και την αλλαγή των ιδιοτήτων του [Hongli Chen, Jianzhong Bei, 2007].



Σχήμα 11: Σημασία της βιοδιάσπασης σε βιοϊατρικές εφαρμογές

3.8. Εφαρμογή νανοβιοαισθητήρων σε διαδικασία ιστικής ανάπλασης

Νανوسύμπλοκα ικρίωματα φτιαγμένα από βιοδιασπώμενα πολυμερή με ενσωματωμένη ανόργανη/οργανική φάση διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στις εφαρμογές της ιστικής μηχανικής, σε συνδυασμό με τη διασπορά αρχέγονων κυττάρων. Ο οστικός μυελός αποτελεί σημαντική πηγή μεσεγχυματικών αρχέγονων κυττάρων τα οποία μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε στοχευμένες κυτταρικές θεραπείες, όπως επίσης και σε εφαρμογές της ιστικής μηχανικής. Αυτά τα αρχέγονα κύτταρα έχουν μεγάλο και ευρύ δυναμικό διαφοροποίησης σε ποικιλία κυτταρικών πληθυσμών με συγκεκριμένα μορφολογικά, δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά, όπως νευρώνες, μυοβλάστες, οστεοβλάστες κλπ [Pittenger MF, 1999]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ αρχέγονων κυττάρων με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται είναι πολύ σύνθετη και όχι πλήρως κατανοητή. Πιο συγκεκριμένα δεν είναι πλήρως ταυτοποιημένες οι διεργασίες, μηχανικές, χημικές, ενζυμικές κλπ, με τις οποίες τα αρχέγονα αυτά κύτταρα διαφοροποιούνται προς τον έναν ή τον άλλο ιστό. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα απαντούν στις μηχανικές ιδιότητες του υλικού στο οποίο αναπτύσσονται [Discher DE 2005]. Έτσι πολυεστερικά φιλμ με το χαμηλότερο συντελεστή ελαστικότητας παρέχουν το ιδανικότερο υλικό για ανάπτυξη των κυττάρων όπως επίσης και τις πλέον κατάλληλες μηχανικές ιδιότητες για τη θέση στην οποία προορίζονται να εμφυτευθούν. Οι Rohman και συνεργάτες κατέδειξαν ότι PLGA και PCL φιλμ υποστηρίζουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό επιθηλιακών κυττάρων ουροδόχου κύστης, αλλά και λείων μυϊκών ινών [Géraldine Rohman, Jennifer J. Pettit, 2007].

Η ανάπτυξη των κυττάρων επηρεάζεται από τις μηχανικές ιδιότητες των φιλμ με διευκόλυνση του πολλαπλασιασμού τους σε φιλμ συντελεστού ελαστικότητας πολύ κοντά σ' αυτόν της φυσικής κύστης. Αυτό το εύρημα συνιστά ένα πλεονέκτημα καθώς η τροποποίηση των μηχανικών ιδιοτήτων ενός βιοϋλικού ανάλογες με αυτές του υποστρώματος που πρόκειται να εμφυτευθεί, θα βοηθήσουν τον πολλαπλασιασμό ή/και τη διαφοροποίηση αρχέγονων κυττάρων. Ο συντελεστής ελαστικότητας αποτελεί επίσης σημαντική παράμετρο τόσο σε κυτταρικό επίπεδο αλλά μπορεί και να συσχετίζεται αρκετά σε μεγάλο επίπεδο, δηλαδή σε επίπεδο οργάνων και ιστών. Αναπτύσσοντας έτσι νέες βιονανοσυνθέσεις, είναι πιθανό να

διαφοροποιούνται οι μηχανικές ιδιότητες για συγκεκριμένες 'θέσεις' [Anne L Plant, 2009]. Πολλά τέτοια μοντέλα και συστήματα έχουν αναπτυχθεί, όπως επίσης και εργαλεία μέτρησης, για την παρατήρηση αλλά και την ποσοτικοποίηση της μηχανικής στην κυτταρική απόκριση. Κατασκευασμένα συνθετικά πολυμερή νανοσυμπλέγματα επιτρέπουν ακριβή και συστηματικό έλεγχο των μηχανικών ιδιοτήτων του κυτταρικού υποστρώματος και δίνουν πληροφορίες ποσοτικού χαρακτήρα σχετικά με τις δυνάμεις που εφαρμόζονται και ασκούνται στα κύτταρα [Anne L Plant, 2009]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την επίδραση της σκληρότητας της θεμέλιας ουσίας στο φαινότυπο και την οδό της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων (MSCs). Μπορεί να διαφοροποιηθούν σε νευρογενή, μυογενή, οστεογενή φαινότυπο εξαρτώμενου αν έχουν καλλιεργηθεί σε δισδιάστατο (2D) υπόστρωμα θεμέλιας ουσίας με συντελεστή ελαστικότητας στο χαμηλότερο (0.1-1 kPa), μέσο (8-17kPa) ή ανώτερο εύρος τιμών (34kPa). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε τρισδιάστατες καλλιέργειες [Y. S. Pek, A. C. A. Wan, 2010].

3.9 Παραδείγματα χρήσης συμβατών νανοβιοαισθητήρων.

Επί του παρόντος περιορισμένος αριθμός υπαρχόντων βιοαισθητήρων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εμφυτεύσιμο υλικό. Η τεχνολογία και οι τεχνικές που περιγράφονται πιο πάνω επιτρέπουν την κατασκευή βιοσυμβατών βιοαισθητήρων για τη γρήγορη ανάλυση ύπαρξης τοξικών ουσιών. Αυτοί οι βιοαισθητήρες είναι εμφυτεύσιμοι και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Επιπρόσθετα των τεχνικών αυτών χαρακτηριστικών είναι εφικτή η παρακολούθηση ασθενών σε νοσοκομείο, με μεταφορά σημάτων σε κεντρική μονάδα (βάση δεδομένων), ανάλυση των αποτελεσμάτων και κατόπιν η ειδοποίηση των αρμοδίων ατόμων για δράση.

Ομάδα αισθητήρων από οπτικές ίνες, γνωστοί με την ονομασία Sencils, οι οποίοι είναι μίας χρήσης, εμφυτεύονται με ελάχιστα παρεμβατικές μεθόδους και μπορεί να παρέχουν παρακολούθηση διαφόρων αναλυτών για πολλές εβδομάδες. [Liao, K-C, Hogen-Esch, T, 2008]. Το κλειδί σ' αυτές τις περιπτώσεις είναι η διαδερμική τοποθέτησή τους η οποία επιτρέπει φασματοφωτομετρικές μετρήσεις χημικών αντιδράσεων σε νανοκατασκευές πολυμερών προσκολλημένων στο τελικό άκρο των οπτικών ινών εργαστηριακά κατασκευασμένα. Η πρώτη εφαρμογή της μεθόδου είχε σαν αντικείμενο τη μέτρηση της γλυκόζης του αίματος, βασισμένη στις αλλαγές μεταφοράς ενέργειας φθορισμού από φλουοροφόρα συνδεδεμένα σε βητα-κυκλοδεξτρίνη και κονκαβαλίνη A (ConA), σε υπόστρωμα πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG). Μετρήσεις in-vitro έδειξαν γρήγορη και ακριβή σχέση μεταξύ της αναλογίας εκπομπής φθορισμού και συγκέντρωσης γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό και για φυσιολογικό εύρος συγκεντρώσεων (0-500 mg/dl) για διάστημα επτά εβδομάδων. Χρόνια εμφύτευση σε πειραματόζωα έδειξε καλή βιοσυμβατότητα και ανθεκτικότητα για κλινική χρήση.

Η νανοτεχνολογία παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών εργαλείων. Η νανοτεχνολογία χρησιμοποιεί κατασκευασμένα υλικά με τη μικρότερη δυνατή λειτουργική δομή (στη νανομετρική κλίμακα) τουλάχιστον σε μία διάσταση. Μερικές πλευρές των υλικών μπορεί να τροποποιηθούν καταλήγοντας σε νέες λειτουργικές ιδιότητες. Έτσι η νανοτεχνολογία μπορεί να παρέχει συσκευές που να περιορίζουν ή και να αναστρέφουν νευροπαθολογικά στάδια διαφόρων ασθενειών, να υποστηρίξουν και να ευοδώσουν

λειτουργική αναγέννηση κατεστραμμένων νευρώνων, να παρέχουν νευροπροστασία και να διευκολύνουν τη μεταφορά φαρμάκων και μικρών μορίων διαμέσου του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, στοιχεία σχετικά με την τρέχουσα θεραπεία στη νόσο του Parkinson [Linazasoro GI, 2008].

Μικρο-ηλεκτρομηχανικοί αισθητήρες (MEMS) που έχουν το δυναμικό να επιτρέπουν μακράς διάρκειας και συνεχείς ελέγχους γλυκόζης σε υποδόριους ιστούς για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη, έχουν παρουσιασθεί πρόσφατα στη βιβλιογραφία [X Huang, S Li, JS Schultz, 2009]. Η αρχή στην οποία βασίζονται είναι η εντόπιση αλλαγών στο ιξώδες λόγω της δεσμευτικής συγγένειας μεταξύ γλυκόζης και πολύ(ακρυλαμίδιο-3-φαινυλβορονικό οξύ) (poly(acrylamide-3phenylboronic acid) (PAA-ganPAAPBA), βιοσυμβατού, ειδικού στη γλυκόζη πολυμερούς. Η συσκευή χρησιμοποιεί έναν μαγνητικά οδηγούμενο μικρομοχλό δόνησης σαν αισθητήρια συνιστώσα, κατασκευασμένου από παρυλένιο (Parylene) που επικάθεται σε ένα μικροθάλαμο. Διάλυμα PAA-gan-PAABA γεμίζει το μικροθάλαμο ο οποίος διαχωρίζεται από το περιβάλλον του με ημιδιαπερατή μεμβράνη. Η γλυκόζη εισέρχεται διαμέσου της μεμβράνης και συνδέεται αναστρέψιμα με τους εστέρες του φαινυλβορονικού οξέος του πολυμερούς. Αυτή η αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στο ιξώδες του 'αισθητήριου' διαλύματος, το οποίο λαμβάνεται με μέτρηση του εμβυθισμένου μοχλοβραχίονα δόνησης χρησιμοποιώντας έναν οπτικό μοχλό, που επιτρέπει την 'μετάφραση' της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι αυτού του είδους η συσκευή είναι ικανή να μετρήσει επίπεδα γλυκόζης σε σχετικά φυσιολογικές συγκεντρώσεις από 27 mg/dL ως 324 mg/dL. Ο χρόνος απόκρισης της συσκευής είναι περίπου 3 λεπτά, ο οποίος μπορεί να βελτιωθεί περισσότερο με βελτιστοποίηση της συσκευής. Άριστη αναστρεψιμότητα και σταθερότητα παρατηρήθηκε στην απάντηση των αισθητήρων, καθώς είναι από τις ζητούμενες παραμέτρους μακρόχρονη, σταθερή και συνεχή μέτρηση των επιπέδων γλυκόζης.

Οι βιοαισθητήρες της γλυκόζης είναι στοιχεία κλειδιά για τον γλυκαιμικό έλεγχο (σύγχρονη-αυτόματη θεραπεία με ινσουλίνη) συστημάτων αποτελεσματικής θεραπείας του διαβήτη. Παρέχοντας γρήγορη απόδοση αναλυτικών πληροφοριών σε πραγματικό χρόνο, τέτοιοι αισθητήρες προσφέρουν άμεση και αξιόπιστη εκτίμηση γρήγορων μεταβολών των επιπέδων γλυκόζης, όπως είναι επιθυμητό, ώστε να παρέχεται η βέλτιστη θεραπευτική παρέμβαση σε περιπτώσεις υπο- ή υπεργλυκαιμίας.

Η πλειονότητα των των αισθητήρων που χρησιμοποιούνται για συνεχή μέτρηση της γλυκόζης είναι αμπερομετρικά ενζυμικά ηλεκτρόδια. Η κατανόηση του γλυκαιμικού ελέγχου κλειστών αλυσίδων απαιτεί την επινόηση νέων ‘προσπελάσεων’ για την λύση προβλημάτων βιοσυγκέντρωσης, φλεγμονώδους διαδικασίας, βαθμονόμησης, σταθερότητας, εκλεκτικότητας, δυνατότητας κατασκευής εξαιρετικά μικρών υλικών, ιδιοτήτων που σχεδόν έχουν λυθεί σε άλλα συστήματα αισθητήρων. Ένα άρθρο ανασκόπησης στη βιβλιογραφία καταδύκνυει πώς οι παραπάνω προκλήσεις έχουν μελετηθεί προς την επίτευξη αξιόπιστης, συνεχούς μέτρησης της γλυκόζης σε υποδόριους ιστούς [*Joseph Wang, 2008*]. Παρόλο που οι αρχές που χρησιμοποιούνται έχουν στόχο τη μέτρηση της γλυκόζης, τέτοιας κλειστής αλυσίδας αντιμετώπισης (μέτρηση παραμέτρου-απόδοση θεραπείας), ιατρικές συσκευές θα μπορούσαν να εφαρμοσθούν για ακριβή δοσολογία φαρμακευτικών προϊόντων-ουσιών και θα είχαν απίστευτη επιρροή στη θεραπευτική προσέγγιση διαφόρων νοσολογικών οντοτήτων.

Επίσης τέτοιου είδους συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη καταγραφή νευρωνικών σημάτων από τη φλοιώδη μοίρα του εγκεφάλου με αντικειμενικό σκοπό την επικοινωνία (πχ τεχνητά ή βιολογικά νευρωνικό σήμα σε τεχνητό μέλος για λειτουργία). Το κλειδί σε αυτά τα νευροπροθετικά συστήματα είναι η νευροτεχνική διεπιφάνεια ή με άλλα λόγια το σύστημα των ηλεκτροδίων και έχουν περιγραφεί διάφορα συστήματα και τεχνικές με τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς τους [*Stieglitz T, Rubehn B, 2009*]

3.10 Το μέλλον

Οι επόμενης γενιάς βιοϊατρικοί νανοαισθητήρες αναμένεται να είναι υβριδικοί. βιολειτουργικοί, ‘ευφυείς’ και περιέχοντες ενεργά συστατικά. Συνθέσεις πολυμερών έχουν το πλεονέκτημα να είναι ευέλικτοι, επιτρέποντας την τροποποίηση των ιδιοτήτων τους. Τα βιονανοσύμπλοκα μπορεί να σχεδιασθούν και να κατασκευασθούν χρησιμοποιώντας ευρεία γκάμα μητρών πολυμερούς, να ενισχυθούν και να κατασκευαστούν με συγκεκριμένες ιδιότητες. Το αποτέλεσμα είναι ακόμη εύπλαστο και πολλή από την έρευνα είναι ακόμη σε εξέλιξη. Οι βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται υποδεικνύουν ότι ο συνδυασμός βιοδιασπώμενων πολυμερών και νανοσυνθέσεων ανοίγει νέες δυνατότητες για βιοϊατρικές εφαρμογές στις νανοκατασκευές επιτρέποντας ακριβή τροποποίηση των μηχανικών, θερμικών, μορφολογικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων τους.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΥ ΣΕ ΝΑΝΟΤΟΙΧΩΜΑΤΑ ZnO ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΕΝΗ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

4.1 Εισαγωγή

Η εκτίμηση των επιπέδων της χοληστερόλης στο ανθρώπινο σώμα είναι ζωτικής σημασίας για τους ιστούς και τον ρόλο τους στην παρασκευή των στεροειδών, της οξυστερόλης και των χολικών οξέων [E. Ikonen, 2009]. Τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης μπορούν να αποτελέσουν μια εν δυνάμει σοβαρή απειλή για τον οργανισμό με την μορφή παθολογιών όπως των ανοϊκών συνδρόμων, του σακχαρώδη διαβήτη, νεοπλασιών και άλλων εγκεφαλικών και καρδιαγγειακών νοσημάτων [F. R. Maxfield, I. Tabas, 2005].

Η ανάγκη ελέγχου των επιπέδων της χοληστερόλης στο ανθρώπινο αίμα οδήγησε στην κατασκευή αποτελεσματικών και συγχρόνως μεγάλων στο μέγεθος βιοαισθητήρων. Έως σήμερα έχει ερευνηθεί μια μεγάλη ποικιλία υλικών για την κατασκευή βιοαισθητήρων που να διαθέτουν επιλεκτικότητα και γρήγορη απόκριση και μεταξύ αυτών των υλικών το οξείδιο του ψευδαργύρου (ZnO) φαίνεται να είναι ένας από τους πιο σοβαρούς διεκδικητές για τη διαμόρφωση ενός απλού, βιοασφαλή και αξιόπιστου βιοαισθητήρα με χαμηλό κόστος παραγωγής. Οι διαφορετικές δομές – σε νανοκλίμακα- που μπορεί να προσλάβει το ZnO λόγω της μεγάλης ειδικής του επιφάνειας και των εξαιρετικών ηλεκτρικών και θερμικών του ιδιοτήτων, το έχουν τοποθετήσει στο κέντρο της προσοχής των ερευνητών [J. R. Sadaf, M. Q. Israr, 2010]. Πρόκειται για ένα ημιαγώγιμο υλικό τύπου n με ευρύ ενεργειακό διάκενο ($E_g=3.37$ eV), μεγάλη ικανότητα δέσμευσης εξιτονίων (60 meV) [J. F. Li, L. Z. Yao, 2001] και ιδιαίτερες ηλεκτρονικές και οπτικές ιδιότητες. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι τόσο το μέγεθος και το σχήμα όσο και η μορφολογία επιδρούν καταλυτικά στις ιδιότητες των υλικών. Ως εκ τούτου, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στη σύνθεση μιας μεγάλης ποικιλίας νανοδομών ZnO, όπως νανοσωματίδια [S. C. Navale, 2008], νανοςύρματα [L. E. Greene, B. D. Yuhas, 2006], νανοϊμάντες [Z. R. Dai, Z.W. Pan, 2003], νανοράβδοι [B. Liu, H. C. Zeng, 2003], νανοσωλήνες [A. B.F. Martinson, J. W. Elam, 2007] και νανοτοιχώματα [A. P. Nayak, A. M. Katzenmeyer, 2012] για διάφορες εφαρμογές. Ειδικότερα τα νανοτοιχώματα, τα νανοςύρματα και οι νανοράβδοι έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον στην κατασκευή αισθητήρων λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων τους, συμπεριλαμβανομένης της μεγάλης επιφάνειας-προς-όγκο αναλογίας, της εξαιρετικής βιολογικής συμβατότητας, των υψηλών ποσοστών μεταφοράς ηλεκτρονίων, της μη τοξικότητας και της

βιοασφάλειας. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι το ZnO παρουσιάζοντας υψηλό ισοηλεκτρικό σημείο (IEP=9,5) είναι κατάλληλο για την προσρόφηση των πρωτεϊνών και των ενζύμων με χαμηλό IEP. Συγκεκριμένα, οι θετικά φορτισμένες νανοράβδοι ZnO όχι μόνο παρέχουν ένα φιλικό μικροπεριβάλλον για τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες ή ένζυμα, ώστε να διατηρήσουν τη δραστηριότητά τους, αλλά προώθησε επίσης σε μεγάλο βαθμό την απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του ενζύμου και του ηλεκτροδίου [B. Liu, H. C. Zeng, 2003]. Οι Zhang et al [F. F. Zhang, X. L. Wang, S, 2010] κατάφεραν να σταθεροποιήσουν το ένζυμο της ουρικής πάνω σε νανοράβδους ZnO για την κατασκευή ενός βιοαιθητήρα του ουρικού οξέος, ενώ πρόσφατα, δημοσιεύθηκε μελέτη που χρησιμοποιεί μια χημική προσέγγιση για την ταχεία ανάπτυξη νανοτοιχείων ZnO που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αισθητήρες του αερίου του ηλίου και της αμμωνίας [A. P. Nayak, A. M. Katzenmeyer, 2012].

Ο μεταβολισμός της χοληστερόλης περιλαμβάνει το σημαντικό ένζυμο της οξειδάσης της χοληστερόλης (ChOx) το οποίο λειτουργεί ως ένα πολύ καλό αισθητήριο μέσο στους ηλεκτροχημικούς βιοαιθητήρες. Επιπλέον, το αρνητικά φορτισμένο ένζυμο ChOx έχοντας χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο (IEP) παρέχει μια πολύ καλή σταθεροποίηση, σε περιβάλλον ουδέτερου pH, με τα θετικά φορτισμένα ιόντα Zn του ZnO, το οποίο παρουσιάζει υψηλό ισοηλεκτρικό σημείο (IEP) λόγω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης [M. Q. Israr, J. R. Sadaf, 2010] και η οποία θα μπορούσε να επιτευχθεί ποικιλοτρόπως, είτε με ομοιοπολικούς δεσμούς [V. Bisht, W. Takashima, 2005], εγκλωβισμό [S. P. Singh, A. Chaubey, 2004; H. Y. Wang, S. L. Mu, 1999] ή σταυροειδείς δεσμούς (crosslinking) [Y. Tamiya, Y. Sugiura, 1990].

Οι μεμβράνες λιπιδίων μπορούν να αποτελέσουν εξαιρετικό υπόστρωμα για την διατήρηση και μετάδοση της δραστηριότητας πολλών βιοχημικά εκλεκτικών ουσιών, όπως τα ένζυμα, τα αντισώματα και οι υποδοχείς [J. Janata, 1990]. Ενός τέτοιου είδους υπόστρωμα θα είχε ένα πάχος της τάξεως των 10nm και μια ζώνη αντίδρασης σημαντικά μικρότερου πάχους, θέση που υποδεικνύει ότι οι χρόνοι απόκρισης του αισθητήρα μπορεί να είναι πολύ μικρότεροι. Οι διστρωματικές λιπιδικές μεμβράνες (BLM) είναι κατάλληλες για την μετάδοση των χημικών αντιδράσεων λόγω της αύξησης της αγωγιμότητας των ιόντων η οποία παρατηρείται όταν η φυσική ή η ηλεκτροστατική δομή διαταράσσεται από τέτοιες αντιδράσεις. Μια συγκεκριμένη διαδικασία που θα μπορούσε να παρέχει ταχεία απόκριση περιλαμβάνει την αποθήκευση της ηλεκτρικής ενέργειας κατά μήκος της μεμβράνης λόγω της φόρτισης

του διπλού ηλεκτρικού στρώματος. Ένα κρίσιμο φαινόμενο που σχετίζεται με την ταχεία μεταβολή του βαθμού του ιονισμού των λειτουργικών ομάδων που βρίσκονται στην επιφάνεια της μεμβράνης μπορεί να παρέχει ένα ταχύ και μεγάλο σήμα που βασίζεται σε ένα παροδικό ρεύμα ιόντων το οποίο θα έχει μια εμφάνιση παρόμοια με εκείνη που παρατηρείται κατά τη δίοδο των διαυλικών ιόντων [*Ionic Channels of Excitable Membranes (Ed: B. Hille), Sinauer, Sunderland, MA 1984*].

Η αναλυτική χρησιμότητα αυτών των συσκευών αποδείχθηκε πρόσφατα με έναν αριθμό πειραμάτων [*D. P. Nikolelis, C. G. Siontorou, 1995*], ενώ ένα πρόσφατο άρθρο ανασκόπησης παρουσιάζει τις αναλυτικές εφαρμογές των βιοαισθητήρων που βασίζονται στα λιπίδια [*D. P. Nikolelis, T. Hianik, 2010*].

Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στον σχεδιασμό, τις αναλυτικές εφαρμογές και την σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων που βασίζονται στις μεμβράνες λιπιδίων. Η σταθερότητα αυτών των μεμβρανών μετά από έκθεση στον αέρα είναι ένα σημαντικό κριτήριο για την χρήση αυτών των συσκευών ως πρακτικών βιοαισθητήρων. Πρόσφατα, περιγράφηκε στην βιβλιογραφία η παρασκευή μεμβρανών λιπιδίων οι οποίες μπορούν να αποθηκευτούν στον αέρα και να χρησιμοποιηθούν ως μορφοτροπείς για πολλές επαναλαμβανόμενες χρήσεις [*D. P. Nikolelis, M. Mitrokosta, 2002*].

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν να δημιουργήσει έναν ποτενσιομετρικό βιοαισθητήρα που να βασίζεται σε μία μεμβράνη λιπιδίων με ενσωματωμένο το ένζυμο επί των νανοτοιχείων ZnO, ο οποίος θα μπορούσε να μεταδώσει ταχέως την αντίδραση ενός ενζύμου ώστε να παράσχει ένα ηλεκτροχημικό σήμα ως αποτέλεσμα μιας διαδικασίας επιφανειακής φόρτισης, η οποία με τη σειρά της παρήχθη με μεταβολή της δομής του ηλεκτροχημικού διπλού στρώματος.

Η λιπιδική μεμβράνη σχηματίζεται επί ενός μικροπορώδους υλικού, όπως οι μικροϊνες υάλου, με την διαδικασία του πολυμερισμού. Το μεθακρυλικό οξύ αποτελεί το λειτουργικό μονομερές για τον πολυμερισμό, η διμεθακρυλική αιθυλενο-γλυκόλη είναι το μέσο διασύνδεσης (crosslinker) ενώ το 2-αζωδις- (2 μεθυλοπροπιονιτρίλιο) (AIBN) είναι ο εκκινητής. Αυτές οι λιπιδικές μεμβράνες διπλής στιβάδας (BLM) εντός του πολυμερούς μπορούν να εκτεθούν στον αέρα για περισσότερο από ένα μήνα και να συνεχίσουν να παρέχουν άμεση απόκριση σε διάφορες αναλυόμενες ουσίες [*D. P. Nikolelis, D. A. Drivelos, 2004; D. P. Nikolelis, M. G. Simantiraki 2005*]. Ωστόσο, σε αυτή την ερευνητική εργασία, το ένζυμο ενσωματώθηκε στο λιπιδικό υμένιο μετά τον σχηματισμό του με πολυμερισμό. Επιπλέον, σε μια εργασία

μας, η διαδικασία πολυμερισμού πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ακτινοβολία UV αντί για θέρμανση του μίγματος των λιπιδίων στους 60 °C [D. P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2006]. Καθ'αυτόν τον τρόπο, αυτή η διαδικασία διατήρησε τη δραστηριότητα ενός ενζύμου (π.χ. ακετυλχολινεστεράσης), ενώ η θέρμανσή του θα μπορούσε να το απενεργοποιήσει. Αυτή η μέθοδος παρασκευής λιπιδικών μεμβρανών μελετήθηκε επίσης με την χρήση της φασματοσκοπίας Raman [D. P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2008]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διαδικασία του πολυμερισμού ολοκληρώνεται εντός 4 ωρών και αυτό καθιστά δυνατή την πρακτική χρήση των τεχνικών που βασίζονται σε μεμβράνες λιπιδίων για την ανίχνευση ουσιών, διότι έτσι επιτρέπεται η ενσωμάτωση των υποδοχέων των διαύλων ιόντων σε αυτά τα φιλμ λιπιδίων (μεμβράνες λιπιδίων), και κατ'επέκταση, η κατασκευή φορητών συσκευών για την ταχεία οπτική ανίχνευση των τοξικών ουσιών στο περιβάλλον, στα τρόφιμα και τα κλινικά δείγματα.

Ανακεφαλαιώνοντας, στη συνέχεια παρουσιάζεται στο πειραματικό τμήμα η διαδικασία ανάπτυξης ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων που βασίζονται σε σταθεροποιημένη πολυμερισμένη λιπιδική μεμβράνη με ενσωμάτωση ενός ενζύμου σε νανοτοιχώματα ZnO για την ανίχνευση των μορίων της χοληστερόλης. Καθ'αυτόν τον τρόπο βελτιώνεται η εκλεκτικότητα η ευαισθησία και η αποτελεσματικότητα ανίχνευσης των μορίων προς εξέταση. Επιπλέον, ο συνδυασμός της δομής του λιπιδικού φιλμ με την μικροδομή του υποστρώματος ZnO θα μπορούσε να προσφέρει μεγαλύτερη ικανότητα προσρόφησης για την οξειδάση της χοληστερόλης λόγω της υψηλής αναλογίας επιφάνειας-προς-όγκο των νανοτοιχείων και την διαλυτότητα της χοληστερόλης στο υπόστρωμα λιπιδίων.

4.2 Αντιδραστήρια και διαλύματα

Χρησιμοποιήθηκαν χοληστερόλη, οξειδάση της χοληστερόλης (ChOx EC 1.1.3.6, 28 Umg 1), και διπαλμιτοϋλ-φωσφατιδυλοχολίνη (C16:0) (DPPC) και διατέθηκαν από την Sigma, Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Το μεθακρυλικό οξύ και η διμεθακρυλική αιθυλενογλυκόλη διατέθηκαν από την Aldrich (Aldrich-Chemie, Steinheim, Germany) ενώ ο εκκινητής 2,2-αζωδις-(2-μεθυλοπροπιονιτρίλιο) (AIBN), διατέθηκε από την Merck KgaA (Ντάρμστατ, Γερμανία). Το νερό καθαρίστηκε μέσω ενός συστήματος φιλτραρίσματος / διήθησης Mill-Q (Milli-Q, Millipore, El Paso, TX, USA) και είχε ελάχιστη αντίσταση στα 18 MΩ cm. Τα φίλτρα και το μέγεθος των πόρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από μικροΐνες υάλου (0.7 and 1.0 μm, Whatman Scientific Ltd., Kent, UK).

Μια σειρά ρυθμιστικών διαλυμάτων από φωσφορικά (PBS) παρασκευάστηκαν από 0,05M Na₂HPO₄, 0,05M KH₂PO₄ και τον ηλεκτρολύτη NaCl (0,9%). Όλες οι άλλες χημικές ουσίες ήταν της κατηγορίας των αναλυτικών καθαρών αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Η ChOx διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (1x10⁻² M) στη συγκέντρωση των 500 U/ml. Το διάλυμα της χοληστερόλης παρασκευάστηκε σε ένα υδατικό διάλυμα με αραιώση σε 50 mL και περιείχε 1 mL 2-προπανόλης και 1 mL Triton X-100. Όλα τα διαλύματα του ενζύμου φυλάχθηκαν στους -8 °C ενώ καθ'όλο το πείραμα χρησιμοποιήθηκε διπλά απιονισμένο νερό.

4.3 Οργανολογία

Τα πειράματα SEM πραγματοποιήθηκαν με την χρήση ενός μηχανήματος Quanta SEM (Model Quanta 250, FEI, Αϊντχόβεν, Ολλανδία). Για την μέτρηση του δυναμικού των νανοσυρμάτων ZnO των αισθητήρων που εξετάστηκαν χρησιμοποιήθηκε ένα ψηφιακό ηλεκτρόμετρο (Model 614, Keithley Instruments, Cleveland, OH). Τέλος, για τις μετρήσεις του χρόνου απόκρισης χρησιμοποιήθηκε ένας ποτενσιοστάτης/γαλβανόμετρο (Model 363A, EG & G, USA).

4.3.1 Κατασκευή ακατέργαστου αισθητήρα χοληστερόλης

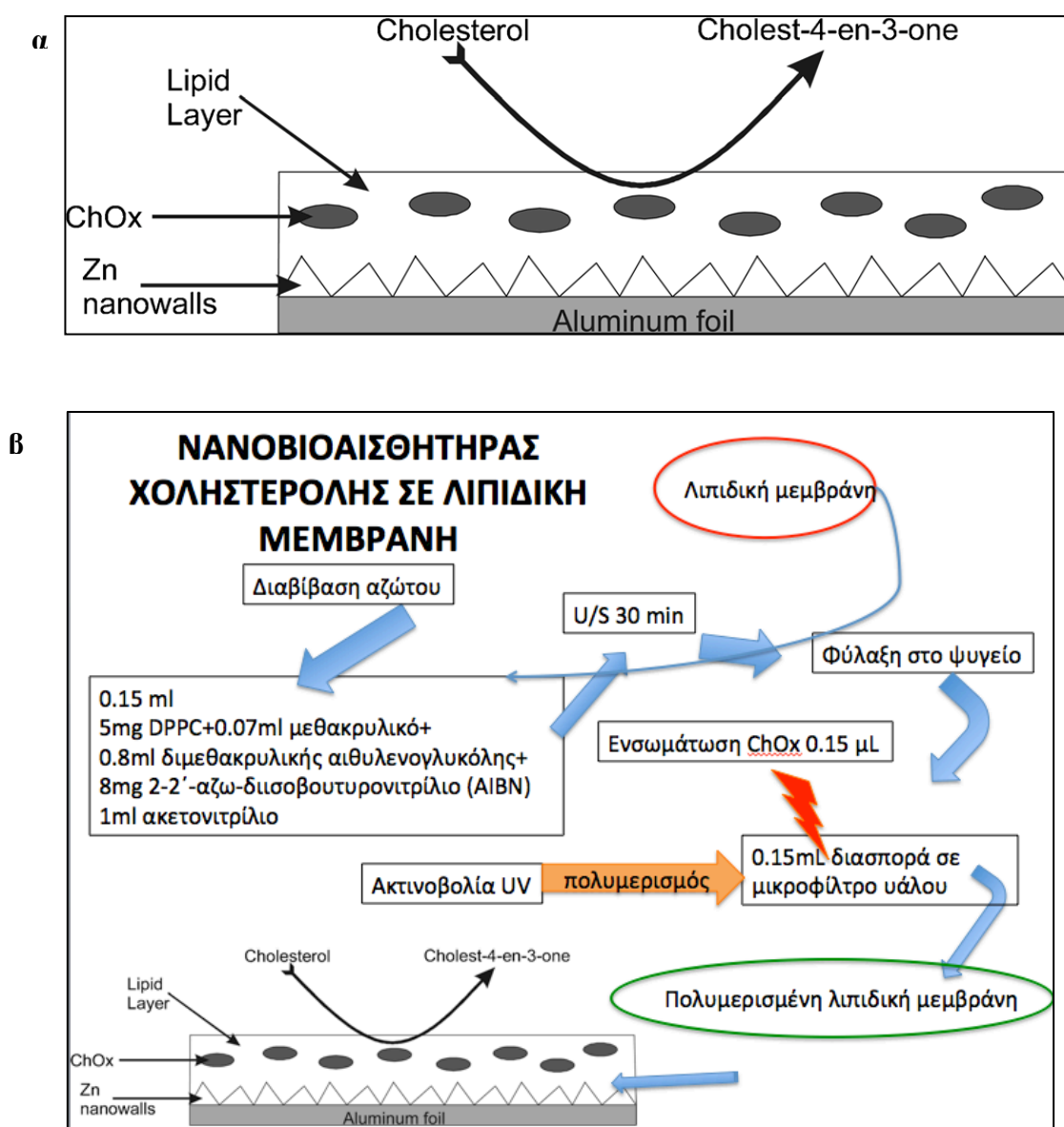
Οι μη τροποποιημένοι βιοαισθητήρες αποτελούμενοι από την απόθεση νανοτοιχείων ZnO σε φύλλα αλουμινίου (Al) (μέγεθος 1x1 εκ.), παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας (5×10^{-2} M) ισομοριακής συγκέντρωσης εξαένδρου νιτρικού ψευδάργυρου [$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99.9% καθαρότητας] και μεθαμίνης [$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$, 99.9% καθαρότητας] χρησιμοποιώντας την γνωστή ηχοχημική μέθοδο των Nayak et al [*A. P. Nayak, A. M. Katzenmeyer, 2012*]. Το φύλλο καλύφθηκε από κολλητική ταινία κατά το 1/3 κατά τη διάρκεια κατεργασίας. Το τμήμα αυτό χρησιμοποιήθηκε ως σημείο επαφής για τις μετρήσεις.

4.3.2 Κατασκευή αισθητήρων με χρήση σταθεροποιημένης λιπιδικής μεμβράνης

Οι σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο του πολυμερισμού με παρόμοια διαδικασία με αυτήν που προαναφέρθηκε στη βιβλιογραφία [*D. P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2006; D. P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2008*]. Διάλυμα 0,15mL που περιείχε 5mg DPPC αναμείχθηκε με 0.070mL μεθακρυλικού οξέος, 0.8mL διμεθακρυλικής αιθυλενογλυκόλης, 8mg 2,2-αζωδισ-2-μεθυλοπροπιονιτριλίου και 1.0mL ακετονιτριλίου. Στη συνέχεια, ακολούθησε διαβίβαση αζώτου για ένα λεπτό, κατεργασία με υπερήχους για 30 λεπτά και φύλαξη του σε ψυγείο. Για την παρασκευή των σταθεροποιημένων λιπιδικών μεμβρανών, 0,15mL από αυτό το μίγμα εναποτέθηκε επί ενός μικροφίλτρου και στη συνέχεια ακτινοβολήθηκε με λαμπτήρα UV- δευτερίου. Η όλη διαδικασία του πολυμερισμού παρακολούθηθηκε με την χρήση φασματομετρίας Raman [*D. P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2006; D. P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2008*]

Η ChOx ενσωματώθηκε σε αυτές τις λιπιδικές μεμβράνες πριν τον πολυμερισμό τους με εναπόθεση 15mL του εναιωρήματος του ενζύμου με το μίγμα του πολυμερισμού (δηλαδή, για την παρασκευή των σταθεροποιημένων μεμβρανών λιπιδίων εναποτέθηκαν 0,15 mL του μίγματος του πολυμερισμού και 15μL του εναιωρήματος του ενζύμου στο μικροφίλτρο).

Η οριστική κατασκευή του ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα χοληστερόλης ολοκληρώθηκε με την ενθυλάκωση του φίλτρου που υποστήριζε το πολυμερισμένο λιπιδικό υμένιο σε σύρμα που περιείχε τα προαναφερθέντα νανοτοιχεία ZnO. Το σχήμα του βιοαισθητήρα φαίνεται στο σχήμα (σχήμα 12 α), ενώ στο σχήμα 12 β απεικονίζεται σχηματικά η όλη διαδικασία κατασκευής του βιοαισθητήρα.

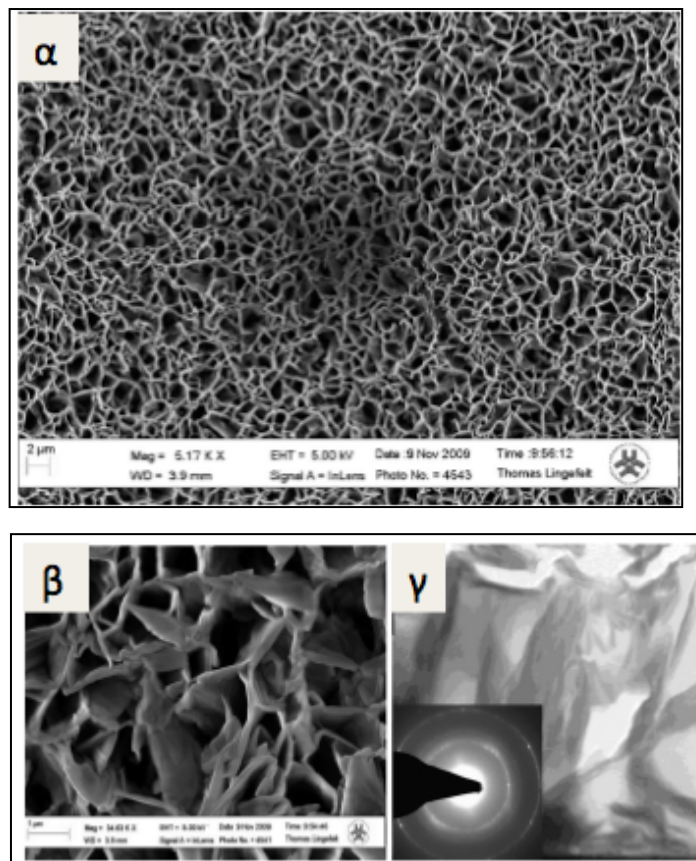


Σχήμα 12 α: Σχηματικό διάγραμμα του βιοαισθητήρα β: Σχηματικό διάγραμμα της διαδικασίας κατασκευής του νανοβιοαισθητήρα χοληστερόλης σε λιπιδική μεμβράνη

4.4 Αποτελέσματα

4.4.1 Έλεγχος της επιφανειακής δομής του αισθητήρα με SEM

Η μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM) χρησιμοποιήθηκε για να απεικονίσει την τρισδιάστατη δομή των νανοτοιχείων ZnO. Το **σχήμα 13α** απεικονίζει μια πανοραμική λήψη των ομοιογενώς καλλιεργημένων νανοτοιχείων, σχεδόν κάθετων, με το σύρμα αλουμινίου με μέσο πάχος τα 80nm, παρ'όλο που μια πιο σαφής εικόνα της επιφάνειας των νανοτοιχείων θα μπορούσε να φανεί στο **σχήμα 13β**.



Σχήμα 13: (α) Πανοραμική άποψη, μικροσκοπικής σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM,) νανοτοιχωμάτων οξειδίου του ψευδαργύρου με μέσο πάχος 80nm συντεθειμένων σε συρματα αλουμινίου. (β) Υψηλής μεγέθυνσης λήψη SEM, που απεικονίζει τη λεία και καθαρή επιφάνεια των νανοτοιχείων. (γ) Λήψη με χαμηλής ανάλυσης ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (LRTEM) απεικονίζει τη λεία επιφάνεια των νανοτοιχείων, ενώ η ένθετη λήψη απεικονίζει την ενιαία κρυσταλλική φύση της δομής των νανοτοιχωμάτων

Το χαμηλής ανάλυσης ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (LRTEM) απεικονίζει την λεία επιφάνεια των νανοτοιχιών (σχήμα 13γ), όπου το κύριο θέμα εμφανίζει ένα μοτίβο περίθλασης ηλεκτρονίων επιλεγμένης περιοχής (SAED), δείχνοντας έτσι την ενιαία κρυσταλλική φύση της κατασκευής.

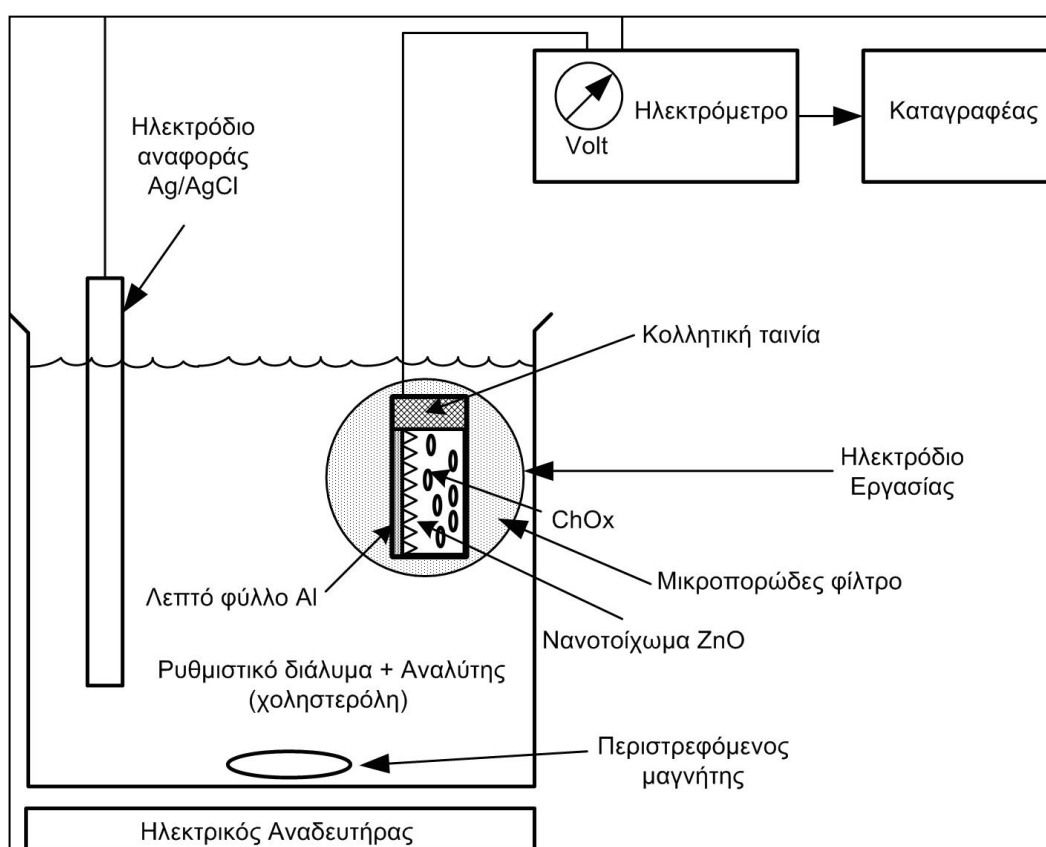
4.4.2 Έλεγχος βιοαισθητήρα χοληστερόλης σε χρόνο απόκρισης, γραμμικότητα , επαναληψιμότητα και σταθερότητα.

Η ηλεκτροχημική απόκριση μετρήθηκε με τη χρήση του συστήματος δύο ηλεκτροδίων -του βιο ηλεκτροδίου και του ηλεκτροδίου αναφοράς (Ag/AgCl)- και η προκύπτουσα ηλεκτροχημική απόκριση (ηλεκτρεγερτική δύναμη, EMF) μετράται ως μια σχετική απόκλιση μεταξύ του δυναμικού αυτών των δύο ηλεκτροδίων (σχήμα 14). Στο σχήμα εμφανίζεται διαγραμματικά η πειραματική διάταξη της λειτουργίας του βιοαισθητήρα. Σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων της χοληστερόλης παρατηρήθηκε ένας μικρός χρόνος απόκρισης με το 95% της κατάστασης σταθερής τάσης να επιτυγχάνεται εντός 5 δευτερολέπτων. Μαζί με τα άλλα χαρακτηριστικά, το παρόν βιοηλεκτρόδιο έχει μία γρήγορη απόκριση τάσης εξόδου ως συνάρτηση με τον χρόνο. Το σταθερό σήμα εξόδου επιτυγχάνεται στα πρώτα 5 δευτερόλεπτα, γεγονός που δείχνει την δυνατότητα μιας γρήγορης ηλεκτροχημικής μεταφοράς μεταξύ της επιφάνειας των νανοτοιχιών ZnO και των μορίων της χοληστερόλης. Το διάγραμμα βαθμονόμησης είναι ημιλογαριθμικού χαρακτήρα και το δυναμικό (E Volts) σχετίζεται με την συγκέντρωση της χοληστερόλης (M) στο διάλυμα με την εξίσωση: $E_{Volts}=0.0403+0.0571 \log C$ εντός του εύρους συγκέντρωσης από $1 \times 10^{-6} M$ έως $1 \times 10^{-3} M$.

Ο μηχανισμός πίσω από την διακύμανση των τιμών EMF θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης διαφορετικών συγκεντρώσεων των μορίων χοληστερόλης στην επιφάνεια του βιο ηλεκτροδίου για διαφορετικές συγκεντρώσεις χοληστερόλης στο διάλυμα. Επιπλέον, τα νανοτοιχεία ZnO διαθέτοντας μεγάλη αναλογία επιφάνειας προς όγκο και εναλλασσόμενες στιβάδες θετικών και αρνητικών ιόντων κατά μήκος του μη πολικού επιπέδου, παρέχουν ένα κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την προσρόφιση της ChOx βελτιώνοντας την ευαισθησία του παρόντος βιοηλεκτροδίου. Αυτά τα σημαντικά χαρακτηριστικά της διάταξης θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας και της εξειδίκευσής της λόγω της μεγάλης ταχύτητας μεταφοράς φορτίου και των ιδιοτήτων βιοαναγνώρισης. Επιπλέον, το βιοηλεκτρόδιο

παρουσιάζει υψηλή ηλεκτροχημική απόκριση εξόδου ίση με 57 mV/decade χωρίς να επηρεάζεται από τον όγκο του διαλύματος χοληστερόλης και την αισθητήρια επιφάνειά ανίχνευσής του.

Η αναπαραγωγιμότητα των πέντε νανοτοιχείων /ηλεκτροδίων της οξειδάσης της χοληστερόλης όταν εμβαπτίζονται σε διάλυμα 100mM χοληστερόλης ήταν μικρότερη του 5%. Επιπλέον, τα αποτελέσματα από τα τρία πειράματα έδειξαν καλή σταθερότητα και γραμμικότητα σε ρυθμιστικό PBS διάλυμα pH 7,4.

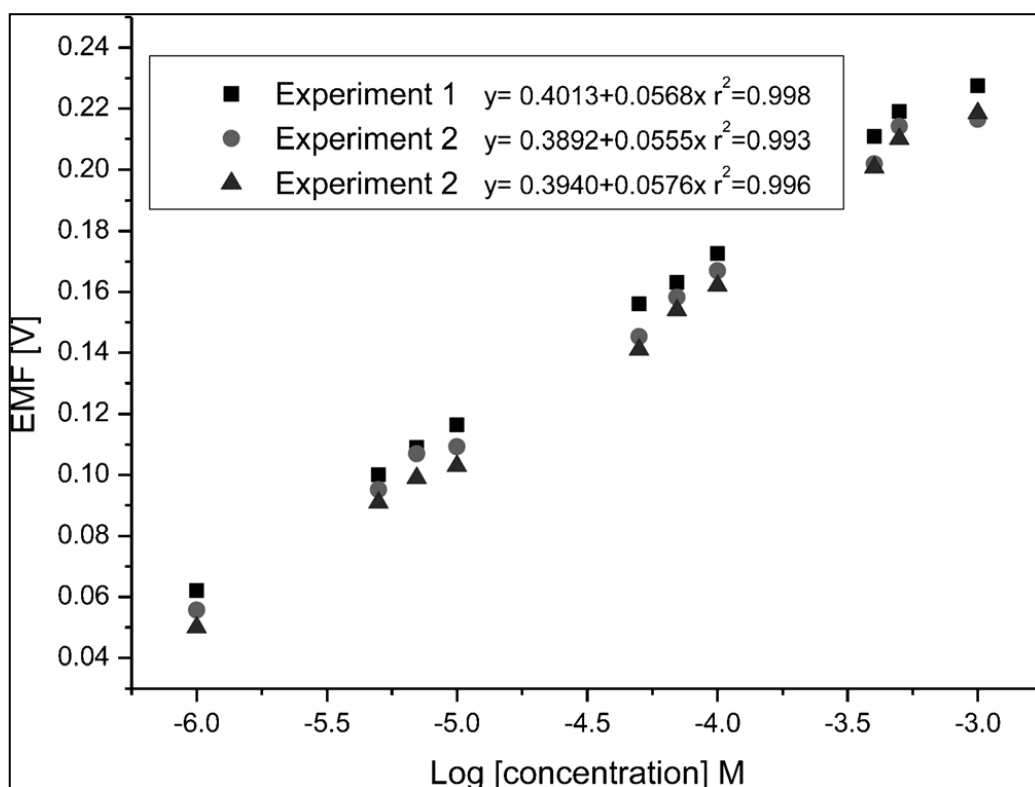


Σχήμα 14: Σχηματική διάταξη της λειτουργίας του ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα χοληστερόλης

Το **σχήμα 15** δείχνει καμπύλες βαθμονόμησης από τρία διαφορετικά πειράματα, χρησιμοποιώντας το ίδιο ηλεκτρόδιο του αισθητήρα και του ηλεκτροδίου αναφοράς Ag/AgCl. Τα αποτελέσματα δείχνουν εξαιρετική σταθερότητα και γραμμικότητα σε ρυθμιστικό PBS διάλυμα με pH 7,4. Μετά από κάθε μέτρηση το ηλεκτρόδιο του αισθητήρα εμβαπτιζόταν σε διάλυμα PBS και φυλάχθηκε στους 4 °C διατηρώντας το 90% της αρχικής του δραστηρότητας επιδεικνύοντας καλή απόκριση στην

χοληστερόλη. Επιπλέον, η σταθερότητα του βιοηλεκτροδίου δοκιμάστηκε με μια σειρά από επαναλαμβανόμενα πειράματα σε καθημερινή βάση για 30 ημέρες με τη φύλαξή του σε κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες πριν και μετά τις μετρήσεις.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο βιοαισθητήρας διαθέτει εξαιρετική ικανότητα χρόνου σταθερότητας διατηρώντας την ευαισθησία του και την δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής του για μακρές χρονικές περιόδους. Αυτό το ηλεκτρόδιο του αισθητήρα χρησιμοποιήθηκε περιοδικώς και αποθηκεύτηκε στους 4 °C για περισσότερο από 4 εβδομάδες διατηρώντας μέχρι το 90% της αρχικής του δραστηριότητας δείχνοντας καλή απόκριση στην χοληστερόλη.



Σχήμα 15: Καμπύλες ηλεκτροχημικής βαθμονόμησης σε επαναλαμβανόμενα πειράματα χρησιμοποιώντας τον ίδιο βιοαισθητήρα, έδειξαν εξαιρετική δυνατότητα επαναχρήσης του, σε pH 7.4

4.4.3 Μηχανισμός δημιουργίας σήματος

Η υψηλή ευαισθησία του εν λόγω βιοαισθητήρα σε σύγκριση με τους προηγούμενους αισθητήρες [M. Q. Israr, J. R. Sadaf, 2010] οφείλεται στον

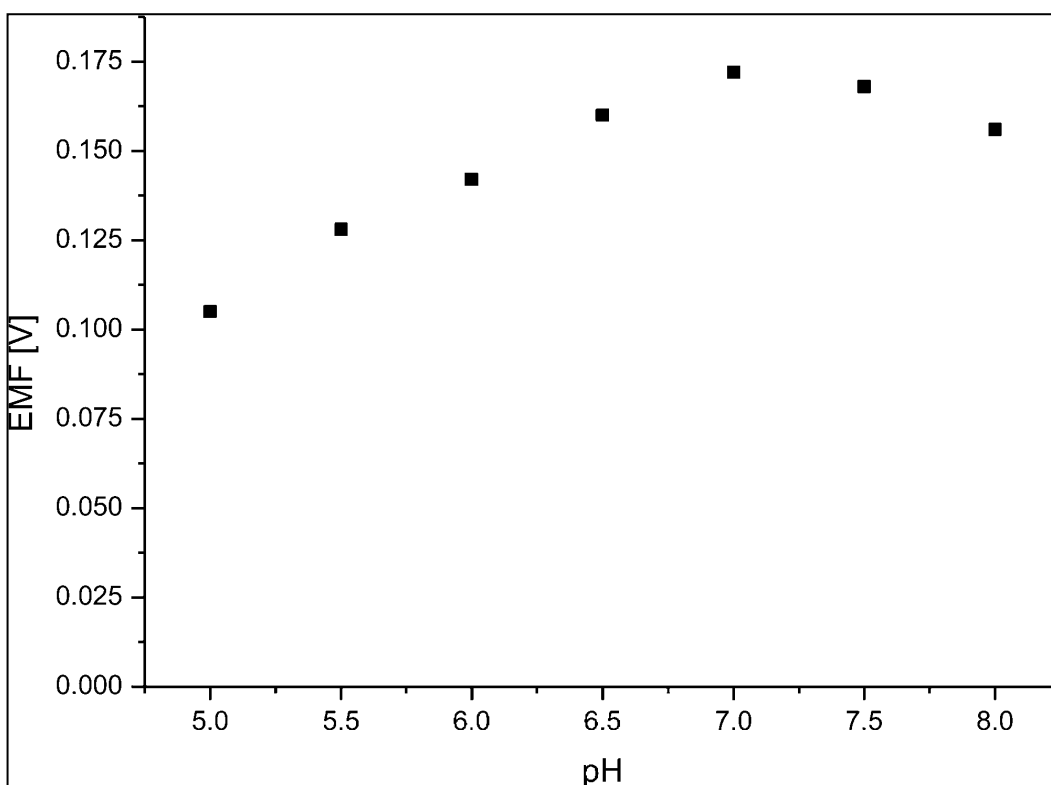
συνδυασμό του υμενίου λιπιδίων με το ηλεκτρόδιο ZnO. Είναι γνωστό ότι η χοληστερόλη μεταβάλλει τη φυσική κατάσταση των λιπιδικών μεμβρανών οι οποίες επιδεικνύουν μια ισχυρή λιπόφιλη δομή, προσελκύνοντας έτσι τα μόρια χοληστερόλης στην επιφάνεια του υμενίου. Κατ'επέκταση, αυξάνεται η συγκέντρωση της χοληστερόλης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, το οποίο με τη σειρά του αυξάνει την ευαισθησία του εν λόγω βιοαισθητήρα. Επιπλέον, η αυξημένη συγκέντρωση χοληστερόλης επί της επιφάνειας του λιπιδικού υμενίου μεταβάλλει την φυσική κατάσταση του λιπιδικού υμενίου (δηλαδή η υγρή κρυσταλλική δομή μεταβάλλεται σε δομή τύπου γέλης), επιδεικνύοντας έτσι την αυξημένη αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων της χοληστερόλης και των λιπιδίων και η οποία με τη σειρά της αυξάνει περαιτέρω την συγκέντρωση της χοληστερόλης στην επιφάνεια του αισθητήρα.

4.4.4 Μελέτη της επίδρασης του pH, του τύπου του ρυθμιστικού διαλύματος, της θερμοκρασίας και διαφόρων παρεμποδιστών.

Δεδομένου ότι η δραστηριότητα της ChOx επηρεάζεται από το pH του PBS, μελετήθηκε η επίδραση του pH - για τιμές από 4,5 έως 8,5- στην απόδοση του βιοαισθητήρα. Όπως φαίνεται καθαρά στο **σχήμα 16**, ο βιοαισθητήρας εμφανίζει την βέλτιστη απόκριση σε τιμή pH 7,4. Επομένως, όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε τιμές pH 7,4 PBS.

Επίσης μελετήθηκε η επίδραση του τύπου του ρυθμιστικού διαλύματος στην απόκριση του ηλεκτροδίου. Οι διάφοροι εξουδετερωτές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το οξικό νάτριο, το τρις-υδροξυμεθυλο-αμινομεθάνιο (Tris, Calbiochem, Germany) και η φύση της ουσίας που παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα. Η μέγιστη ευαισθησία επετεύχθη χρησιμοποιώντας το διάλυμα του φωσφορικών, ενώ η δραστηριότητα του ενζύμου φαίνεται ότι εξαρτάται όχι μόνο από τον τύπο του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται, αλλά επίσης και από την συγκέντρωσή του, με μέγιστη δραστηριότητα ενζύμου και απόκριση ανάμεσα στο εύρος συγκέντρωσης από 50 έως 100mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφόρου. Τα ως άνω συνάδουν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών [*S. Singh, P. R. Solanki, 2006*], που αναφέρουν ότι το ρυθμιστικό διάλυμα δεν επηρεάζει μόνο τη δραστηριότητα και σταθερότητα ενός ενζύμου λόγω της ενεργοποίησης ανιόντων ή των μεταβολών στην επιφάνεια, αλλά επηρεάζει επίσης και την θερμοδυναμική της αντίδρασης.

Ένας βιοαισθητήρας, σε γενικές γραμμές, χρειάζεται χημική εκλεκτικότητα για τις αναλυόμενες ουσίες σε σχέση με τις παρεμποδίζουσες ουσίες και η οποία συνήθως ενισχύεται με την προσθήκη ενός υποδοχέα στις μεμβράνες. Αυτό είναι σύνηθες στην περίπτωση των λιπιδικών μεμβρανών των βιοαισθητήρων όπου η ενσωμάτωση των μορίων των υποδοχέων στα λιπιδικά υμένα παρέχει τη χημική εκλεκτικότητα ενισχύοντας την ευαισθησία της μεθόδου. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκαν συγκριτικές μελέτες παρεμπόδισης (δηλαδή χοληστερόλη και παρεμποδιστές μαζί στο διάλυμα) και περιελάβαμε στη μελέτη τις πιο συχνά εμφανιζόμενες ενώσεις σε ένα ευρύ φάσμα πραγματικών δειγμάτων, όπως εμπορικών φαρμακευτικών σκευασμάτων, τροφίμων, βιολογικών υγρών κ.α



Σχήμα 16: Διακύμανση της ηλεκτρεγερτικής δύναμης του βιοαισθητήρα της χοληστερόλης ανάλογα τις διαφορετικές τιμές του pH του διαλύματος σε συγκέντρωση χοληστερόλης $10^{-4}M$

Οι ενώσεις που εξετάστηκαν ως παρεμποδιστές ήταν: μαλτοδεξτρίνη (100+1), δεξτρόζη (100+1), φρουκτοφουρανόζη (100 + 1), ασκορβικό οξύ (100 + 1), λακτόζη (10 + 1), σορβιτόλη (10 + 1), μανιτόλη (10 + 1), γλυκόζη (10 + 1), λευκίνη (10 + 1)

καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (1 + 1), γλυκίνη (10 + 1), φωσφορικό ασβέστιο (1 + 1), τρυγικό οξύ, κιτρικό οξύ, όξινο ανθρακικό άλας, ιόντα βενζοϊκού οξέος (10 + 1), πυριτικό ασβέστιο (10 + 1), καφεΐνη (10 + 1), ουρία (100 + 1), ουρικό οξύ (1 + 1), κρεατινίνη (1 + 1) και ασπαρτάμη (10 + 1).

Κατά τις μελέτες μας δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές από την παρουσία αυτών των ενώσεων (δηλαδή το σχετικό σφάλμα σε όλες τις περιπτώσεις ήταν μικρότερο από 5%). Για την προσαρμογή του εν λόγω ηλεκτροχημικού αισθητήρα χοληστερόλης σε πραγματικά δείγματα ανθρωπίνων βιολογικών υγρών οφείλουν να διερευνηθούν οι επιδράσεις των πρωτεϊνών και να εξαλειφθούν τυχόν παρεμβολές. Γι' αυτό τον λόγο διεξήχθησαν πειράματα ελέγχου χρησιμοποιώντας ένα ρυθμιστικό διάλυμα αλβουμίνης βόειου ορού συγκέντρωσης παρόμοιας με εκείνη των ανθρώπινων βιολογικών υγρών (6-8% w/v σε ανθρώπινο ορό και 50-140 mg / 100 κ.εκ. στα ούρα). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν παρατηρείται παρεμπόδιση για συγκεντρώσεις λευκωματίνης έως 500 mg / 100 mL. Οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης στα ούρα είναι μεταξύ 100 και 200 mg / L ούρων που αντιστοιχεί σε περίπου 40-150 mg/ημερησίως. Η πιο κοινή πρωτεΐνη στα ούρα είναι η λευκωματίνη (δηλαδή, η συγκέντρωση της λευκωματίνης στα ούρα είναι μεταξύ 25 και 55 mg/L (ανάλογα με την ηλικία και το φύλο). Η επίδραση των πρωτεϊνών ερευνήθηκε επίσης σε πραγματικά δείγματα ούρων στα οποία εγχύθηκε χοληστερόλη και δε παρατηρήθηκε παρεμπόδιση για συγκεντρώσεις λευκωματίνης έως 5,0 g.L⁻¹, ενώ για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν μεταβολές σήματος. Ως εκ τούτου, αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο εν λόγω αισθητήρας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ταχεία ανίχνευση της χοληστερόλης στον ανθρώπινο ορό και ούρα.

Τα λιπίδια στα ανθρώπινα βιολογικά υγρά μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα μόρια λιπιδίων του λιπιδικού υμενίου του ηλεκτροδίου και σε αυτή την κατεύθυνση πραγματοποιήθηκαν ηλεκτροχημικά πειράματα που έδειξαν ότι όταν ο μολυσμένος με λιπίδια ορός, αίμα ή ούρα εγχύθηκε εντός του διαλύματος ηλεκτρολύτη δεν επήλθε καμιά αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης. Απ' ότι φαίνεται, τα λιπίδια δεν είναι πιθανώς σε θέση να συντηχθούν με την BLM λόγω της προστατευτικής δράσης που ασκείται από τις πρωτεΐνες, δεδομένου ότι τα εν λόγω δύο συστατικά είναι γνωστό ότι σχηματίζουν λιποπρωτεΐνες, με τις πρωτεΐνες να εξέχουν στην υδατική φάση [*Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1995].

4.4.5 Εφαρμογή στο δείγμα ορού

Για να εκτιμηθεί η ικανότητα του βιοαισθητήρα στην καθημερινή ανάλυση ρουτίνας, δοκιμάστηκε αρχικά στον προσδιορισμό της χοληστερόλης σε δείγματα ορού του αίματος χωρίς καμιά προεπεξεργασία εκτός από την αραίωση των δειγμάτων. Όπως φαίνεται στον **πίνακα 5** τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά και παρόμοια με τα αποτελέσματα των βιοχημικών αναλυτών του νοσοκομείου. Τα αναλυτικά ποσοστά ανάκτησης του διαλύματος χοληστερόλης που προστέθηκε στα δείγματα του ορού αίματος ήταν 97-103%. Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την αξιοπιστία του βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης σε πραγματικά δείγματα.

Πίνακας 5 : Μέτρηση επιπέδων χοληστερόλης σε πραγματικά δείγματα ορού αίματος
(α) Μέση τιμή πέντε μετρήσεων

	Ορός αίματος			Χοληστερόλη		
	Γνωστές τιμές (mg/dL)	Υπολογιζόμενες τιμές (mg/dL)	RSD (mg/dL)	Προστιθέμενη(mg/dL)	Μετρούμενη (α) (mg/dL)	Ανάκτηση %
1	116	119	4.2	77.0	75.1	97.5
2	155	153	3.3	77.0	78.5	102
3	174	176	5.1	77.0	79.3	103

4.5 Επιμέρους Συμπεράσματα

Σε αυτούς τους πειραματικούς κύκλους παρουσιάστηκε μια απλή διαδικασία κατασκευής ενός εξαιρετικά ευαίσθητου βιοαισθητήρα χοληστερόλης βασισμένου στα νανοτοιχεία ZnO τα οποία παρέχουν το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την φόρτιση του ενζύμου και μια εύκολη διαδικασία ακινητοποίησής του. Ο αισθητήρας της οξειδάσης της χοληστερόλης διατήρησε την ενζυματική του δραστηριότητα λόγω του περιβάλλοντος του λιπιδικού υμενίου το οποίο αυξάνει συγχρόνως την βιοσυμβατότητα του βιοαισθητήρα. Επιπλέον, η ποτενσιομετρική ευαισθησία αυξήθηκε από τα 32 mV/decade στα 57mV/decade περίπου. Δεδομένου ότι ο αισθητήρας έχει χαμηλό κόστος και αξιόλογη επαναληψιμότητα μπορεί να βρει εφαρμογή στην καθημερινή κλινική πρακτική. Επιπλέον, η συναρμολόγηση του αισθητήρα σε φορητές συσκευές μπορεί να το καταστήσει κατάλληλο για χρήση από ανειδίκευτο προσωπικό.

Η ηλεκτροστατική λειτουργικοποίηση της οξειδάσης της χοληστερόλης επί των νανοτοιχείων ZnO παρέχει ουσιαστικά πλεονεκτήματα λόγω της μεγάλης επιφάνειάς τους και της ευκολίας στην επικοινωνία ηλεκτρικής σήμανσης παρέχοντας έναν αναπαραγώγιμο, ευαίσθητο και εκλεκτικό βιοαισθητήρα. Επιπλέον, η χρησιμότητα του αισθητήρα φαίνεται από την μεγάλη δυναμική λογαριθμική κλίμακα ανίχνευσης (από $1 \times 10^{-6} \text{M}$ έως $1 \times 10^{-3} \text{M}$) για τις συγκεντρώσεις διαλύματος χοληστερόλης με μια κλίση της καμπύλης ευαισθησίας 57mV/decade περίπου. Το όριο ανίχνευσης του βιοαισθητήρα είναι περίπου 4×10^{-7} το οποίο είναι παρόμοιο ή και χαμηλότερο από άλλες προαναφερθείσες -στην βιβλιογραφία- συσκευές αισθητήρων χοληστερόλης [M. K. Ram, P. Bertoncello, 2001; G. Li, J. M. Liao 2005; A. Kumar Basu, P. Chattopadhyay, 2007], ενώ με τον εν λόγω βιοαισθητήρα έχει επιτευχθεί ένας χρόνος απόκρισης περί τα 5 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου.

Ως εκ τούτου, η βελτίωση της ευαισθησίας σε συνδυασμό με την βελτίωση της εκλεκτικότητας –όπως αυτή προσφέρεται από την λιπιδική μεμβράνη- επιτρέπει τον ακριβή και εκλεκτικό προσδιορισμό της χοληστερόλης στα ανθρώπινα βιολογικά υγρά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΥ
ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΟΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ
ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΥ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ
ΝΑΝΟΣΥΡΜΑΤΩΝ ZnO ΚΑΙ
ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ
ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΗ FIA**

5.1 Εισαγωγή

Το ουρικό οξύ αποτελεί προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον ανθρώπινο οργανισμό και σχετίζεται με πολλές κλινικές διαταραχές [I.D.P. Wootton, H. Freeman, 2001]. Η φυσιολογική συγκέντρωση του ουρικού οξέος στους άνδρες είναι 370 $\mu\text{mol/L}$, ενώ στις γυναίκες είναι 260 $\mu\text{mol/L}$. Οι διακυμάνσεις στις τιμές του ουρικού οξέος στον ορό έχουν συσχετιστεί με την σκλήρυνση κατά πλάκας. Ειδικότερα, οι ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα ουρικού οξέος (περί τα 194 $\mu\text{mol/L}$) τα οποία μπορεί να φτάσουν τα 160 $\mu\text{mol/L}$, κατά μέσο όρο, σε περιόδους υποτροπής, ενώ μπορεί να κυμανθούν στα 230 $\mu\text{mol/L}$ σε περιόδους ύφεσης της νόσου για τους άνδρες [G. Toncevic, B. Milicic, S., 2002]. Στο πλάσμα του αίματος, η τιμή αναφοράς του ουρικού οξέος κυμαίνεται μεταξύ 214-494 $\mu\text{mol/L}$ για τους άνδρες και 137-393 $\mu\text{mol/L}$ για τις γυναίκες [Zheng, S. Wu, X. Lin 2001; E. El Bouhouti, I. Narajo-Rodriguez, 2009].

Οι συγκεντρώσεις ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος πάνω ή κάτω από το κανονικό εύρος τιμών είναι γνωστές, αντίστοιχα, ως υπερουριχαιμία και υποουριχαιμία. Οι μη φυσιολογικές τιμές του ουρικού οξέος δεν αποτελούν από μόνες τους μια παθολογική κατάσταση αλλά συνδέονται με έναν μεγάλο αριθμό νοσημάτων. Είναι επομένως σημαντικό να προσδιορίζεται η ακριβής συγκέντρωση του ουρικού οξέος έτσι ώστε να διαγιγνώσκονται εγκαίρως οι ασθένειες που σχετίζονται με τις διαταραχές της βιοσύνθεσης και του καταβολισμού των πουρινών, όπως η ουρική αρθρίτιδα, η υπερουριχαιμία και το σύνδρομο Lesh-Nyhan. Ειδικότερα, η συσσώρευση του ουρικού οξέος στο αίμα μπορεί να οδηγήσει σε έναν τύπο αρθρίτιδας, γνωστής ως ουρικής αρθρίτιδας [M. Heinig, R.J. Johnson, 2006] ενώ το σύνδρομο Lesh-Nyhan, μια εξαιρετικά σπάνια κληρονομική διαταραχή, συνδέεται επίσης με πολύ υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό [Y.C. Luo, J.S. Do, 2006]. Επιπλέον, αρκετές μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι υψηλότερες τιμές ουρικού οξέος στον ορό αποτελούν έναν ισχυρό παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα [M. Alderman, K.J.V, 2004]. Έτσι, ο έλεγχος του ουρικού οξέος στο αίμα και στα ούρα είναι απαραίτητος για την έγκαιρη διάγνωση μιας σειράς διαταραχών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των πουρινών. Τα τελευταία χρόνια, έχει εμφανιστεί στην βιβλιογραφία ένας αριθμός μελετών πάνω σε ειδικούς βιοαισθητήρες για το ουρικό οξύ -είτε με τη μέθοδο της αμπερομετρίας [C. Zhao, L.

Wan, 2009; M. Bhambi, G. Sumana, 2010; T. Hoshi, H. Saiki, 2003], είτε με βάση την ανίχνευση της κατανάλωσης του οξυγόνου [E. Akyilmaz, M.K. Sezgintürk, 2003; H. Suzuki, H. Arakawa, 2001; S. Vchiyama, H. Sakamoto 1997] καθώς και με τη χρήση ανιχνευτών χημειοφωταύγειας [Yao, A.G. Vlessidis, N.P. Evmiridis, 2003; H. C Hong, H.J. Huang 2003]. Το κύριο πρόβλημα των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων είναι ότι το ηλεκτρόδιο πρέπει να λειτουργεί σε περίπου 0,7 V [G.W.J. Harwood, C.W. Routon, 1996] τάσης, επιτρέποντας, έτσι, και σε άλλα βιολογικά μόρια να αντιδρούν με το ηλεκτρόδιο [G. Cui, J.H. Yoo, 2001]. Από την άποψη αυτή, η ποτενσιομετρική ανίχνευση μπορεί να παρουσιάσει πλεονεκτήματα σε ορισμένες περιπτώσεις.

Οι πρόσφατες εξελίξεις στους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες, οι οποίοι βασίζονται σε μια ευρεία ποικιλία νανοδομών όπως τα νανოსύρματα ZnO, οι νανოსωλήνες και τα μη πορώδη υλικά, έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των αξιοσημείωτων ιδιοτήτων τους, όπως η μη τοξικότητα, η βιοασφάλεια, η εξαιρετική βιολογική συμβατότητα, οι υψηλοί ρυθμοί μεταφοράς ηλεκτρονίων, η ενισχυμένη απόδοση, η αυξημένη ευαισθησία, η ευκολία κατασκευής και το χαμηλό κόστος [B.M. Dixon, J.P. Lowry, 2002; U. Harborn, B. Xie, R, 1997; C. Jianrong, 2004; D.H. Wang, R. Kou, 2005; M.K. Ram, M. Adami, 2000].

Τα νανوسύρματα αποτελούν δομές της κλίμακας του νανόμετρου φτιαγμένα από μεταλλικά άτομα, σιλικόνη ή άλλα υλικά που διοχετεύουν ηλεκτρικό. Τα νανوسύρματα κατασκευάζονται άτομο προς άτομο πάνω σε μια στερεή επιφάνεια, συχνά μέρος μιας συσκευής μικρορευστών. Μπορεί να έχουν επένδυση από μόρια, όπως τα αντισώματα, που θα συνδέουν προτεΐνες και άλλες ουσίες που ενδιαφέρουν τους ερευνητές και τους κλινικούς ιατρούς. Από την ίδια τη φύση του μεγέθους τους, της νανοκλίμακας δηλαδή, τα νανوسύρματα είναι απίστευτα ευαίσθητα σε τέτοιους συνδέσμους και ανταποκρίνονται μεταλλάσσοντας το ηλεκτρικό ρεύμα που ρέει μέσω αυτών και έτσι μπορούν να σχηματίσουν τη βάση υπερευαίσθητων μοριακών ανιχνευτών.

Οι νανοςωλήνες σχηματίζουν σωλήνα εσωτερικής διαμέτρου 1nm και μανδύα από αλληπάλληλα στρώματα εξαγωνικών δικτύων άνθρακα. Οι ιδιότητες τους μηχανικές και ηλεκτρικές είναι σπουδαίες και οφείλονται στη σωληνοειδή τους δομή. Αυτές είναι μεγάλη αντοχή, χαμηλό βάρος, σταθερότητα, ευκαμψία, καλή θερμική αγωγιμότητα, το μεγάλο εμβαδόν επιφανείας και πολλές άλλες ηλεκτρικές ιδιότητες.

Ειδικότερα, τα νανοϋλικά από ZnO έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον όχι μόνο στον τομέα της έρευνας αιχμής, αλλά και στον τομέα της εφαρμοσμένης τεχνολογίας,

λόγω των μοναδικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, όπως η υψηλή ευαισθησία και οι ιδιαίτερες μηχανικές, θερμικές και ηλεκτρικές τους ιδιότητες. Η ανάπτυξη των βιοαισθητήρων μπορεί να αποτελέσει δυνητικά μια ενδιαφέρουσα εφαρμογή για τα νανοσύρματα από ZnO καθώς αξιοποιείται το μεγάλο εμβαδόν τους ως κυρίαρχη παράμετρος. Επιπλέον, η λεπτή δομή τους σε συνδυασμό με την εξαιρετική ικανότητά τους για ταχεία μετάδοση του σήματος τα καθιστά κατάλληλα για τέτοιες πρακτικές εφαρμογές. Μεταξύ των ποικίλων διαδικασιών ανάλυσης για την ανίχνευση ουσιών και βιολογικών μορίων σε φυσιολογικά υγρά, η ενζυματική ηλεκτροχημική μέθοδος των βιοαισθητήρων αποτελεί σημαντική εναλλακτική λύση για την μη ενζυματική βιοαισθητικότητα, η οποία απαιτεί εξειδικευμένο ανθρώπινο δυναμικό, δαπανηρά χημικά αντιδραστήρια και μεγαλύτερη διάρκεια ανάλυσης. Η παρασκευή των ενζυματικών βιοαισθητήρων θα μπορούσε να επιτευχθεί με την ακινητοποίηση των διαφόρων ενζύμων στα βιοσυμβατά καλούπια (ή βιοσυμβατές μήτρες) ανάλογα με τα μόρια προς ανάλυση. Η δέσμευση της επιφάνειας της μήτρας από τα βιομόρια εξασφαλίζει την σταθερή και ταχεία μετάδοση του σήματος καθώς και την γρήγορη ηλεκτροχημική αντίδραση μεταξύ των βιομορίων προς ανάλυση (και της μήτρας).

Ειδικότερα το ένζυμο της ουρικής παρουσιάζει μια καλή ηλεκτροστατική αντίδραση με τα νανοσύρματα ZnO, με θερμική σταθερότητα και υψηλή ευαισθησία ή εκλεκτικότητα για το ουρικό οξύ [E. Topoglidis, E. Palomares, 2005]. Τα νανοσύρματα ZnO εμφανίζουν καλύτερη απόδοση από τις λεπτές ταινίες από ZnO (ZnO thin films) όσον αφορά στον λόγο μεταξύ σήματος και θορύβου (signal to noise ratio) [J.X. Wang, X.W. Sun, 2006]. Γενικότερα, τα νανοσύρματα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία και διαθέτουν μικρότερο χρόνο απόκρισης σε σύγκριση με τις λεπτές ταινίες ZnO [B.M. Dixon, U. Harborn, 1997; 2002; C. Jianrong, 2004; D.H. Wang, 2005; M.K. Ram, 2000; E. Topoglidis, 2005; J.X. Wang, 2006; F., Zhang, 2004; J Liu, 2008; S. Caras, 1980; A. Noy, 2009; U. Yogeswaran 2008].

Τελευταία, έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στον τομέα των συσκευών που βασίζονται σε μεμβράνες λιπιδίων και ένα από τα σημαντικότερα προτερήματα που παρουσιάζουν είναι ότι διατηρούν τη σταθερότητά τους κατά την αποθήκευσή τους στον αέρα [D.P. Nikolelis, M. Mitrokosta, 2002]. Η λιπιδική μεμβράνη σχηματίζεται πάνω σε ένα μικροπορώδες υλικό όπως οι μικροϊνες υάλου ενθυλακωμένη σε πολυμερές υλικό. Το μεθακρυλικό οξύ λειτουργεί ως το λειτουργικό μονομερές για τον πολυμερισμό, η διμεθακρυλική αιθυλενο-γλυκόλη λειτουργεί ως σταυροσυνδέτης

(crosslinker), ενώ το 2,2-αζωδισ-2-μεθυλοπροπιονιτρίλιο (AIBN) λειτουργεί ως εκκινητής. Οι πολυμερισμένες μεμβράνες λιπιδίων μπορούν να αποθηκευθούν στον αέρα για περισσότερο από ένα μήνα, παραμένοντας ενεργές σε διάφορες αναλυόμενες ουσίες [D.P. Nikolelis, D.A. Drivelos, 2004; D.P. Nikolelis, G. Theoharis, 2003; D.P. Nikolelis, M.G. Simantiraki, 2005]. Ωστόσο, σε αυτές τις πρόσφατες μελέτες, τα πρωτεϊνικά μόρια είχαν ενσωματωθεί στις λιπιδικές μεμβράνες μετά τον πολυμερισμό. Σε δύο εργασίες, η διαδικασία πολυμερισμού πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ακτινοβολία UV αντί για θέρμανση στους 60 °C [D.P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2006; D.P. Nikolelis, G. Raftopoulou 2008]. Με αυτόν τον τρόπο διατηρήθηκε η δράση της ακετυλοχολινεστεράσης, αφού η θέρμανση θα την είχε απενεργοποιήσει. Τα αποτελέσματα των μελετών Raman έχουν δείξει ότι ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται εντός 4 ωρών.

Στα πλαίσια των ανωτέρω αναπτύχθηκε και δοκιμάστηκε με επιτυχία ένας απλά κατασκευασμένος και ευαίσθητος ποτενσιομετρικός αισθητήρας ουρικού οξέος με βάση τα νανοσύρματα ZnO, εφαρμοσμένος σε ένα εύκαμπτο πλαστικό ηλεκτρόδιο επικαλυμμένο με χρυσό, για την ακινητοποίηση του ενζύμου της ουρικής πρίν από τον πολυμερισμό της μεμβράνης λιπιδίων. Κατά τη μελέτη, ερευνήθηκε η απόδοση αυτού του αισθητήρα ουρικής/ΖnO σε ρυθμιστικά διαλύματα και έδειξε καλές δυνατότητες όσον αφορά στην εκλεκτικότητα την γρήγορη απόκριση, την αναπαραγωγικότητα, την θερμική σταθερότητα και τις αμελητέες παρεμποδίσεις. Μια επιπλέον καινοτομία της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι ότι η χρήση μιας λιπιδικής μεμβράνης που περιέχει ένα θετικά φορτισμένο λιπίδιο αυξάνει την συγκέντρωση του ουρικού οξέος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου παρέχοντας έτσι σχεδόν διπλάσια ευαισθησία. Τέλος, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, παρέχονται στοιχεία σχετικά με το πως μπορεί να αυξηθεί η κλίση (slope) ενός ηλεκτροδίου με έναν τέτοιο συνδυασμό δύο λιπιδίων. Επιπλέον, η χρήση της λιπιδικής μεμβράνης διατηρεί τη δραστηριότητα του ενζύμου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Τέλος, ο βιοαισθητήρας δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα ανάλυσης έγχυσης ροής (FIA) –είτε συνεχούς ή διακοπτόμενης ροής- μεταξύ των εγχύσεων.

5.2 Αντιδραστήρια

Η προμήθεια των αντιδραστηρίων όπως η ουρικάση (E.C. 1.7.3.3) 25 μον/1.5mg από *Athrobacter gloiformis*, Ουρικό οξύ (99.8% καθαρότητας), β-d-γλυκόζη (99,5%), ένυδρος νιτρικός ψευδάργυρος και εξαμεθυλενοτετραμίνη έγινε από την Sigma Aldrich. Η δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίστηκε σύμφωνα με τις προδιαγραφές της προμηθεύτριας εταιρίας. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10mM φωσφορικών (PBS) και παρασκευάστηκε από Na_2HPO_4 και KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich) σε διάλυμα 0,1mM χλωριούχου νατρίου σε pH 7.4. Παράλληλα, παρασκευάστηκε μια ικανή ποσότητα διαλύματος ουρικού οξέος σε PBS και διατηρήθηκε στους 4 °C. Τα πιο αραιωμένα πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονταν κάθε φορά πριν τη χρήση. Όλες οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν (Sigma-Aldrich) ήταν της κατηγορίας των αναλυτικών καθαρών αντιδραστηρίων. Η διπαλμιτοϋλική φωσφατιδυλοχολίνη (C16:0) (DPPC) και το κατιονικό επιφανειοδραστικό βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο (CTAB) παρασχέθηκαν από την Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) και χρησιμοποιήθηκαν για τον σχηματισμό των μεμβρανών λιπιδίων. Επιπλέον, η προμήθεια του μεθακρυλικού οξέος και της διμεθακρυλικής αιθυλενογλυκόλης έγινε από την Aldrich (Aldrich-Chemie, Steinheim, Germany). Ο εκκινητής 2,2-αζωδις-2-μεθυλοπροπιονιτρίλιο (AIBN) παρασχέθηκε από την Merck KgaA (Darmstadt, Germany). Το νερό καθαρίστηκε μέσω ενός συστήματος φιλτραρίσματος / διήθησης Mill-Q (Milli-Q, Millipore, El Paso, TX, USA) με ελάχιστη αντίσταση στα 18 MΩ cm. Τα φίλτρα και το μέγεθος των πόρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από μικροΐνες υάλου (0.7 and 1.0 μm, Whatmam Scientific Ltd., Kent, UK).

5.3 Οργανολογία

Τα ηλεκτρόδια του αισθητήρα κατασκευάστηκαν σύμφωνα με την προαναφερθείσα διαδικασία στην βιβλιογραφία [*S.M. Usman Ali, N.H. Alvi, 2011*]. Το εύκαμπτο πλαστικό υπόστρωμα τοποθετήθηκε σε ένα επίπεδο στήριγμα εντός ενός θαλάμου σε κενό αέρος, συσκευής εξάτμισης (Evaporator Satis CR725). Σε πρώτο στάδιο, η επιφάνεια του πλαστικού υποστρώματος επιστρώθηκε με ένα λεπτό φιλμ τιτανίου πάχους 10nm, ενώ σε δεύτερο στάδιο επιστρώθηκε με ένα φιλμ χρυσού πάχους 50nm. Δημιουργήθηκε ένα πλαστικό ηλεκτρόδιο μήκους 4 cm και πλάτους 1 mm επικαλυμμένο με χρυσό και εκπλύθηκε αρχικά με ακετόνη και στη συνέχεια με απιονισμένο ύδωρ και αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Για να κατασκευαστούν τα νανοσύρματα ZnO πάνω σε ηλεκτρόδια χρυσού χρησιμοποιήθηκε ειδική χημική διαδικασία [*M. Vafae, 2007*]. Συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόδια εμβαπτίστηκαν δυό φορές σε διάλυμα οξικού ψευδαργύρου για 2 λεπτά και αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα. Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόδια τοποθετήθηκαν σε υδατικό διάλυμα 0,025M εξαένυδρου νιτρικού ψευδάργυρου [$(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$] και 0,025 M εξαμεθυλενοτετραμίνης [$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$] και διατηρήθηκαν εντός κλιβάνου στους 90 °C για 2-4 ώρες. Τέλος, τα νανοσύρματα εκπλύθηκαν με απιονισμένο ύδωρ και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Από την διαδικασία αυτή προέκυψαν νανοσύρματα ZnO διαμέτρου 80-150 nm, ομοιόμορφης πυκνότητας και κατανομής στον χώρο, με κάθετη διεύθυνση σε σχέση με την επιφάνεια της ταινίας (strip). Τα μορφολογικά και δομικά χαρακτηριστικά των νανοσυρμάτων μπορούν να διαφοροποιηθούν ρυθμίζοντας τις παραμέτρους της προαναφερθείσας διαδικασίας παρασκευής τους όπως την συγκέντρωση, την θερμοκρασία και το pH των διαλυμάτων καθώς και την στοιχειομετρία των αντιδραστηρίων [*H. Zhang, D. Yang, 2005*]. Τα βασικά αυτά ηλεκτρόδια αισθητήρες κατασκευάστηκαν στο πανεπιστήμιο Linköping της Σουηδίας.

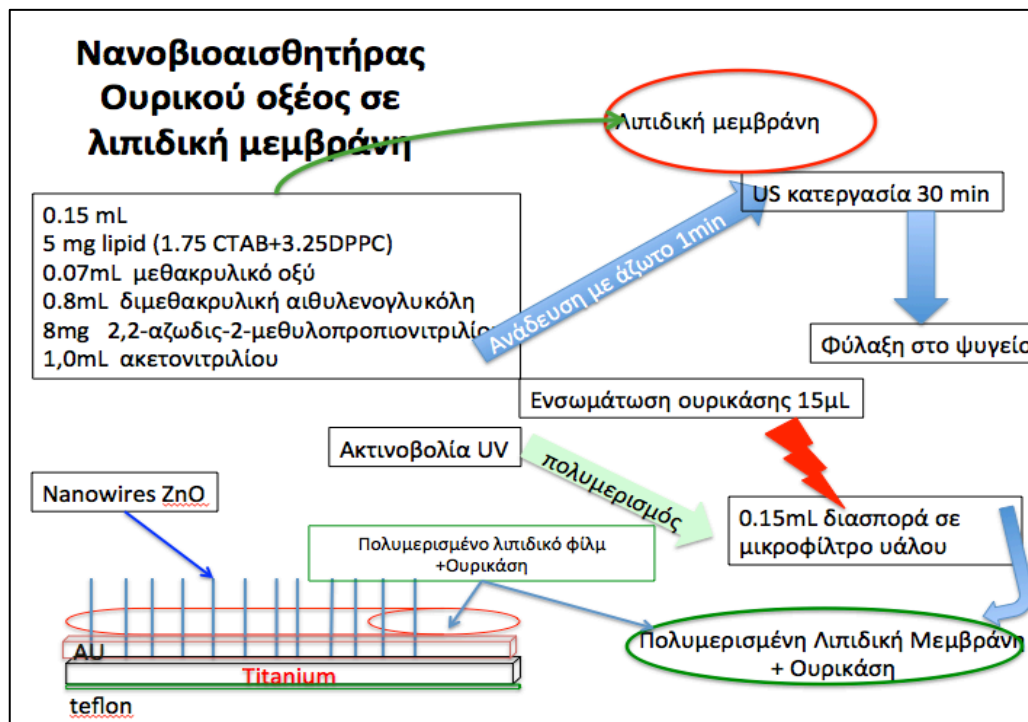
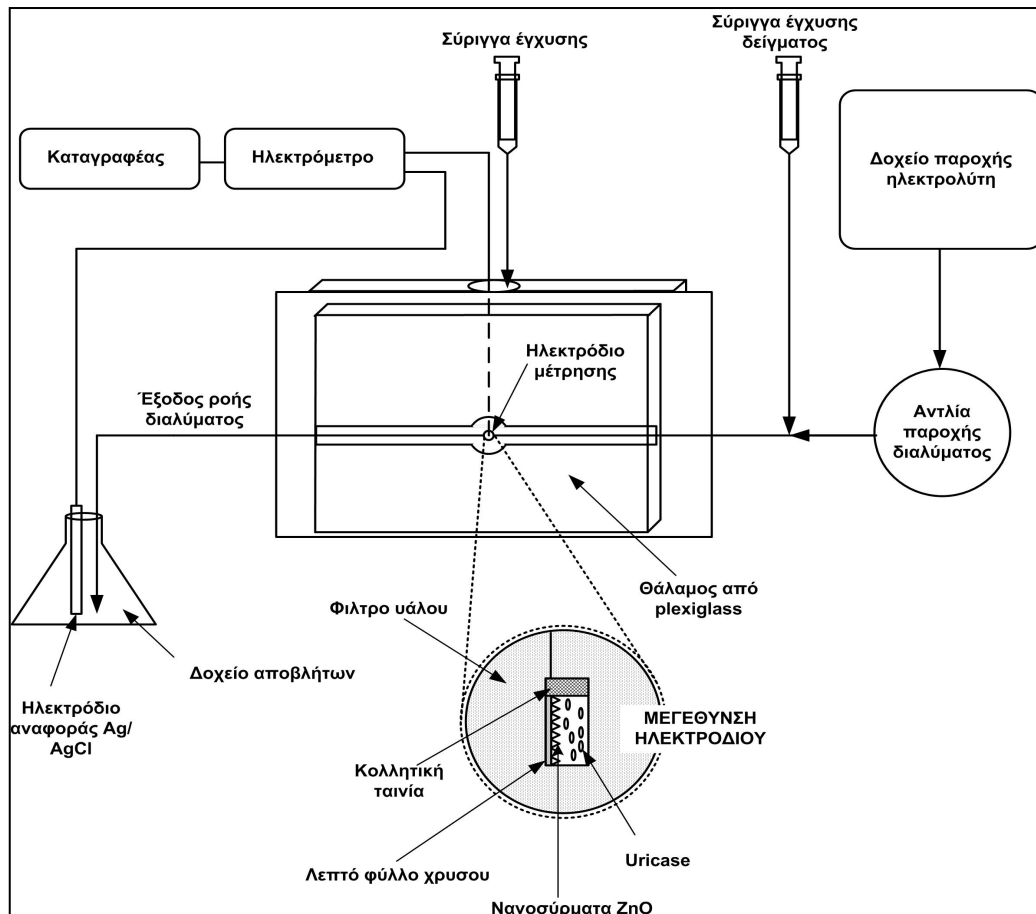
Οι μεμβράνες λιπιδίων κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο του πολυμερισμού με παρόμοια διαδικασία με αυτήν που προαναφέρθηκε [*D.P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2006; D.P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2008*]. Εν συντομία, διάλυμα 0,15mL που περιείχε 5mg λιπιδίων σε μορφή κονιάματος με σύσταση 35 (w/w) CTAB και 65 (w/w) DPPC (1,75mg CTAB και 3,25mg DPPC), αναμείχθηκε με 0,070mL μεθακρυλικού οξέος, 0,8mL διμεθακρυλικής αιθυλενογλυκόλης, 8mg 2,2-αζωδισ-2-

μεθυλοπροπιονιτριλίου και 1,0mL ακετονιτριλίου. Στη συνέχεια, ακολούθησε ανάδευση του μίγματος με άζωτο για ένα λεπτό, κατεργασία του με υπερήχους για 30 λεπτά και εναποθήκευσή του σε ψυγείο. Για την παρασκευή των σταθεροποιημένων λιπιδικών μεμβρανών, 0,15mL από αυτό το μίγμα εναποτέθηκε επί ενός μικροφίλτρου και στη συνέχεια ακτινοβολήθηκε με λαμπτήρα UV δευτερίου. Η όλη διαδικασία του πολυμερισμού παρακολούθηθηκε με την χρήση φασματομετρίας Raman [*D.P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2006; D.P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2008*].

Η ουρική αση ενσωματώθηκε σε αυτές τις λιπιδικές μεμβράνες πριν τον πολυμερισμό τους με εναπόθεση 15μL του εναιωρήματος του ενζύμου με το μίγμα του πολυμερισμού (δηλαδή, για την παρασκευή των σταθεροποιημένων μεμβρανών λιπιδίων εναποτέθηκαν 0,15mL του μίγματος του πολυμερισμού και 15μL του εναιωρήματος ενζύμου στο μικροφίλτρο).

Η οριστική κατασκευή του ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα ουρικής αση ολοκληρώθηκε με την ενθυλάκωση του πολυμερισμένου φιλμ λιπιδίων σε σύρμα χαλκού που περιείχε τα προαναφερθέντα νανοσύρματα ZnO.

Το σύστημα FIA που χρησιμοποιήθηκε ήταν παρόμοιο με αυτό που περιγράφηκε προηγουμένως, λεπτομερώς [*D.P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2006; C.G. Siontorou, D. P. Nikolelis, 2000; D. P. Nikolelis, T. Hianik, 2010*]. Αυτός ο μικροπορώδης δίσκος μικοϊνών υάλου σταθεροποιήθηκε μεταξύ δύο θαλάμων από Plexiglass που διαχώριζαν δύο διαφορετικά διαλύματα ηλεκτρολυτών. Ένας από τους θαλάμους είχε κυκλικό σχήμα και συνδεόταν με μικρό πλαστικό σωλήνα για τη ροή του διαλύματος. Για τη ροή του διαλύματος των ηλεκτρολυτών χρησιμοποιήθηκε μια περισταλτική αντλία Minipuls (Gilson, Inc, Middleton, WI, USA). Ο άλλος θάλαμος είχε κυλινδρικό σχήμα με τον διαμήκη άξονά του κάθετο προς τη ροή του διαλύματος. Ο σχεδιασμός των θαλάμων και η διάταξη του πειράματος έχει ήδη περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία [*D.P. Nikolelis, G. Raftopoulou, 2006; C.G. Siontorou, D. P. Nikolelis, 2000; D. P. Nikolelis, T. Hianik, 2010*]. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl εμβυθίστηκε στα απόβλητα του διαλύματος ηλεκτρολυτών, ενώ το ηλεκτρόδιο ZnO τοποθετήθηκε στον κυλινδρικό θάλαμο (**σχήμα 17α**). Στο **σχήμα 17β** φαίνεται διαγραμματικά η διαδικασία κατασκευής του νανοβιοαισθητήρα ουρικού οξέος σε λιπιδική μεμβράνη.



Σχήμα 17: α) Σχηματική διάταξη της λειτουργίας του ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα ουρικού οξέως β) Σχηματικό διάγραμμα της διαδικασίας κατασκευής του νανοβιοαισθητήρα ουρικού οξέος σε λιπιδική μεμβράνη

5.4 Έλεγχος του βιοαισθητήρα

Όλα τα ηλεκτρόδια, όταν δεν χρησιμοποιούνται, αποθηκεύονται σε ξηρά κατάσταση στους 4 °C. Μετά την ολοκλήρωση αυτών των βημάτων, και οι δύο τύποι αισθητήρων (με ή χωρίς λιπίδια) ελέγχθηκαν ποτενσιομετρικά σε διάλυμα ουρικού οξέος με ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl αποκτηθέν από την Metrohm. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ένας μετρητής pH (τύπος 744, Metrohm) για την μέτρηση της ποτενσιομετρικής τάσης των αισθητήρων, ενώ για τις μετρήσεις του χρόνου απόκρισης χρησιμοποιήθηκε ένας ποτενσιοστάτης - γαλβανόμετρο τύπου 363A (EG & G, USA). Τα πειράματα FIA πραγματοποιήθηκαν είτε σε λειτουργία συνεχούς ροής με την χρήση τριπλής βαλβίδας έγχυσης και σύριγγες διπλής έγχυσης ή σε λειτουργία μη συνεχούς ροής με την χρήση μιας σύριγγας και αλλάζοντας τον αναλυτή πριν από τις ενέσεις. Η τροποποίηση του παρόντος βιοαισθητήρα και όλες οι μετρήσεις (ακόμα και εκείνες χωρίς την λιπιδική μεμβράνη) πραγματοποιήθηκαν στην Αθήνα, Ελλάδα στο πλαίσιο της παρούσης Διατριβής.

5.4.1 Χρόνος απόκρισης

Ο μηχανισμός της ανίχνευσης της ουρίας με τον παρόντα βιοαισθητήρα βασίζεται στην ακόλουθη χημική αντίδραση η οποία καταλύεται από την ουρικάση:

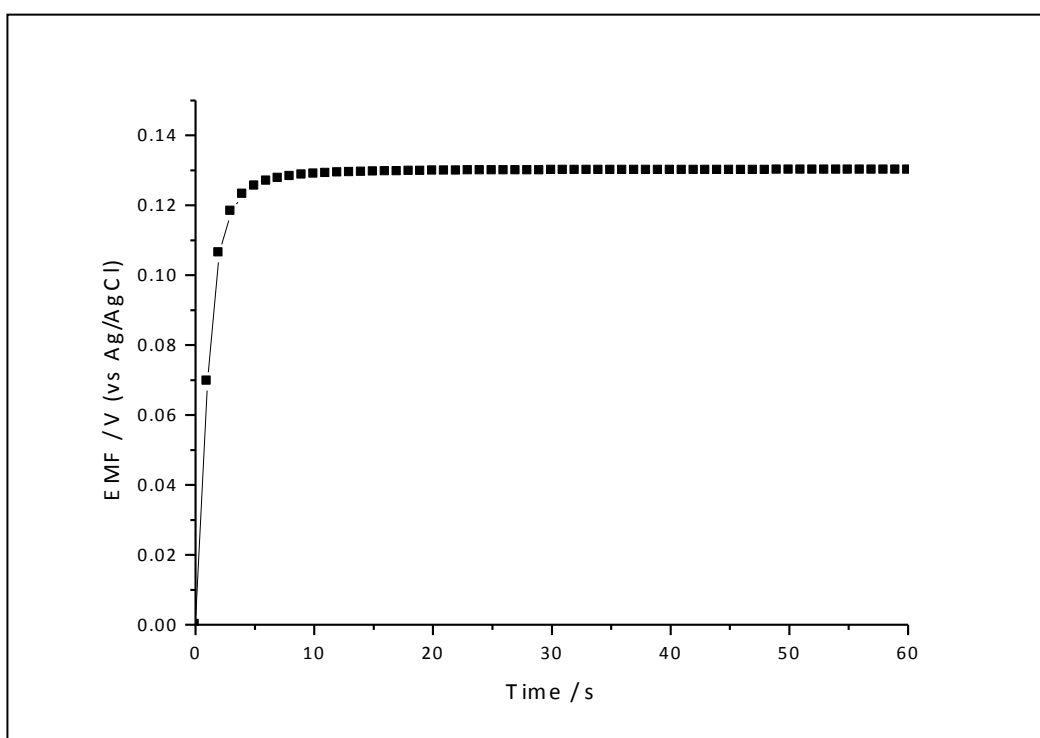


Όταν το ουρικό οξύ οξειδώνεται υπό την παρουσία της ουρικάσης προκύπτει αλλαντοΐνη μαζί με διοξείδιο του άνθρακα και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Λόγω της παρουσίας του νερού, η αλλαντοΐνη δέχεται ένα πρωτόνιο από το νερό και μετατρέπεται σε ιόν αλλαντοΐνης, το οποίο αλληλεπιδρά με τα νανοσύρματα ZnO και προκαλεί αλλαγή δυναμικού στο ηλεκτρόδιο της ουρικάσης. Καθώς αλλάζει η συγκέντρωση των ιόντων γύρω από τα νανοσύρματα ZnO, αλλάζει και το δυναμικό του ηλεκτροδίου [S.M Al-Hilli, R.T. Al-Mofarji, 2008]. Η ποτενσιομετρική απόκριση των ηλεκτροδίων του αισθητήρα μελετήθηκε σε διαλύματα ουρικού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα (PBS pH 7.4) με συγκέντρωση που κυμάνθηκε από 1μM έως 1000μM. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων παρατηρήθηκε ότι το παραγόμενο διοξείδιο του άνθρακα δεν επηρεάζει τη σταθερότητα των νανοσυρμάτων ZnO, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία ουσιαστική αλλαγή στο pH του ρυθμιστικού διαλύματος

(PBS). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ένας μικρός χρόνος απόκρισης σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων των διαλυμάτων με το 95% της σταθερής τάσης να επιτυγχάνεται εντός των 6 δευτερολέπτων όπως φαίνεται στο **σχήμα 18** με ευαισθησία 31 mV/decade περίπου για τα ηλεκτρόδια των αισθητήρων χωρίς λιπιδική μεμβράνη [$E=0.0307\log C+0.248$, $r^2=0.998$] και 61 mV/decade περίπου για τα ηλεκτρόδια των αισθητήρων με λιπιδική μεμβράνη [$E=0.0609\log C+0.425$, $r^2=0.987$].

Τα δυναμικά του αισθητήρα που μετρήθηκαν, εκφράστηκαν γραμμικά σε σχέση με τις λογαριθμικές συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος, όπως φαίνεται στο **σχήμα 19** (α και β). Οι χρόνοι απόκρισης σε αμφοτέρως τις περιπτώσεις ήταν περίπου ίδιοι (δηλαδή 6 δευτερόλεπτα), ωστόσο, η ακρίβεια στις μετρήσεις κατά τη χρήση του αισθητήρα με το φιλμ λιπιδίων φαίνεται να είναι μεγαλύτερη.

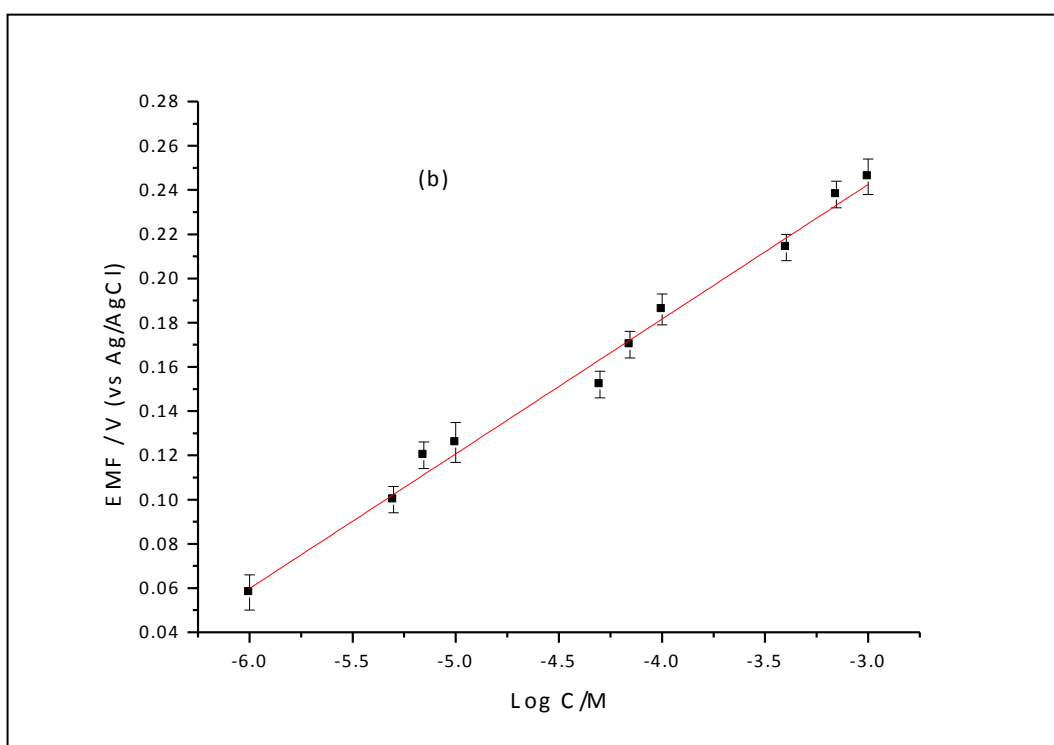
Η κλίση της συνάρτησης στην περίπτωση του βιοαισθητήρα με το φιλμ λιπιδίων ήταν δύο φορές μεγαλύτερη από εκείνη του βιοαισθητήρα χωρίς το φιλμ λιπιδίων, παρέχοντας έτσι ένα χαμηλότερο όριο ανίχνευσης -περί τα 0,4μM- ουρικού οξέος. Το ουρικό οξύ έχει τιμή pKa: 3.89, επομένως στις τιμές του pH που χρησιμοποιούνται βρίσκεται στην ανιονική του μορφή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια αυξημένη συγκέντρωση ανιόντων ουρικού οξέος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου το οποίο με τη σειρά του αυξάνει την κλίση (slope) της συνάρτησης του αισθητήρα.

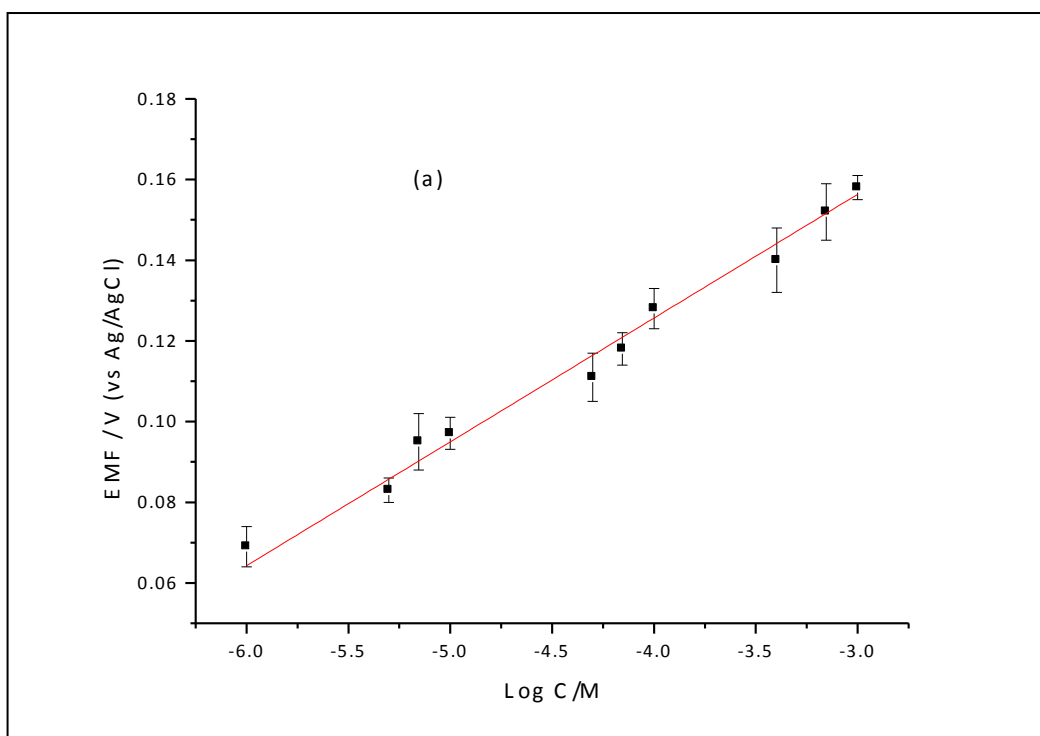


Σχήμα 18: Χρόνος απόκρισης του βιοαισθητήρα του ουρικού οξέος σε 100μM διαλύματος ουρικού οξέος σε pH 7.4

5.4.2 Αναπαραγωγιμότητα, γραμμικότητα και σταθερότητα του αισθητήρα

Η αναπαραγωγιμότητα του βιοαισθητήρα, που ελέγχθηκε με τη χρήση πέντε ($n=5$) διαφορετικών νανοσυρμάτων ZnO σε διάλυμα 100 μ M ουρικού οξέος, ήταν μικρότερη από 5%. Τα αποτελέσματα σε τρία πειράματα έδειξαν καλή σταθερότητα και γραμμικότητα σε διάλυμα PBS με pH 7,4. Το **σχήμα 20** εμφανίζει καμπύλες βαθμονόμησης από τρία διαφορετικά πειράματα χρησιμοποιώντας το ίδιο ηλεκτρόδιο του αισθητήρα και του ηλεκτροδίου αναφοράς Ag/AgCl. Τα αποτελέσματα δείχνουν την εξαιρετική σταθερότητα και γραμμικότητα σε διάλυμα PBS με pH 7,4. Το ηλεκτρόδιο του αισθητήρα εμβαπτιζόταν προσεκτικά σε PBS μετά από κάθε μέτρηση. Η επαναληπτικότητα ήταν μεταξύ 1 και 5%, όπως μπορεί να φανεί και στο σχήμα 20. Αυτό το ηλεκτρόδιο του αισθητήρα χρησιμοποιήθηκε περιοδικώς και αποθηκεύτηκε στους 4 °C για περισσότερο από τρεις εβδομάδες, διατηρώντας μέχρι και 90% της αρχικής δραστηριότητάς του με καλή απόκριση στο ουρικό οξύ. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σταθερότητα, γραμμικότητα και αναπαραγωγιμότητα είναι παρόμοιες με αυτές που έχουν ήδη αναφερθεί.



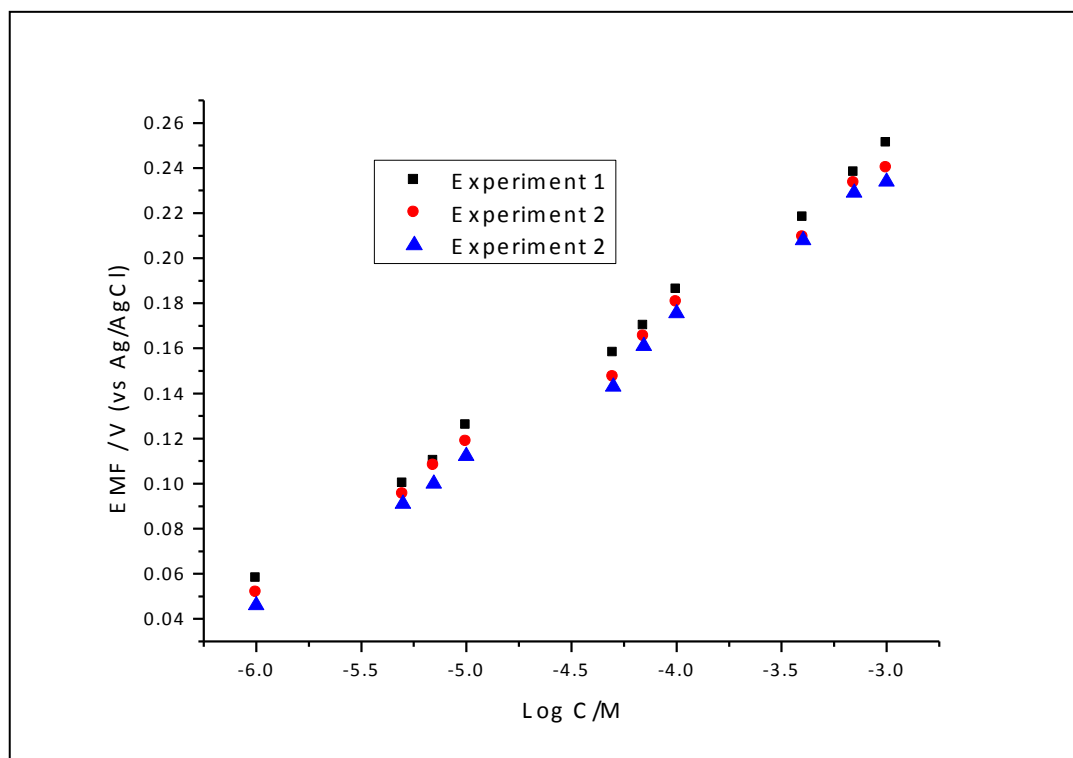


Σχήμα 19: Καμπύλες βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα του ουρικού οξέος (α) σε μεμβράνη (β) με ενσωματωμένο λιπίδιο (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος πέντε μετρήσεων) σε pH 7.4

5.4.3 Μελέτη της λειτουργίας του αισθητήρα στην επίδραση του pH, της θερμοκρασίας και παρεμποδιστών

Το pH του μέσου εργασίας επηρεάζει την δραστικότητα της ουρικής και του βαθμού απόκρισης του ηλεκτροδίου του αισθητήρα. Η σχέση του pH με τον βαθμό απόκρισης του αισθητήρα διερευνήθηκε σε 100μM διαλύματος ουρικού οξέος για ένα εύρος pH από 6 έως 9, όπως φαίνεται στο **σχήμα 21α**, με τα πειραματικά αποτελέσματα να δείχνουν ότι το βέλτιστο εύρος τιμών pH είναι μεταξύ 6,5 και 7,5. Ωστόσο, η γραμμικότητα είναι βέλτιστη σε τιμές pH 7,4. Παρόλο που οι βέλτιστες τιμές pH για την ουρική κυμαίνονταν από 8,5 με 9,2, [M. Bhambi, G. Sumana, 2010] το pH των περισσότερων φυσιολογικών υγρών είναι κάτω από αυτές τις τιμές. Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση της μεταβολής της θερμοκρασίας στην απόκριση του αισθητήρα μεταξύ 20 και 70 °C. Όπως φαίνεται στο **σχήμα 21β**, η απόκριση EMF αυξάνει σταδιακά με την αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ το ένζυμο παρουσίασε την βέλτιστη αντίδραση σε θερμοκρασία 35-40 °C. Πάνω από τους 40 °C, η απόκριση

μειώνεται, γεγονός που οφείλεται είτε στην φυσική θερμική αποδόμηση των ενζύμων ή στον περισσότερο χρόνο που χρειάζονται για να φτάσουν σε ισορροπία όταν η δραστηριότητα του ενζύμου μειώνεται, ή τέλος από τις μεταβολές της δομής της λιπιδικής μεμβράνης.



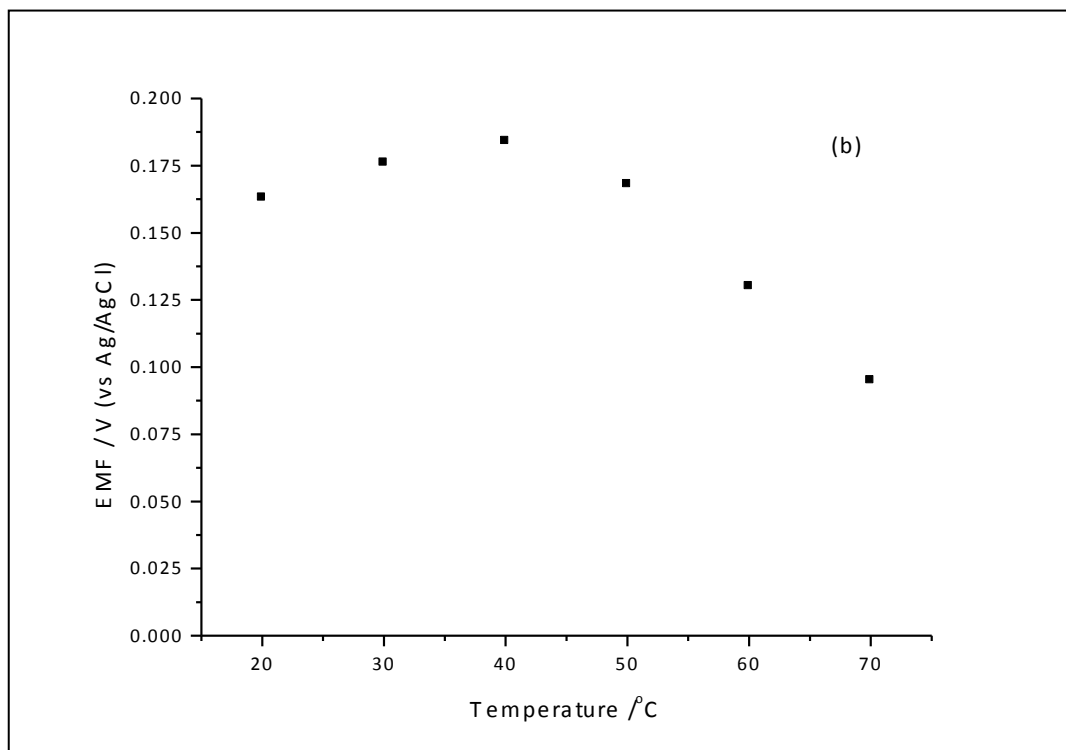
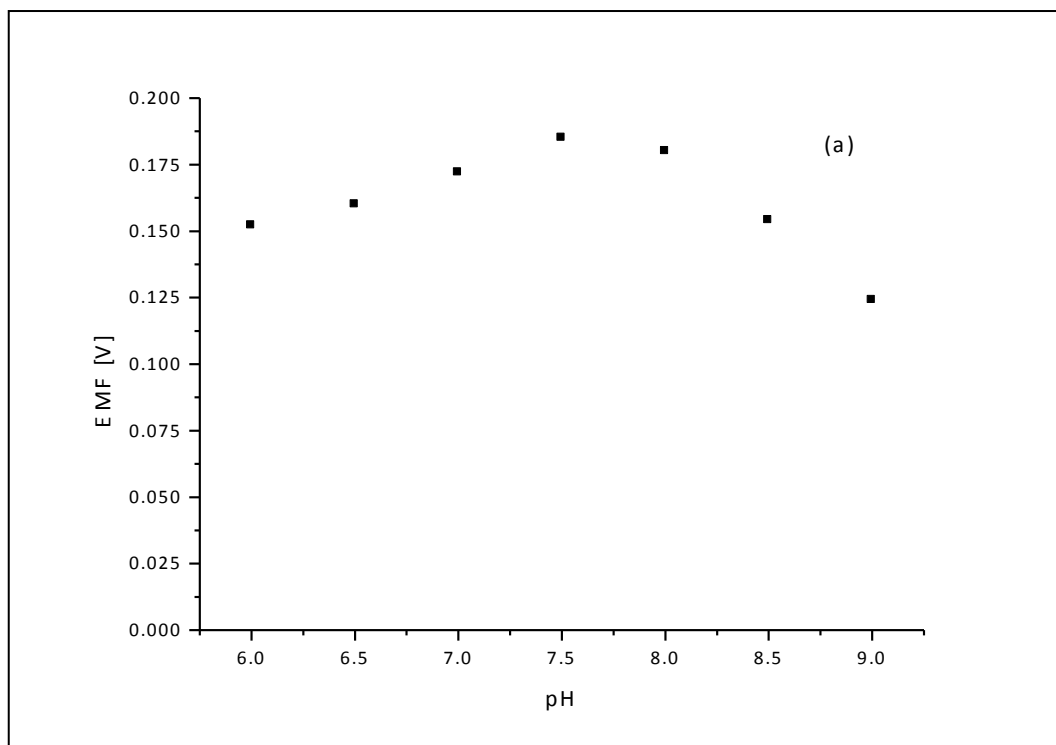
Σχήμα 20: Καμπύλες βαθμονόμησης από τρία διαφορετικά πειράματα με τη χρήση του ίδιου ηλεκτροδίου –αισθητήρα και χρήση Ag/AgCl ως ηλεκτροδίου αναφοράς (κάθε τιμή είναι το αποτέλεσμα πέντε διαφορετικών μετρήσεων) σε pH 7.4

Συγκεκριμένα, πάνω από τους 37 °C η δομή του φιλμ των λιπιδίων μεταβάλλεται από κρυσταλλική σε μορφή γέλης (πηκτώματος) [R. Bartucci, N. Gulfo, 1990]. Παρά το γεγονός ότι ο βιοαισθητήρας εμφανίζει τη μέγιστη απόκριση στους 40 °C, η θερμοκρασία δωματίου που επιλέχθηκε για το πείραμα ήταν στους 23 ± 1 °C προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανή εξάτμιση του διαλύματος αλλά και να προσφέρει μεγαλύτερη ευκολία στην εκτέλεση. Η εκλεκτικότητα των αισθητήρων ουρικού οξέος εξαρτάται από δύο μείζονες παράγοντες που είναι η αντίδραση ενζύμου και αναλυτή και ο εκλεκτικός μηχανισμός. Πρόκειται για μια πολύ ειδική αντίδραση λόγω της φύσης της δραστηριότητας της ουρικής. Οι ουσίες στο αίμα που μπορούν να παρεμποδίσουν ένα βιοαισθητήρα ουρικού οξέος περιλαμβάνουν το ασκορβικό οξύ (AA), την ουρία (UR) και τη γλυκόζη (GL) [J.W. Luo, M. Zhang, 2010]. Ως εκ τούτου, για να επιβεβαιώσουμε την εκλεκτικότητα του

ποτενσιομετρικού αισθητήρα επελέγησαν αυτές οι ουσίες. Μετά την προσθήκη 5mM γλυκόζης, 100μM ασκορβικού οξέος και 1mM ουρίας σε διάλυμα 100μM ουρικού οξέος, η μεταβολή του σήματος του αισθητήρα ήταν μικρότερη από 5%. Ακόμη και μετά από επανάληψη των δοκιμών με νέους αισθητήρες η απόκλιση των αποτελεσμάτων ήταν μικρή. Έτσι, στην πράξη, αυτές οι αλλαγές στην απόκριση του αισθητήρα μπορούν να αγνοηθούν.

Για την προσαρμογή του παραπάνω ηλεκτροχημικού αισθητήρα ουρικού οξέος σε πραγματικά ανθρώπινα βιολογικά υγρά έπρεπε να διερευνηθούν πιθανές παρεμποδίσεις από πρωτεΐνες. Γι' αυτόν τον σκοπό, χρησιμοποιήθηκε ένα πείραμα ελέγχου ένα διάλυμα αλβουμίνης (λευκωματίνης) με συγκέντρωση παρόμοια με αυτή που βρίσκεται στα ανθρώπινα βιολογικά υγρά (6-8% w/v στον ορό και 50-140 mg / 100 ml στα ούρα). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν παρατηρείται καμία μεταβολή για συγκεντρώσεις λευκωματίνης έως 322mg/100ml. Για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις λευκωματίνης παρατηρήθηκαν παρεμποδίσεις υπό τη μορφή τυχαίων μεταβολών του δυναμικού που οφειλόταν στην προσρόφηση στην λιπιδική μεμβράνη μετά από 2,5 λεπτά από την ένεση της λευκωματίνης στο διάλυμα ηλεκτρολυτών.

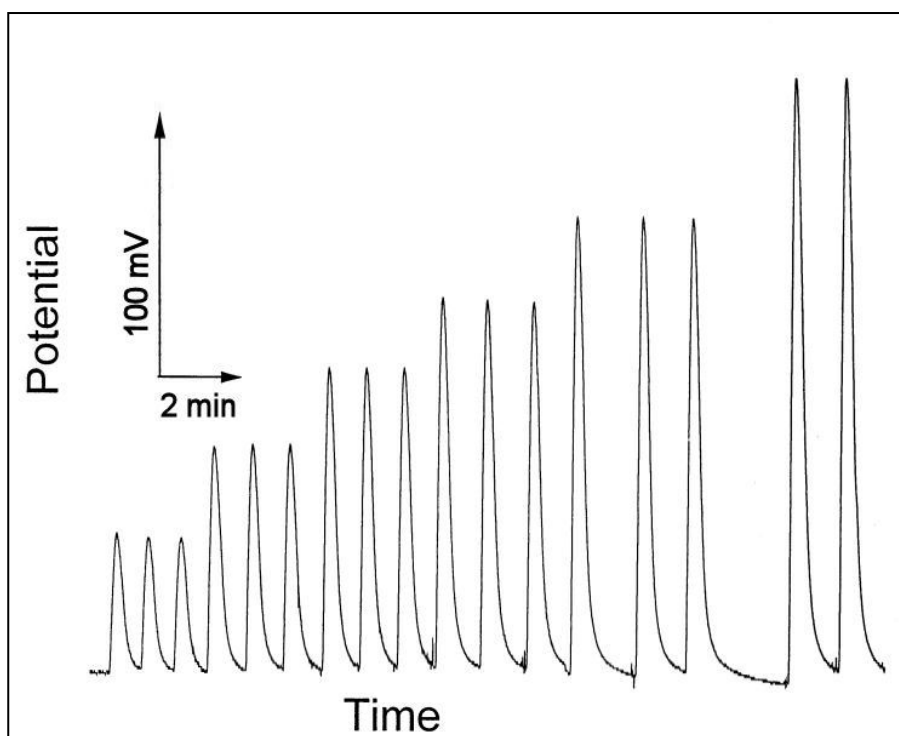
Ως εκ τούτου, αυτός ο βιοαισθητήρας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί χωρίς πρόβλημα για την ταχεία ανίχνευση του ουρικού οξέος στα ανθρώπινα βιολογικά υγρά.



Σχήμα 21: Βαθμός απόκρισης του αισθητήρα σε σχέση (α) με το pH του περιβάλλοντος και (β) με τη θερμοκρασία σε συγκέντρωση 100μM διαλύματος ουρικού οξέος

Τα λιπίδια που ανευρίσκονται σε φυσιολογικές συνθήκες στα βιολογικά υγρά μπορούν επίσης να παρεμποδίσουν την απόκριση του αισθητήρα αλληλεπιδρώντας με τα μόρια του φιλμ των λιπιδίων του ηλεκτροδίου. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν πειράματα που έδειξαν ότι όταν εγγύεται αίμα ή ούρα επιμολυσμένα με λιπίδια εντός του διαλύματος ηλεκτρολυτών δε παρατηρούνται μεταβολές στα δυναμικά της μεμβράνης. Απ'ότι φαίνεται, τα λιπίδια δεν είναι σε θέση να συντηχθούν με την λιπιδική μεμβράνη λόγω της προστατευτικής δράσης των πρωτεϊνών, δεδομένου ότι τα εν λόγω δύο συστατικά σχηματίζουν λιποπρωτεΐνες, με τις πρωτεΐνες να βρίσκονται στην υδάτινη/υδατική φάση [A. Townshed, Ed.; *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1995]

Το σύστημα ανίχνευσης που περιγράφεται στην παρούσα μελέτη έχει δείξει καλή αναστρεψιμότητα με τη χρήση του συστήματος FIA. Η αναλυτική απόκριση του βιοαισθητήρα ουρικού οξέος στο σύστημα FIA ήταν ταχεία και επαναλήψιμη (RDS λιγότερο από 5%). Ειδικότερα, το παρόν σύστημα επέτρεψε περίπου 90 ενέσεις ουρικού οξέος ανά ώρα. Ωστόσο, ο αριθμός των ενέσεων που εκτελούνται περιορίζεται από την ικανότητα των συριγγών Hamilton που χρησιμοποιήθηκαν (2-5mL). Το **σχήμα 22** παρουσιάζει τα αποτελέσματα των πειραμάτων FIA. Επί του παρόντος, έγινε χρήση του συνεχούς τρόπου λειτουργίας ενέσεων με μια τριπλή βαλβίδα και ο ρυθμός ροής που χρησιμοποιήθηκε ήταν 4mL/min με το σήμα να μειώνεται για μεγαλύτερους ρυθμούς ροής. Για αυτές τις ταχύτητες ροής, ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσει το διάλυμα από το σημείο της ένεσης ως τον ηλεκτροχημικό θάλαμο είναι περίπου 10 δευτερόλεπτα. Οι βελτιστοποιημένες συνθήκες επέτρεψαν τον προσδιορισμό του ουρικού οξέος εντός της γραμμικής περιοχής 1-1000μM με καλή εξίσωση παλινδρόμησης [$E = 0,0603 \log C + 0,413$, $r^2 = 0,983$, (**σχήμα 22**). Τέλος, το όριο ανίχνευσης του εν λόγω αισθητήρα είναι παρόμοιο ή μικρότερο με άλλους ηλεκτροχημικούς αισθητήρες που περιγράφονται στην βιβλιογραφία [S. A. Kumar, H. -W. Cheng, 2009; J. Huang, Y. Liu, H. Hou, 2008; C. Xiao, X. Chu, 2011; M. Mallesha, R. Manjunatha, 2011; J. Arguello, V. L. Leidens, 2008; R. Cui, X. Wang, G. Zhang, 2011; R. P. Da Silva, A. W. O. Lima 2008; Y. Li, X. Lin, 2006]. Στον **πίνακα 6** παρουσιάζεται μια σύγκριση αυτής της εργασίας με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία.



Σχήμα 22: Ληφθείσες καταγραφές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων με τη μέθοδο FIA, στις οποίες απεικονίζεται η αύξηση του σήματος ανάλογα των κάτωθι συγκεντρώσεων: 1.00 μ M, 5.00 μ M, 10.0 μ M, 50.0 μ M, 100 μ M και 1000 μ M

Η απόκριση συσχετίστηκε λογαριθμικά με το δυναμικό για την συγκέντρωση του ουρικού οξέος και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει επιστροφή στις αρχικές τιμές μετά από κάθε μέτρηση. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε μείωση του σήματος έπειτα από κάθε κύκλο δοκιμών. Τέλος, το αρχικό δυναμικό ήταν σταθερό κατά την διάρκεια των μετρήσεων (6-8 ώρες/ημέρα), ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα μετά από τρεις εβδομάδες καθημερινής χρήσης.

Πίνακας 6. Σύγκριση της παρούσας μελέτης με αντίστοιχες μελέτες στην βιβλιογραφία

Ηλεκτρόδιο	Όριο Ανίχνευσης/ μ M	Linearity range/ μ M	Μελέτη Αναφοράς
Παρούσα Μέθοδος, ZnO	0.4	1.0-1000	Παρούσα Μελέτη
Υαλώδης Άνθρακας	2.0	30-1000	Kumar S.A.,2009
Πολτός Άνθρακα	0.7	2.0-200	Hang J., 2008

Υαλώδης Άνθρακας	0.04	5.0-30	Xiao C., 2011
Γραφίτης	0.45	1.75-90	Mallesha M., 2001
Σύνθετο ηλεκτρόδιο φωσφορυλιωμένου ζιρκονίου-διοξειδίου του πυριτίου	3.7	22-350	Arguello J., 2008
Υαλώδης Άνθρακας	1.5	6.7-65	Cui R., 2011
Πυρολυτικός Γραφίτης	1.4	2.5-30	DaSilva R.P., 2008
Υαλώδης Άνθρακας	0.6	2.0-50	Li Y., 2006

5.5 Επιμέρους Συμπεράσματα

Στον πειραματικό αυτό κύκλο παρουσιάστηκε μια απλή διαδικασία κατασκευής ενός εξαιρετικά ευαίσθητου βιοαισθητήρα ουρικού οξέος βασισμένου στην χρήση των νανοσυρμάτων ZnO, ο οποίος φάνηκε να παρέχει το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την φόρτωση του ενζύμου με μια εύκολη διαδικασία δέσμευσης/ακινητοποίησης. Επιπλέον, ο αισθητήρας της ουρικής διατήρησε την ενζυματική του δραστηριότητα λόγω του λιπιδικού φιλμ το οποίο αυξάνει την βιοσυμβατότητα του ίδιου του βιοαισθητήρα. Η ποτενσιομετρική ευαισθησία αυξήθηκε από 32 mV/decade σε περίπου 61 mV/decade λόγω της ενσωμάτωσης ενός θετικά φορτισμένου κατιονικού λιπιδίου εντός της λιπιδικής μεμβράνης που χρησιμοποιήθηκε. Δεδομένου ότι ο εν λόγω αισθητήρας παρουσιάζει χαμηλό κόστος, και ταυτόχρονα, μια αξιόλογη επαναληψιμότητα, μπορεί να έχει εφαρμογή για μια «επιτόπου» (ή άμεση) κλινική διάγνωση. Επιπρόσθετα, η συναρμολόγηση του αισθητήρα σε φορητές συσκευές μπορεί να το καταστήσει κατάλληλο για χρήση από ανειδίκευτο προσωπικό. Τελικά, το ηλεκτρόδιο του βιοαισθητήρα για το ουρικό οξύ χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς στα πειράματα FIA, γεγονός που τον καθιστά χρήσιμο για την κλινική ανάλυση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκαν μέθοδοι για την κατασκευή ευαίσθητων βιοαισθητήρων για την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό του ουρικού οξέος και της χοληστερόλης σε πραγματικά δείγματα βιολογικών υγρών (ούρων ή ανθρώπινο ορό). Και στις δύο ανωτέρω περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε μια σταθεροποιημένη πολυμερισμένη λιπιδική μεμβράνη που ήταν ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου ZnO. Στο βιοαισθητήρα του ουρικού οξέος και της χοληστερόλης, η ουρικάση και η οξειδάση της χοληστερόλης προστέθηκαν πριν τον πολυμερισμό. Η κατασκευή του ηλεκτροδίου του ZnO ήταν παρόμοια και στις δύο περιπτώσεις. Στη συνέχεια, μελετήθηκε ποτενσιομετρικά η απόκριση των αισθητήρων σε διάφορες συγκεντρώσεις ουρικού οξέος και χοληστερόλης, η οποία παρουσίαζε υψηλή ευαισθησία για μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων που κυμαινόταν από 1×10^{-6} M ως 1×10^{-3} M. Παράλληλα, και τα δύο είδη βιοαισθητήρων παρουσίασαν καλή επαναληπτικότητα και γρήγορους χρόνους απόκρισης. Επιπλέον, και οι δύο βιοαισθητήρες έδειξαν ότι μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για ένα σχετικά μεγάλο αριθμό μετρήσεων. Παράλληλα, μελετήθηκαν οι παρεμποδίσεις για να εφαρμοστεί η μέθοδος προσδιορισμού του ουρικού οξέος και της χοληστερόλης σε πραγματικά δείγματα. Και στις δύο ανωτέρω περιπτώσεις οι βιοαισθητήρες εμφάνισαν καλή εκλεκτικότητα ως προς το αναλυόμενο έναντι των παρεμποδίζουσων ουσιών.

Τα πλεονεκτήματα των συγκεκριμένων βιοαισθητήρων σε σύγκριση με άλλες πρότυπες αναλυτικές μεθόδους είναι:

1. η εύκολη κατασκευή τους,
2. οι φθηνές πρώτες ύλες,
3. η ελάχιστη προετοιμασία των δειγμάτων,
4. η ταχεία ανίχνευση των αναλυόμενων και
5. η χρήση μη ειδικευμένου προσωπικού.

Μελλοντικές προοπτικές της παρούσας διατριβής θα μπορούσε να αποτελέσει η εφαρμογή των συγκεκριμένων βιοαισθητήρων για την επιτόπου (σε πραγματικό χρόνο) μέτρηση των ουσιών σε δείγματα με εφαρμογή τους στην κλινική διάγνωση και η ενσωμάτωσή τους σε φορητό τσιπ. Με βάση τις αρχές της κατασκευής των βιοαισθητήρων αυτών που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή, είναι δυνατόν, με αλλαγή του «υποδοχέα» ή των συνθηκών μετρήσεως, να κατασκευαστούν παρόμοιοι αισθητήρες για την ανίχνευση άλλων τοξικών ουσιών. Επιπλέον, είναι δυνατή υπό προϋποθέσεις (κυρίως οικονομικές) η μαζική παραγωγή των βιοαισθητήρων αυτών.

Η νανοβιοτεχνολογία είναι στο επίκεντρο της ανάπτυξης στο πεδίο των βιοαισθητήρων (biosensors) μέσω της χρήσης νέων υλικών, βελτιωμένης επιφανειακής μηχανικής και ολοκληρωμένων συστημάτων. Οι βιοαισθητήρες αναπτύσσονται με χρήση και συνδυασμό προηγμένων νανοϋλικών (nanowires, νανοσωματίδια κ.α.). Με τον τρόπο αυτό δίνεται η δυνατότητα, για παράδειγμα, να ανιχνευθούν πρωτεΐνες σε μοριακή κλίμακα, και έτσι το πεδίο της διαγνωστικής να επεκταθεί σε επίπεδο ανίχνευσης και ταυτοποίησης μέχρι και ξεχωριστών μορίων από ένα δείγμα μείγματος σωματικών υγρών.

Προχωρώντας ένα στάδιο επιπλέον και σε μια προσπάθεια πρόβλεψης της εξέλιξης φαίνεται ότι οι νανοδοσκευές ανοίγουν νέους ορίζοντες στην ιατρική διαγνωστική και θεραπεία, καθώς οι τεχνολογικές πρόοδοι στα υλικά και τους βιοαισθητήρες γίνονται πρόδρομοι της ανάπτυξης των ιατρικών εφαρμογών. Στον τομέα της θεραπείας του καρκίνου, όπως και στην συγκεκριμένη μεταφορά φαρμάκων, τα νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν probes για την τοπική καταστροφή ιστών, χρησιμοποιώντας φως ή θερμότητα για να προκαλέσουν θερμικό φορτίο ή μεταφέροντας και εναποθέτοντας χημειοθεραπευτικές ουσίες.

Νανοϋλικά με ενισχυμένες μηχανικές ιδιότητες μπορούν να αντικαταστήσουν αυτά που χρησιμοποιούνται στα ορθοπεδικά εμφυτεύματα σήμερα, τα οποία έχουν συγκεκριμένα όρια αντοχής στις πιέσεις που υφίστανται στο εσωτερικό του οργανισμού.

Νανοϋλικά με ελεγχόμενες ηλεκτρικές ιδιότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία νευρικών παθήσεων. Νανοτεχνολογικές μέθοδοι ανάπτυξης οδηγούν στην παραγωγή νέων τύπων νανοδομημένων βιοϋλικών, όπως νανοΐνες (nanofibers), νανοσφαίρες, νανο-δέντρα, βιοενεργούς υάλους κτλ. Η Νανοτεχνολογία θα βοηθήσει στην ανάπτυξη βιοενεργών υλικών που απελευθερώνουν μόρια-σήματα με ελεγχόμενες δόσεις / ρυθμούς, μέσω διάχυσης ή αποικοδόμησης του υλικού, καθώς και στην ανάπτυξη συστημάτων στόχευσης για τις θεραπείες μέσω βλαστικών κυττάρων, με άμεσο επακόλουθο την κατασκευή 'τεχνητών' ιστών in vivo.

Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abramson M.B., Katzman R., Wilson C.E and. Gregor H.P,
Ionic Properties of Aqueous Dispersions of Phosphatidic Acid, *J. Biol. Chem*, vol. 239, 1964, pp. 4066-4072.
2. Aishwarya S1, Mahalakshmi S, Sehgal PK.
Collagen-coated polycaprolactone microparticles as a controlled drug delivery system. *J Microencapsul*. 2008 Aug;25(5):298-306
3. E. Akyilmaz , M.K. Sezgintürk, E. Dinckaya.
Talanta 2003, 61, 73
4. Al-Hilli S.M., Al-Mofarji R.T., Klason P, Willander M.,
J. Appl. Phys. 2008, 103, 014302.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al:
Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York:Garland Science ; 2002.
6. Alderman M., Aiyer K.J.V,
Curr. Med. Res. Opin. 2004, 20, 369.
7. Aliaga A.E., Osorio-Roman I, Garrido C., Leyton P., Carcamo J., Clavijo E., Gomez-Jeria J.S., Diaz G.F. and Campos-Vallette M.M.,
Surface Enhanced Raman Scattering Study of l-Lysine, *Vib. Spectrosc.*, vol. 50, 2009, pp. 131-135
8. Alvarado-Urbina G., Sathe G, Liu W., Gillen M., Duck P., Bender R. and Oqilvie K.,
Automated Synthesis of Gene Fragments, *Science*, vol. 214
9. Andriola Silva Brun-Graepi Amanda K., Richard Cyrille, Bessode Michel, Scherman Daniel, Otto-Wilhelm Merten.
Thermoresponsive surfaces for cell culture and enzyme-free cell

detachment Progress in Polymer Science Volume 35, Issue 11, Pages 1311-1324

10. Arguello J., Leidens V. L., Magosso H. A., Ramos R. R., Gushikem Y, Electrochim Acta 2008, 54, 560
11. Armentano I, Del Gaudio C, Bianco A, Dottori M, Nanni F, Fortunati E, Kenny JM. Processing and properties of poly(ϵ -caprolactone)/carbon nanofibre composite mats and films obtained by electrospinning and solvent casting. J Mat Sci 2009b;44: 4789–95.
12. Arya A., Krull U.J, Thomson M. and Wong H.E., Langmuir — Blodgett Deposition of Lipid Films on Hydrogel as a Basis for Biosensor Development, Anal. Chim. Acta, vol. 173, 1985, pp. 331-336.
13. Ashrafuzzaman M. and Tuszynski J., Ion Pore Formation in Lipid Bilayers and Related Energetic Considerations, Curr. Med. Chem., vol. 19, 2012, pp. 1619-1634.
14. Azevedo M. C., Reis R. L., Claase B. M., Grijpma D. W., and Feijen J., "Development and properties of polycaprolactone/hydroxyapatite composite biomaterials", Journal of Materials Science-Materials in Medicine, vol. 14, issue 2, pp. 103-107, 2003.
15. Balakrishnan K., Mehdi S. Q. and McConnell H. M, Availability of Dinitrophenylated Lipid Haptens for Specific Antibody Binding Depends on the Physical Properties of Host Bilayer Membranes, J. Biol. Chem., vol. 257, 1982, pp. 6434-6439.
16. Bhambi M., Sumana G., Malhotra B.D., Pundir C.S., Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 2010, 38, 178

17. Bartucci R., Gulfo N., Sportelli L.,
Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes 1990, 1025, 117.

18. Blank M,
The Surface Compartment Model: A Theory of Ion Transport Focused on
Ionic Processes in the Electrical Double Layers at Membrane Protein
Surfaces,
Biochim. Biophys. Acta, vol. 906, 1987, pp. 207-294.

19. Benjamin J.R.F. Bolland, Janos M. Kanczler, Patrick J. Ginty , Steve M.
Howdle, Kevin M. Shakesheff, Douglas G. Dunlop, Richard O.C. Oreffo
The application of human bone marrow stromal cells and poly(DL-lactic
acid) as a biological bone graft extender in impaction bone grafting
Biomaterials 29 (2008) 3221–3227

20. Bergveld P.,
Sensors and Sensory Systems for Advanced Robots, P. Dario, ed., NATO
AS1 Series, Springer-Verlag, Berlin, 1988

21. Bergveld P.,
Exploiting The Dynamic Properties of FET-Based Chemical Sensors,
J. Phys. E: Sci. Instrum., vol. 22, 1989, pp. 678-683.

22. Bernstein R.,
Improving the Accuracy of Blood Glucose Meters that Use Enzymatic
Reagent Strips, *Diabetes Care.*, vol. 8, 1985, pp. 101-102

23. Bianco A, Di Federico E, Camaioni A, Armentano I, Campagnolo L.,
Kenny J M
Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/Ca-deficient hydroxyapatite nanohybrids:
Microstructure, mechanical properties and cell response by murine
embryonic stem cells. *Materials Science and Engineering: C* 01/2009;
29(6):2063-2071

24. Bier F. F., Jockers R and Schmid R. D.,
Integrated Optical Immunosensors for Striazine Determination:
Regeneration, Calibration and Limitations, *Analyst*, vol. 119, 1994, pp.
437-441.
25. Bier F. F, and Schmid R. D.,
Real Time Analysis of Competitive Binding Using Grating Coupler
Immunosensors for Pesticide Detection, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 9, 1994,
pp. 125-130.
26. Bikiaris, D. N.; Chrissafis K.; Paraskevopoulos, K.
Investigation of thermal degradation mechanism of an aliphatic polyester
using pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry and a kinetic study
of the effect of the amount of polymerisation catalyst.
Polym Degrad Stab 2007, 92, 525–536
27. V. Bisht, W. Takashima, K. Kaneto, *Biomaterials* 2005, 26,
3683.
28. Boggs J.M.,
Lipid Intermolecular Hydrogen Bonding: Influence on Structural
Organization and Membrane Function, *Biochim. Biophys. Acta.*, vol.
906,1987, pp. 353-404
29. Brennan J. D., Nikolelis D.P and Krull U. J.,
Physical Processes of Signal Transduction by Lipid Membranes: Analytical
Applications in Biosensor Technology, *Current Topics in Biophysics*, P.T
Frangopol, e.d., “Al Cuza” University Press, Iasi, Romania, 1993, vol 2, pp
139-198.
30. Briget Mary M., Sasirekha V. and Ramakrishnan V.,
Spectral Investigations of Amino Acid Picrates, *Spectrochim. Acta*, vol. 65,

2006, pp. 414-420.

31. Buck R.P
Sensor issues for the 1990s: “Physical An introduction to the North Carolina Section American Chemical Society Symposium on biosensors”, in biosensor technology: “Fundamentals and applications”, Eds, R.P. Buck., W.H Hatfield, M. Umana and E.F. Boweden , Marcel Pekker, Inc: New York, 1990, pp.3-13.

32. Bulte Jeff WM, Douglas Trevor, Witwer Brian, Zhang Su-Chun, Strable Erica, Lewis Bobbi K, Zywicke Holly, Miller Brad, Gelderen Peter van, Bruce M M
Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells *Nature Biotechnology* 19, 1141 - 1147 (2001)

33. Cammann K., and. Fresenius Z,
Biosensors Based on Ion-Selective Electrodes, *Anal. Chem.*, vol. 287, 1977, pp. 1-9.

34. Caras S., Janata J,
Anal. Chim. Acta 1980, 52, 1935.

35. Caras S., Petelenz D and. Janata J,
pH-Based Enzyme Potentiometric Sensors. Part 2. Glucose-Sensitive Field Effect Transistor, *Anal Chem.*, vol. 57, 1985, pp. 1920-1923.

36. Carr P.W. and Bowers L.D,
Immobilised Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry, J.Wiley&Sons, New York, 1980

37. Chen Hongli, Bei Jianzhong and Wang Shenguo
Hydrolytic degradation of polyester–polyether block copolymer based on polycaprolactone/poly(ethylene glycol)/polylactide[†]
Polymers for Advanced Technologies
Volume 11, Issue 4, pages 180–184, April 2000

38. Chu CF1, Lu A, Liszkowski M, Sipehia R.
Enhanced growth of animal and human endothelial cells on biodegradable polymers. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Nov 16;1472(3):479-85
39. Cui G., Yoo J.H., Woo B.W., Kim S.S, Cha G.S., Nam H.,
Talanta 2001, 54, 1105.
40. Cui R., Wang X., Zhang G, Wang C.,
Sens. Actuators, B 2011, 159, 271
41. Clark J. and Lyons C,
Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery,
Ann. N Y Acad Sci., vol. 102, 1962, pp. 29-45.
42. Clemenz T., Christianson A. and Wieslander A.,
Effect of electrical potential on membrane organization and function,
Advances in Membrane Fluidity: Physiological Regulation of Membrane Fluidity, R.C Aloia, C.C Curtain and L.M Gordon, eds., Alan R. Liss, Inc:
New York, 1988, chapter 2.
43. Clough R. L,
Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B 185, 8–33 (2001)
44. Correa-Duarte Miguel A., Wagner Nicholas, -Chapana José Rojas,
Morszeck Christian, Thie Michael, and Giersig Michael
Fabrication and Biocompatibility of Carbon Nanotube-Based 3D Networks as Scaffolds for Cell Seeding and Growth Nano Letters , 2004, 4 (11), pp 2233–2236. November 2004
45. Da Silva R. P., Lima A. W. O, Serrano S. H. P.,
Anal Chim Acta 2008, 612, 89.

46. Dai Z. R., Pan Z.W., Wang Z. L.,
Adv. Funct. Mater. 2003,
13, 9.
47. Danielli, J. F.; Davson, H. (1935).
"A contribution to the theory of permeability of thin films". Journal of
Cellular and Comparative Physiology **5** (4): 495
48. Del Castillo J., Rodriguez A, Romero C.A. and Sanchez V.,
Lipid Films as Transducers for Detection of Antigen-Antibody and
Enzyme-Substrate Reactions, Science, vol. 153, 1966, pp. 185-188
49. Dimitrov D.S. and Jain R.K.,
Membrane Stability, Biochim. Biophys. Acta, vol. 779, 1984, pp. 437-468.
50. Discher DE1, Janmey P, Wang YL.
Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate.
Science. 2005 Nov 18;310(5751):1139-43.
51. Dixon B.M.,Lowry J.P, O'Neill R.D.,
J. Neurosci. Methods 2002, 119, 135
52. Donlan R M, Costerson JW
Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms
Clin. Microbiol. Rev. April 2006
53. Drury Jeanie L., Mooney David J
Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications
Biomaterials Volume 24, Issue 24, November 2003, Pages 4337–4351
54. Dunn AS, Campell PG, Marra KG,
The influence of polymer blend composition on the degradation of
polymer/hydroxyapatite biomaterials.

- J Mater Sci Mater Med. 2001 Aug;12(8):673-7.
55. Edenharder R., Kurz P, John K, Burqard S. and Seeqer K.,
In vitro Effect of Vegetable and Fruit Juices on the Mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline, Food Chem. Toxicol. vol. 32, 1994, pp. 443-459.
 56. El Bouhouti E, Narajo-Rodriguez I., Hildago-Hidalgo de Cisneros J.L., ElKaoutit M., Tamsaman K.R, Bouchta D., Cubillana Aguilera L.M, Talanta 2009, 79, 22
 57. Encyclopedia of Analytical Chemistry (Ed: A. Townshed), Academic Press, London 1995, Vol. 4, p. 2520; Vol. 9, p. 5.
204. [28] M. K. Ram, P. Bertoncello, H. Ding, S. Paddeu, C. Nicolini,
 58. Evtugyn G.A., Budnikov H.C and. Nikolskaya E.B,
Sensitivity and Selectivity of Electrochemicalenzymesensors for Inhibitor determination, Talanta, vol. 46, 1998, pp. 465-484
 59. Faulk WP, Taylor GM.
An immunocolloid method for the electron microscope. Immunochemistry. 1971 Nov;8(11):1081-3.
 60. Ferraz MP, Monteiro FJ, Manuel CM.
Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics 2004; 2: 74-80
 61. Fisher K. and Branton D.,
Application of the Freeze-Fracture Technique to Natural Membranes, Methods Enzymol., vol. 32,1974, pp. 35-44.
 62. Franek M., Pouzar V and Kolar V.,
Enzyme-Immunoassays for Polychlorinated Biphenyls: Structural Aspects of

Hapten-Antibody Binding,

Anal. Chim. Acta, vol. 347, 1997, pp. 163-176

63. Freed LE1, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, Langer R.
Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering.
Biotechnology (N Y). 1994 Jul;12(7):689-93.
64. Frenot Audrey, Chronakis Ioannis S.
Polymer nanofibers assembled by electrospinning
Current Opinion in Colloid and Interface Science 8 (2003) 64–75
65. Gaub H., Buschl R., Ringsdorf H. and Sackmann E,
Lateral Diffusion and Phase Separation in Two-Dimensional Solutions of
Polymerized Butadiene Lipid in Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayers.
A Photobleaching and Freeze Fracture Study, Biophys. J., vol.45, 1984, pp.
725-731.
66. Gotoh M., Tamiya E., Momoi M., Kagawa Y and Karube I.,
Acetylcholine Sensor Based on Ion Sensitive Field Effect Transistor and
Acetylcholine Receptor, Anal. Letters, vol. 20, 1987, pp. 857-870
67. Greene L. E., Yuhas B. D., Law M., Zitoun D., Yang P.,
Inorg. Chem. 2006, 45, 7535.
68. Greiner A., Wendorff J.H.
Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin
Fibers.
Chem. Int. Ed., 2007, 46, 5670.
69. Harborn U., Xie B., Venkatesh R, Danielsson B.,
Clin. Chim. Acta 1997, 267, 225

70. Harrison BS, Atala. A
Carbon nanotube ap
plications for tissue engineering. *Biomaterials*. 2007 Jan;28(2):344-53.
71. Harwood G.W.J., Pouton C.W.,
Adv. Drug Del. Rev. 1996, 18, 163
72. Heinig M., Johnson R.J,
Cleveland Clinic J. of Med. 2006, 73 (12), 1059
73. Hollister Scott J.
Porous scaffold design for tissue engineering *Nature Materials* 4, 518 - 524
(2005)
74. Holy CE, Cheng C, Davies JE, Shoichet MS.
Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering
Biomaterials. 2001 Jan;22(1):25-31
75. Hong F.T, ed., *Molecular Electronics*, Plenum Press, New York, 1989
76. Hong H. C, Huang H.J,
Anal. Chim. Acta 2003, 499, 41
77. Hong Z, Zhang P, He C, Qiu X, Liu A, Chen L, Chen X, Jing X Nano-
composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite:
mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials*. 2005
Nov;26(32):6296-304
78. Hooper Kimberly A., Cox J. David and Kohn Joachim
Comparison of the effect of ethylene oxide and γ -irradiation on selected
tyrosine-derived polycarbonates and poly(L-lactic acid)
Journal of Applied Polymer Science Volume 63, Issue 11, pages 1499–
1510, 14 March 1997

79. Hoshi T., Saiki H., Anzai J.I.,
Talanta 2003, 61, 363.
80. Huang J, Liu Y., Hou H., You T.,
Biosens. Bioelectron. 2008, 24, 632
81. Huang W., Taylor S, Fu K., Lin Y., Zhang D., Hanks T. W., Rao A. M,
Sun Y. P.,
Nano Lett. 2002, 2, 311.
82. Huang X, Li S, Schultz JS, Wang Q, Lin Q
A MEMS affinity glucose sensor using a biocompatible glucose-responsive
polymer Sensors and Actuators B:
Chemical 140 (2), 603-609
83. Hurrell, S., Cameron, R.E.
Polyglycolide: degradation and drug release. Part I: Changes in morphology
during degradation
J. Mater. Sci. - Mater. M., 12(9), 811-816.
84. Ikonen E.,
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008, 9, 125.
85. Ionic Channels of Excitable Membranes (Ed: B. Hille), Sinauer,
Sunderland, MA 1984, ch. 1.
86. Israr M. Q., Sadaf J. R., Asif M. H., Nur O., Willander M.,
Danielsson B.,
Thin Solid Films 2010, 519, 1106.
87. Janata J.,
Anal. Chem. 1990, 62, 33R.

88. Janata J. and Bezegh A.,
Chemical Sensors, Anal. Chem., vol. 60, 1988, pp. 62R-64R
89. Jang JH1, Castano O, Kim HW.
Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering.
Adv Drug Deliv Rev. 2009 Oct 5;61(12):1065-83
90. Jianrong C., Yuqing M, Nongyue H., Xiaohua W, Sijiao L.,
Nanotechnology, Biosensors Biotechnol. Adv. 2004, 22, 505
91. Kang X1, Xie Y, Powell HM, James Lee L, Belury MA, Lannutti JJ, Kniss
DA.
Adipogenesis of murine embryonic stem cells in a three-dimensional culture
system using electrospun polymer scaffolds. Biomaterials. 2007
Jan;28(3):450-8.
92. Kanjickal Deenu, Lopina Stephanie, Evancho-Chapman M. Michelle,
Schmidt Steven and Donovan Duane
Effects of sterilization on poly(ethylene glycol) hydrogels
Journal of Biomedical Materials Research Part A Volume 87A, Issue 3,
pages 608–617, 1 December 2008
93. Klein C. P. A. T., Driessen A. A., de Groot K and van den Hooff A.
Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone
tissue Journal of Biomedical Materials Research Volume 17, Issue 5, pages
769–784, September 2004
94. Kim Young-Rok, Jung Sungho, Ryu Hyunil, Yoo Yeong-Eun, Kim Sun
Min and Jeon Tae-Joon:
Synthetic Biomimetic Membranes and Their Sensor Applications
Sensors 2012, 12, 9530-9550

95. Kintzios S., Pistola E, Panagiotopoulos P, Bomsel M., Alexandropoulos N., Bem F., Ekonomou G, Biselis J and Levin R.,
Bioelectric Recognition Assay (BERA), Biosens. Bioelectron., vol.16, 2001,
pp. 325-336
96. Koegler WS1, Griffith LG.
Osteoblast response to PLGA tissue engineering scaffolds with PEO
modified surface chemistries and demonstration of patterned cell response.
Biomaterials. 2004 Jun;25(14):2819-30.
97. Krull U.J.,
Ion-current Signal Optimization for Lipid Membrane-Based Biosensors,
Anal. Chim. Acta, vol. 192 , 1987, pp. 321-326.
98. Krull U.J, and M. Thompson,
The lipid Membrane as Selective Transducer, IEEE Trans. Elect. Dev., vol.
32, 1985, pp. 1180-1184.
99. Krull U.J., Thomson M., Winsborrow B. and. Wong H.E,
Langmuir-Blodgett Film Characteristics and Phospholipid Membrane Ion
Conduction : Part 2. Ethylenic Acyl Chain Oxidation, Anal. Chim. Acta, vol.
174, 1985, pp. 95-102.
100. Kumar Basu A., Chattopadhyay P., Roychoudhuri U,
Chakraborty R.,
Bioelectrochemistry 2007, 70, 375.
101. Kumar S. A., Cheng H.-W, Chen S.-M.,
Electroanalysis 2009, 21, 2281
102. Kuwabata S., Nakaminami T., Ito S.I., Yoneyama H.,
Sens. Actuators B 1998, 52, 72
103. Lauger P.,

- Carrier-Mediated Ion Transport, *Science*, vol. 178, 1972, pp. 24-30
104. Lee AG.
Lipid–protein interactions in biological membranes: a structural perspective
Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes Volume 1612,
Issue 1,2 May 2003, 1-40
105. Leventis R., Gange J., Fuller N., Rand R., and Silvius J.,
Divalent cation induced fusion and lipid lateral segregation in
phosphatidylcholine-phosphatidic acid vesicles, *Biochemistry*, vol. 25,
1986, 6978-6987.
106. Li G., Liao J. M., Hu G. Q., Ma N. Z, Wu P. J.,
Biosens. Bioelectron.
2005, 20, 2140.
107. Li J. F., Yao L. Z., Cai W. L., Mo J. M,
Acta Phys. Sin. 2001,
50, 1623
108. Li J S
Biomed Mater Res. 1999;48(3):342-53. Hydrolytic degradation
characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids.
109. Li, X.L.Lu, Y.F. Zheng.
Effect of surface modified hydroxyapatite on the tensile property
improvement of HA/PLA composite. *Applied Surface Science* Volume 255,
Issue 2, 15 November 2008
110. Li Y., Lin X.,
Sens. Actuators B 2006, 115, 134.
111. Liao, K-C, Hogen-Esch, T., Richmond, F.J., Marcu, L.R., Clifton, W. and
Loeb, G.E.

Percutaneous Fiber-optic Sensor for Chronic Glucose Monitoring in vivo.
Biosensors & Bioelectronics, 23:1458-1465, 2008

112. Lima J.L.F.C. and Montenegro M.C.B.S.M.,
Dopamine Ion-Selective Electrode for Potentiometry in Pharmaceutical Preparations, Mikrochim.Acta, vol. 131, 1999, pp. 187-190
113. Linazasoro G1
Potential applications of nanotechnologies to Parkinson's disease therapy. Parkinsonism Relat Disord. 2008;14(5):383-92
114. Lipkowski J.,
Building Biomimetic Membrane at a Gold Electrode Surface, Phys. Chem. Chem. Phys., vol. 42, 2012, pp. 13874-13887
115. Liu B., Zeng H.,
J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 4430
116. Liu J., Goud J., Raj P.M., Iyer M., Wang Z.L., Tummala R.R.,
Proc. 58th Electronic Components and Technology Conf., Orlando FL; 2008, 1317
117. Lovat V1, Pantarotto D, Lagostena L, Cacciari B, Grandolfo M, Righi M, Spalluto G, Prato M, Ballerini L.
Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling. Nano Lett. 2005 Jun;5(6):1107-10.
118. Luo J.W., Zhang M., Pang D.W.,
Sens. Actuators B 2005, 106, 358
119. Luo Y.C., Do J.S., Liu C.C.
Biosensors & Bioelectronics 2006, 22 (4), 482

120. Ma PX.
Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*. 2004;7:30–40
121. Ma PX1, Zhang R.
Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds.
J Biomed Mater Res. 2001 Sep 15;56(4):469-77.
122. Maguregui M.I., Alonso R.M. and Jimenez R.M.,
High-Performance Liquid Chromatography with Amperometric Detection
Applied to the Screening of Beta-Blockers in Human Urine, *J. Chromatogr.*
B Biomed. Appl., vol. 674, 1995, pp. 85-91
123. Mallesha M., Manjunatha R., Nethravathi C., Suresh G. S., Rajamathi M.,
Melo J. S, Venkatesha T. V.,
Bioelectrochem. 2011, 81, 104
124. Marazuela M., Agui L., Gonzalez-Cortez A., Yanez-Sedeno P and Pingarron
J.M,
Microcylinder Polymer Modified Electrodes as Amperometric Detectors for
Liquid Chromatographic Analysis of Catecholamines, *Electroanalysis*, vol. 11,
1999, pp. 1333-1339
125. Martinson A. B.F., Elam J. W, Hupp J. T., Pellin M. J.,
Nano Lett. 2007, 7, 2183.
126. Mattson MP1, Haddon RC, Rao AM.
Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for
neuronal growth. *J Mol Neurosci*. 2000 Jun;14(3):175-82.
127. Maxfield F. R., Tabas I.,
Nature 2005, 438, 612
128. Mei Fang, Zhong Jinsheng, Yang Xiaoping, Ouyang Xiangying, Zhang

Shen, Hu Xiaoyang, Qi Ma, Jigui Lu, Seungkon Ryu and Xuliang Deng
Improved Biological Characteristics of Poly(L-Lactic Acid) Electrospun
Membrane by Incorporation of Multiwalled Carbon
Nanotubes/Hydroxyapatite Nanoparticles Biomacromolecules Volume 8,
Issue 12pp 3729–3735 December 2007

129. Michaloliakos A., Nikoleli G, Siontorou C. and Nikolelis D.,
Rapid Flow Injection Electrochemical Detection of Arochlor 1242 Using
Stabilized Lipid Membranes with Incorporated Sheep anti-PCB Antibody,
electroanalysis, vol.24, 2011, p.p 495-501
130. Montal M. and Mueller P.,
Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of
Their Electrical Properties, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 69, 1972,
pp.3561-3566
131. Mueller P., Rudin D., Tien H. and Wescott W.,
Reconstitution of Cell Membrane Structure in Vitro and its Transformation
into an Excitable System, Nature, vol. 194, 1962, pp. 979-980 .
132. Mwenifumbo S, Shaffer Milo S
Exploring cellular behaviour with multi-walled carbon nanotube constructs
J. Mater. Chem., 2007,17, 1894-1902
133. Navale S. C., Gosavi S. W., Mulla I. S.,
Talanta 2008, 75,
1315.
134. Nayak A. P., Katzenmeyer A. M, Gosho Y., Tekin B.,
Islam M. S,
Appl. Phys. A 2012, 107, 661.
135. Nejati E, Mirzadeh H, Zandi M.

Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite rods/poly(l-lactide acid) composite scaffolds for bone tissue engineering. *Compos Part A*, 2008, 39: 1589-1596

136. Nikolelis D.P., Brennan J.D., Brown R.S. and Krull U.J.,
Control of Ion Transport Across Bilayer Lipid Membranes by Adjustment of Surface Charge Associated with Phase Domain Structures, *Anal. Chim. Acta*, vol. 257, 1992, pp. 49-57.
137. Nikolelis D.P., Brennan J.D., Brown R.S., McGibbong G. and Krull U.J.,
Ion Permeability Through Bilayer Lipid Membranes for Biosensor Development: Control by Chemical Modification of Interfacial Regions Between Phase Domains, *Analyst*, vol. 116, 1991, pp. 1221-1226
138. Nikolelis D. P., Drivelos D. A., Simantiraki M. G. and Koinis S,
An Optical Spot Test for the Detection of Dopamine in Human Urine Using Stabilized in Air Lipid Films, *Anal. Chem*, 2004, vol. 76, pp. 2174-2180
139. Nikolelis D.P., Hianik T. and Krull U.J.,
Biosensors Based on Thin Lipid Films and Liposomes, *Electroanalysis*, vol. 11, 1999, pp. 7-15.
140. Nikolelis D. P., Hianik T., Nikoleli G.-P.,
Electroanalysis 2010, 22, 2747
141. Nikolelis D.P. and Krull U.J.,
Establishment and Control of Artificial Ion-Conductive Zones for Lipid Membrane Biosensor Development, *Anal. Chim. Acta*, vol. 257, 1992, pp. 239-245.
142. Nikolelis D.P. and Krull U.J.,
Reliable and Facile Method for Preparation of Solventless Bilayer Lipid Membranes for Electroanalytical Investigations, *Talanta*, vol. 39, 1992, pp.

1045-1049

143. Nikolelis D.P. and Krull U.J.,
Direct Electrochemical Sensing of Insecticides by Bilayer Lipid
Membranes, *Anal. Chim. Acta*, vol. 288, 1994, pp. 187-192.

144. Nikolelis D.P, Krull U.J, Ottova A.L, and Tien H.T,
Bilayer Lipid Membranes and Other Lipid Based Methods in *Handbook of
Chemical and Biological Sensors*. R.F Taylor and J.S. Schultz, eds., Institute
of Physics Publishing, Philadelphia, 1996, chapter 9.

145. D. P. Nikolelis, M. Mitrokosta,
Biosens. Bioelectron. 2002,
17, 585

146. Nikolelis D.P. and. Mitrokotsa M,
Stabilized Lipid Film Based Biosensor for Atenolol, *Biosens. Bioelectr.*, vol.
17, 2002, 565-572.

147. Nikolelis D.P., Pantoulis S.,
A Minisensor for the Rapid Screening of Sucralose Based on Surface-
Stabilized Bilayer Lipid Membranes, *Biosens. Bioelectr.*, vol. 15, 2000, pp.
439-444.

148. Nikolelis D. P., Psaroudakis N. and Ferderigos N.,
Preparation of a Selective Receptor for Ephedrine for the Development of
an Optical Spot Test for the Detection of Ephedrine in Human Urine Using
Stabilized in Air Lipid Films With Incorporated Receptor, *Anal. Chem*, vol.
77, 2005, pp. 3217-3221

149. Nikolelis D.P., Raftopoulou G., Chatzigeorgiou P., Nikoleli G.-P., Viras K,
Sens. Actuators B 2008, 130, 577.

150. Nikolelis D. P., Raftopoulou G., Nikoleli G.-P and Simantiraki M.,

Stabilized Lipid Membrane Based Biosensors with Incorporated Enzyme for Repetitive Uses, *Electroanalysis*, vol.18, 2006, pp. 2467-2474

151. Nikolelis D.P., Simantiraki M.G., Siontorou C.G and Toth K,
Flow Injection Analysis of Carbofuran in Foods Using Air Stable Lipid Film Based Acetylcholinesterase Biosensor, *Anal. Chim. Acta*, vol. 537, 2005, pp. 169-177.
152. Nikolelis D.P. and Siontorou C.G.,
Bilayer Lipid Membranes for Flow Injection Monitoring of Acetylcholine, Urea, and Penicillin, *Anal. Chem.*, vol. 67, 1995, pp. 936-944
153. Nikolelis D.P. and Siontorou C.G,
Ammonium Ion Minisensors Form Self-Assembled Bilayer Lipid Membranes Using Gramicidin as an Ionophore. Modulation of Ammonium Selectivity by Platelet-Activating Factor, *Anal. Chem.*, vol. 68, 1996, pp. 1735-1741.
154. Nikolelis D.P, Siontorou C.G. and Andreou V.G.,
Biosensors Based on Bilayer Lipid Membranes for Automated Continuous Monitoring or Rapid Screening of Environmental Pollutants, *Lab. Robotics and Automation*, vol. 9, 1997, pp. 285-295.
155. Nikolelis D. P., Siontorou C. G., Andreou V. G and Krull U. J.,
Stabilized Bilayer-Lipid Membranes for Flow-Through Experiments, *Electroanalysis*, vol. 7, 1995, pp. 531-536
156. Nikolelis D.P., Siontorou C.G., Andreou V.G, Viras K.G. and Krull U.J,
Bilayer lipid Membranes as Electrochemical Detectors for Flow Injection Immunoanalysis, *Electroanalysis*, vol. 7, 1995, pp. 1082-1089
157. Nikolelis D.P., Simantiraki M.G., Siontorou C.G., Toth K.,
Anal. Chim. Acta 2005, 537, 169

158. Nikolelis D.P., Theoharis G,
Bioelectrochem. 2003, 59,107.
159. Nikolelis D.P., Tzanelis M.G and. Krull U.J,
Direct Electrochemical Transduction of an Immunological Reaction by
Bilayer Lipid Membranes, Anal. Chim. Acta, vol. 282, 1993, pp. 527-534
160. Nikolelis D.P., Tzanelis M.G and. Krull U.J,
The Bilayer Lipid Membrane as a Generic Electrochemical Transducer of
Hydrolytic Enzyme Reactions, Biosens.
Bioelectr., vol. 9, 1994, pp. 179-188
161. Noy A., Artyukhinb A.B., Misrac N.,
Mater. Today 2009, 12, 22
162. Nuutinen JP, Clerc C, Virta T, Tormala P
Effect of gamma, ethylene oxide, electron beam, and plasma sterilization on
the behaviour of SR-PLLA fibres in vitro.
Journal of biomaterials science. Polymer edition 2002;13(12):1325-36.
163. O'Boyle K. P., Siddiqi F. A and Tien H. T.,
Antigen-Antibody-Complement Reaction Studies on Micro Bilayer Lipid
Membranes, Immunol. Commun., vol. 13, 1984, pp. 85-103
164. Ottova A.L. and. Tien H.T,
Self-Assembled Bilayer Lipid Membranes: from Mimicking Biomembranes
to Practical Applications, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, vol. 42, 1997, pp. 141-
152.
165. Pachence JM, Kohn J.
Biodegradable polymers.
In: Lanza ... San Diego, CA: Academic Press; 2000. p 263-277

166. Palecek E., Jelen F., Teijeiro V., Fucik T. and Jovin T.,
Biopolymer-modified Electrodes in the Voltammetric Determination of
Nucleic Acids and Proteins at the Submicrogram Level, *Anal. Chim. Acta*,
vol. 273, 1993, pp. 175-186.
167. Park GE, Pattison MA, Park K, Webster TJ.
Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds.
Biomaterials. 2005 Jun;26(16):3075-82.
168. Pek Y. S., Wan A. C. A and Ying J. Y.,
"The Effect of Matrix Stiffness on Mesenchymal Stem Cell Differentiation
in a 3D Thixotropic Gel,
" *Biomaterials*, 31 (2010) 385-391
169. Petkok E, Nottelet B, Walpoth BH, Tille JC, Kalangos A,
Degradation and healing characteristics of small-diameter poly(epsilon-
caprolactone) vascular grafts in the rat systemic arterial circulation.
Circulation, American Heart Association, 2008, 118 (24), pp.2563-70
170. Petrossian A. and. Owicki J. C,
Interaction of Antibodies With Liposomes Bearing Fluorescent Haptens,
Biochim. Biophys. Acta, vol. 776, 1984, pp. 217-227.
171. Pittenger MF1, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD,
Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage
potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr
2;284(5411):143-7.
172. Plant A, Bhadriraju K, Spurlin T, Elliot J
Cell response to matrix mechanics: focus on collagen.
Biochimica et biophysica Acta 2009;1793(5):893-902.

173. Poglitsch C. L., Sumner M. T and Thompson N. L.,
Binding of IgG to MoFc.gamma.RII Purified and Reconstituted into
Supported Planar Membranes as Measured by Total Internal Reflection
Fluorescence Microscopy,
Biochemistry, vol. 30, 1991, pp. 6662-6671.
174. Rai M1, Yadav A, Gade A.
Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials.
Biotechnol Adv. 2009 Jan-Feb;27(1):76-83.
175. Ram M.K., Adami M., Paddeu S., Nicolini C,
Nanotechnology 2000, 11, 112
176. Ram M. K., Bertoncello P, Ding H., Paddeu S., Nicolini C.,
Biosens. Bioelectron. 2001, 16, 849
177. Rezwan K., Chen Q.Z., Blaker J.J, Boccaccini Aldo Roberto
Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds
for bone tissue engineering Biomaterials Volume 27, Issue 18, Pages 3413-
3431 (June 2006)
178. Rohman Géraldine, Pettit Jennifer J., Isaure Françoise, Cameron Neil R.,
Southgate Jennifer
Influence of the physical properties of two-dimensional polyester substrates
on the growth of normal human urothelial and urinary smooth muscle cells
in vitro
Biomaterials Volume 28, Issue 14, May 2007, Pages 2264–2274
179. Rosa C., Pariente F., Hernandez L. and Lorenzo E.,
Amperometric Flow-Through Biosensor for the Determination of
Pesticides, Anal. Chim. Acta, vol. 308, 1995, pp. 129-136
180. Rozema F. R., Bos R. R. M., Boering G., van Asten J. A. A. M., Nijenhuis

A. J and. Pennings A. J

The effects of different steam-sterilization programs on material properties of poly(L-lactide)

Journal of Applied Biomaterials 2 (2009)

181. Sadaf J. R., Israr M. Q., Kishwar S, Nur O., Willander M.,
Nanoscale Res. Lett. 2010, 5, 957.
182. Saini K. and Bhandari B.,
An improved Method to do Dot Blot Analysis,
Anal. Biochem., vol. 222, 1994, pp. 293-294
183. Sasso S., Pierce R., Walla R, and Yacynych M.,
Electropolymerized 1,2-Diaminobenzene as a Means to Prevent
Interferences and Fouling and to Stabilize Immobilized Enzyme in
Electrochemical Biosensors,
Anal. Chem., vol. 62, 1990, pp. 1111-1117
184. Schultz J.S.,
Sensitivity and Dynamics of Bioreceptor-Based Biosensors,
Ann. N Y Acad Sci., vol. 506, 1987, pp. 406-414
185. Shi X F, Hudson J L, Spicer P P, Tour J M, Krishnamoorti R, Mikos A G
Rheological Behaviour and Mechanical Characterization of Injectable
Poly(Propylene Fumarate)/Single-Walled Carbon Nanotube Composites for
Bone Tissue Engineering
Nanotechnology (2005) 16: S531-S538.
186. Shin H, Jo S, Mikos A.
Biomimetic materials for tissue engineering
Biomaterials 24 (2003) 4353–436
187. Singer S. J and. Nicholson G.L,

The Fluid Mosaic Model,
Sci., 1972, vol. 175, pp. 720-731

188. Singh S. P., Chaubey A., Malhotra B. D.,
Anal. Chim. Acta
2004, 502, 229.
189. Singh S., Solanki P. R., Pandey M. K., Malhotra B. D.,
Sens.Actuators B 2006, 115, 534
190. Siontorou C.G., Andreou V.G., Nikolelis D.P. and Krull U.J.,
Flow Injection Monitoring of Aflatoxin M-1 in Cheese Using Filter-
Supported Bilayer Lipid Membranes with Incorporated DNA,
Electroanalysis, vol. 12, 2000, pp. 747-751.
191. Siontorou C.G., Nikolelis D. P., Krull U. J,
Anal. Chem. 2000, 72, 180
192. Siontorou C.G., Nikolelis D.P., Krull UJ, , and Chianq K.L.,
A Triazine Herbicide Minisensor Based on Surface-Stabilized Bilayer Lipid
Membranes,
Anal. Chem., vol. 69, 1997, pp. 3109-3114
193. Siontorou C.G., Nikolelis D.P, Miernik A. and Krull U.J.,
Rapid Methods for Detection of Aflatoxin M1 Based on Electrochemical
Transduction by Self-Assembled Metal-Supported Bilayer Lipid
Membranes (s-BLMs) and on Interferences with Transduction of DNA
Hybridization, Electrochim. Acta, vol. 43, 1998, pp. 3611-3617.
194. Sitharaman B., Shi X., Tran L.A., Spicer P.P., Rusakova I., Wilson L.J., and
Mikos A.G.,
"Injectable In Situ Crosslinkable Nanocomposites of Biodegradable
Polymers and Carbon Nanostructures for Bone Tissue Engineering,

- " J. Biomater. Sci., Polym. Ed., 18, 655-671 (2007
195. Skladal P.,
Biosensors Based on Cholinesterase for Detection of Pesticides, Food Technol.
Biotechnol., vol. 34, 1996, pp. 43-49
 196. Skoog D. and West D.,
Fundamentals of Analytical Chemistry, 4 ed., Holt-Saunders Int. Ed.,
Tokyo, Japan, 1982.
 197. Smith IO, Liu XH, Smith LA and Ma PX.
Nano-structured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative
medicine,
Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine, 1: 226-236 (2009)
 198. Smyth M. and Vos J., eds.,
Electrochemistry, Sensors and Analysis, Elsevier Science Publishers,
Amsterdam, 1987
 199. Stieglitz T, Rubehn B, Henle C, Kisban S, Herwik S, Ruther P, Schuettler
M (2009):
"Brain-computer interfaces: an overview of the hardware to record neural
signals from the cortex".
In: Progress in Brain Research – Chapter 20, Vol.175, pp. 297-315
 200. Striebel Ch., Brecht A. and Gauglitz G.,
Characterization of Biomembranes by Spectraellipsometry, Surface Plasmon
Resonance and Interferometry with Regard to Biosensor Application,
Biosens. Bioelectr., vol. 9, 1994, pp. 139-146.
 201. Su Yan, Li Xiaoqiang, Tan Lianjiang, Huang Chen, Mo Xiumei
Poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers for encapsulating
and sustained releasing proteins

Polymer Volume 50, Issue 17, 4151-4280

202. Sugawara M., Kojima K., Sazawa H. and Umezawa Y.,
Ion-Channel Sensors,
Anal. Chem., vol. 59, 1987, pp. 2842-2846.

203. Sun B1, Ranganathan B, Feng SS.
Multifunctional poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite
(PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted
chemotherapy of breast cancer.
Biomaterials. 2008 Feb;29(4):475-86

204. Sutherland R. M., Dahne C., Place J. F. and Ringrose A. S,
Optical Detection of Antibody-Antigen Reactions at a Glass-Liquid
Interface,
Clin. Chem., vol. 30, 1984, pp. 1533-1528

205. Suzuki H., Arakawa H., Karube I.,
Biosens. Bioelectron. 2001, 16, 725

206. Szafran M., Kowalczyk I. and Katrusiak A.,
Crystal and Molecular Structure of 3-(2-amino-pyridinium)-Propionate
Monohydrate,
J. Molec. Struct., vol. 786, 2006, pp. 25-32.

207. Takai N., Sakuma I., Fukui Y., Kaneko A., Fujie T., Taquchi K., Naqaoka
S., Studies of the Development of Optical Fiber Sensors for Biochemical
Analysis, Artif. Organs, vol. 15 1991, pp. 86-89.

208. Tamiya Y., Sugiura Y., Akiyama A., Karube I.,
Ann. N.Y.
Acad. Sci. 1990, 613, 39622

209. Teo W.E., Ramakrishna S. (2009)

Electrospun nanofibers as a platform for multifunctional, hierarchically organized Nanocomposite.

Composites Science and Technology vol. 69 pg. 1804-1817.

210. Thompson M. and Krull U.J.,
Biosensors and Bioprobes,
Trends Anal. Chem., vol. 3, 1984, pp. 173-178.
211. Thomson M., Krull U.J. and Worsfold P.J,
The Analytical Potential of Chemoreception at Bilayer Lipid Membranes,
Anal. Chim. Acta, vol. 117, 1980, pp. 121-132.
212. Topoglidis E., Palomares E, Astuti Y., Green A, Campbell C.J., Durrant
J.R,
Electroanalysis 2005, 17, 1035
213. Toncev G., Milicic B., Toncev S., Samardzic G.,
Eur. J. Neurology 2002, 9 (3), 221
214. Toro-Goyco E., Rodriguez A. and Del Castillo J.,
Detection of Anti-insulin Antibodies With a New Electrical Technique: Lipid
Membrane Conductometry,
Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 23, 1966, pp. 341-346.
215. Townshed A., Ed.;
Encyclopedia of Analytical Chemistry; Academic Press Limited: London,
1995; Vol. 4, p 2520 and Vol. 9, p 5
216. C. Tran-Minh,
Immobilized Enzyme Probes for Determining Inhibitors, Ion Select. Electr.
Rev., vol. 7, 1985, pp. 41-75.
217. Tran- Minh C. and Beaux J.,

Enzyme Electrodes for Inhibitors Determination: Urease-Fluoride System,
Anal. Chem., vol. 51, 1979, pp. 91-95.

218. Usman Ali S.M., Alvi N.H., Ibupoto Z, Nur O., Willander M., Danielsson B.,
Sens. Actuators B 2011, 152, 241
219. Vafaei M., Youbashizade H,
Mater. Sci. Forum 2007, 553, 252.
220. Vchiyama S., Sakamoto H.,
Talanta 1997, 44, 1435
221. Venugopal J, Low S, Choon AT, Kumar AB, Ramakrishna S.
Electrospun-modified nanofibrous scaffolds for the mineralization of
osteoblast cells.
J Biomed Mater Res A. 2008 May;85(2):408-17.
222. Vreeke M., Rocca P. and Heller A.,
Direct Electrical Detection of Dissolved Biotinylated Horseradish, Biotin
and Avidin, Anal.Chem, vol. 67, 1995, pp. 303-306.
223. Wang D.H, Kou R., Gil M.P., Jakobson H.P., Tang J., Yu D.H., Lu Y.F,
J. Nanosci. Nanotechnol. 2005, 11, 1904
224. Wang H. Y., Mu S. L.,
Sens. Actuators B, Chem. 1999, 56, 22
225. Wang Joseph
In vivo glucose monitoring: Towards 'Sense and Act' feedback-loop
individualized medical systems Talanta
Volume 75, Issue 3, Pages 636-641 (15 May 2008)
Special Section: Remote Sensing

226. Wang J.X., Sun X.W., Wei A., Lei Y., Cai X.P., Li C.M., Dong Z.L,
Appl. Phys. Lett. 2006, 88, 233106
227. Weaver J. C, Cooney C.L., Fulton S.P., Schuler P. and. Tannabaum S.R,
Experiments and Calculations Concerning a Thermal Enzyme Probe,
Biochim. Biophys. Acta, vol. 452, 1976, pp. 285-291.
228. Weber S.,
Internal Volume of Competitive Binding Biosensors Controls Sensitivity:
Equilibrium Theory, Anal. Chem., vol. 64, 1992, pp. 330-332
229. Wei G, Ma PX
scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2004 Aug;25(19):4749-
57
230. Wen X, Tresco Patrick A.
Effect of filament diameter and extracellular matrix molecule precoating on
neurite outgrowth and Schwann cell behavior on multifilament entubulation
bridging device in vitro
Journal of Biomedical Materials Research Part A
231. Winter G. and Milstein C.,
Man-Made Antibodies, Nature, vol. 349, 1991, pp. 293-299
232. Wootton I.D.P., Freeman H.,
Microanalysis in Medical Biochemistry. 6th ed. New York: Churchill
Livingstone, 1982
233. Xiao C., Chu X., Yang Y., Li X., Zhang X.,
J. Chen, Biosens. Bioelectron. 2011, 26, 2934
234. Yager P.,
Functional Reconstitution of a Membrane Protein in a Diacetylenic

Polymerizable Lecithin,
Biosensors, vol.2, 1986, pp. 363-373

235. Yang Cui, Yi Liu , Yi Cui , Xiabin Jing , Peibiao Zhang , Xuesi Chen
The nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide)
and hydroxyapatite surface-grafted with L-lactic acid oligomer for bone
repair
Acta Biomaterialia 5 (2009) 2680–2692
236. Yang Fang,. Both Sanne K, Yang Xuechao, Walboomers X. Frank, Jansen
John A.
Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for
GTR/GBR application
Acta Biomaterialia Volume 5, Issue 9, Pages 3295-3304(November 2009)
237. Yao, A.G. Vlessidis, N.P. Evmiridis,
Anal. Chim. Acta 2003, 478, 23
238. Yeagle P., ed.,
The Structure of Biological Membranes, CRC Press, 1992
239. Yogeswaran U.,. Chen S.M.,
Sensors 2008, 8, 290.
240. Zhang F., Wang X., Ai S., Sun Z., Wan Q., Zhu Z.,. Xian Y.,. Jin L,
Yamamoto K.,
Anal. Chim. Acta 2004, 519, 155.
241. Zhang F. F., Wang X. L., Ai S. Y., Sun Z. D., Wan Q.,
Zhu Z. Q., Xian Y. Z, Jin L. T., Yamamoto K.,
Anal. Chim. Acta, 2009, 178-198
242. Zhang H.,. Yang D, Li S., Ma X., Ji Y., Xu J., and Qu D.,

- Mater. Lett. 2005, 59, 1696
243. Zhang R. and Ma P. X.,
in A. Atala and R. Lanza, eds., *Methods of Tissue Engineering*, Academic Press, San Diego, Calif., 2001, pp. 715–724
244. Zhang R, Ma PX.
Degradation behavior of porous poly(α -hydroxy acids)/ hydroxyapatite composite scaffolds.
Polymer Preprints. 2000;41(2):1618–1619
245. Zhao C., Wan L, Wang Q., Liu S., Jiao K.,
Anal. Sci. 2009, 25, 1013
246. Zhao S. and Lennox R,
Pyrroloquinolinequinone Enzyme Electrode Based on the Coupling of Methanol Dehydrogenase to a Tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane Electrode.
Anal. Chem., vol. 63, 1991, pp. 1174-1178
247. Zheng, S. Wu, X. Lin, L. Nie, L. Rui,
Electroanalysis 2001, 13, 1351.
248. Ι. Γεωργιάτσου, Βιοχημεία, 6η έκδ., Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, 1989
249. Χ. Σιοντόρου, Κατασκευή Βιοαισθητήρων που Στηρίζονται σε Σταθεροποιημένες Διστρωματικές Λιπιδικές Μεμβράνες, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2000.

Δ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

AA	ασκορβικό οξύ
BLM	Bilayer Lipid Membrane
GMOs	Genetically Engineered Microorganisms
RP	Resting potential –ισσοροπία δυναμικού
CTAB	Κατιονικό επιφανειοδραστικό βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο
ChOx	οξειδάσης της χοληστερόλης
ConA	κονκαβαλίνη A
IARC	International Agency For Research on Cancer
MIN	minutes
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EHI	Εκλεκτικών Ηλεκτροδίων Ιόντων
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη
IEP	ισοηλεκτρικό σημείο
PCBs	Polychlorinated Biphenyls
DPPC	Διπαλμιτοϋλική φωσφατιδυλοχολίνη
DPPA	Διπαλμιτουλφωσφατιδικό οξύ
LRTEM	Χαμηλής ανάλυσης ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
GL	Γλυκόζη
GFF	Φίλτρο υαλωδών ινών
RIA	Radioimmunoassay
RPM	Rotation Per Minute
RSD	Relative Standar Deviation
SD	Standar Deviation
SEM	Scanning Electron Microscopy
AIBN	Αζωδισοβούτυρονιτρίλιο
POCT	Point Of Care Testing

WS	Water Solubility
DSC	Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης
ΔΛΜ	Διστρωματική Λιπιδική Μεμβράνη
EHI	Εκλεκτικά Ηλεκτρόδια Ιόντων
PLA	πολυ (γαλακτικό) οξύ
PCL	πολυ (καπρολακτόνη
PGA	πολυ(γλυκολικό) οξύ
PHB	πολυ (υδροξυλβουτιρικό)
HA	υδροξυαπατίτης
MWCNTs	Μήτρες από νανοσωλήνες πολλαπλών φύλλων γραφενίου
TIPS	thermally induced phase separation
MSCs	Μεσεγχυματικά κύτταρα
MEMS	Μικρο-ηλεκτρομηχανικοί αισθητήρες
PEG	πολυαιθυλενικής γλυκόλη
ETO	οξείδιο του αιθυλενίου
POCT	Point Of Care Testing
PPF	πολυπροπυλένιο
SAED	Περίθλαση ηλεκτρονίων επιλεγμένης περιοχής
HMΣ	Ηλεκτρονικής Μικροσκοπία Σάρωσης
UR	ουρία
ZnO	Οξειδίου του Ψευδαργύρου

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

- Σχήμα 1 Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρα
- Σχήμα 2 Κυτταρική μεμβράνη σε τρισδιάστατη απεικόνιση που περιλαμβάνει την λιπιδική διπλοστοιβάδα και πρωτεΐνες
- Σχήμα 3: Σχηματική δομή της κυτταρικής μεμβράνης με τα τέσσερα είδη πρωτεϊνών και τη διπλοστοιβάδα των φωσφολιπιδίων
- Σχήμα 4 Σχηματική απεικόνιση της διστρωματικής λιπιδικής μεμβράνης με τις πολικές κεφαλές προς το υδάτινο εξωκυττάριο περιβάλλον και τις μη πολικές κεφαλές προσανατολισμένες μεταξύ τους στο υδρόφοβο εσωτερικό της μεμβράνης
- Σχήμα 5 Κανάλια ιόντων τα οποία ελέγχουν τη ροή ιόντων διαμέσου της διπλοστοιβάδας της λιπιδικής μεμβράνης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΧΡΗΣΗ ΔΙΣΤΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

- Σχήμα 6 Σχηματισμός "μελανών" ΔΛΜ με την μέθοδο ψήκτρας
- Σκαφίδιο Langmuir-Blodget
- Σχήμα 7
- Σχήμα 8 Σχηματική απεικόνιση λιποσώματος (σφαιρική διστρωματική λιπιδική μεμβράνη)
- Σχήμα 9 Σχηματική αναπαράσταση ακινητοποίησης λιπιδίου σε επιφάνεια φίλτρου με πολυμερισμό (σχηματισμός σταθεροποιημένης λιπιδικής μεμβράνης). μεμβράνης
- Σχήμα 10 Ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα ΔΛΜ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

- Σχήμα 11 Σημασία της βιοδιάσπασης σε βιοϊατρικές εφαρμογές

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

- Σχήμα 12 A) Σχήμα-Δομή του βιοαισθητήρα
B) Σχηματικό διάγραμμα της ροής κατασκευής του νανοβιοαισθητήρα χοληστερόλης σε λιπιδική μεμβράνη
- Σχήμα 13 Πανοραμική άποψη, μικροσκοπικής σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM,) νανοτοιχωμάτων οξειδίου του ψευδαργύρου
- Σχήμα 14 Σχηματική διάταξη της λειτουργίας του ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα χοληστερόλης
- Σχήμα 15 Καμπύλες ηλεκτροχημικής βαθμονόμησης σε επαναλαμβανόμενα πειράματα χρησιμοποιώντας τον ίδιο βιοαισθητήρα χοληστερόλης
- Σχήμα 16 Διακύμανση της ηλεκτρεγερτικής δύναμης ανάλογα των τιμών του pH του διαλύματος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

- Σχήμα 17 A) Σχηματική διάταξη της λειτουργίας του ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα ουρικού οξέος
B) Σχηματικό διάγραμμα της ροής κατασκευής του νανοβιοαισθητήρα ουρικού οξέος σε λιπιδική μεμβράνη
- Σχήμα 18 Χρόνος απόκρισης του βιοαισθητήρα του ουρικού οξέος σε 100μM διαλύματος ουρικού οξέος.
- Σχήμα 19 Καμπύλες βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα του ουρικού οξέος (α) σε μεμβράνη (β) με ενσωματωμένο λιπίδιο
- Σχήμα 20 Καμπύλες βαθμονόμησης από τρία διαφορετικά πειράματα με τη χρήση του ίδιου ηλεκτροδίου –αισθητήρα και χρήση Ag/AgCl ως ηλεκτροδίου αναφοράς

- Σχήμα 21 Βαθμός απόκρισης του αισθητήρα σε σχέση (α) με το pH του περιβάλλοντος και (β) με τη θερμοκρασία
- Σχήμα 22 Ληφθείσες καταγραφές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων με μέθοδο FIA, στις οποίες απεικονίζεται η αύξηση του σήματος ανάλογα των κάτωθι συγκεντρώσεων: 1.00μM, 5.00μM, 10.0μM, 50.0μM, 100μM και 1000μM

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1	Κατηγορίες βιοαισθητήρων
Πίνακας 2	Τομείς εφαρμογής βιοαισθητήρων
Πίνακας 3	Υλικά Σχηματισμού Λιπιδικών Μεμβρανών
Πίνακας 4	Ιδιότητες βιοδιασπώμενων πολυμερών χρησιμοποιούμενων ως ικρίωματα
Πίνακας 5	Μέτρηση επιπέδων χοληστερόλης σε πραγματικά δείγματα ορού αίματος
Πίνακας 6	Σύγκριση της παρούσας μελέτης (βιοαισθητήρα ουρικού οξέος) με αντίστοιχες στη βιβλιογραφία

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

