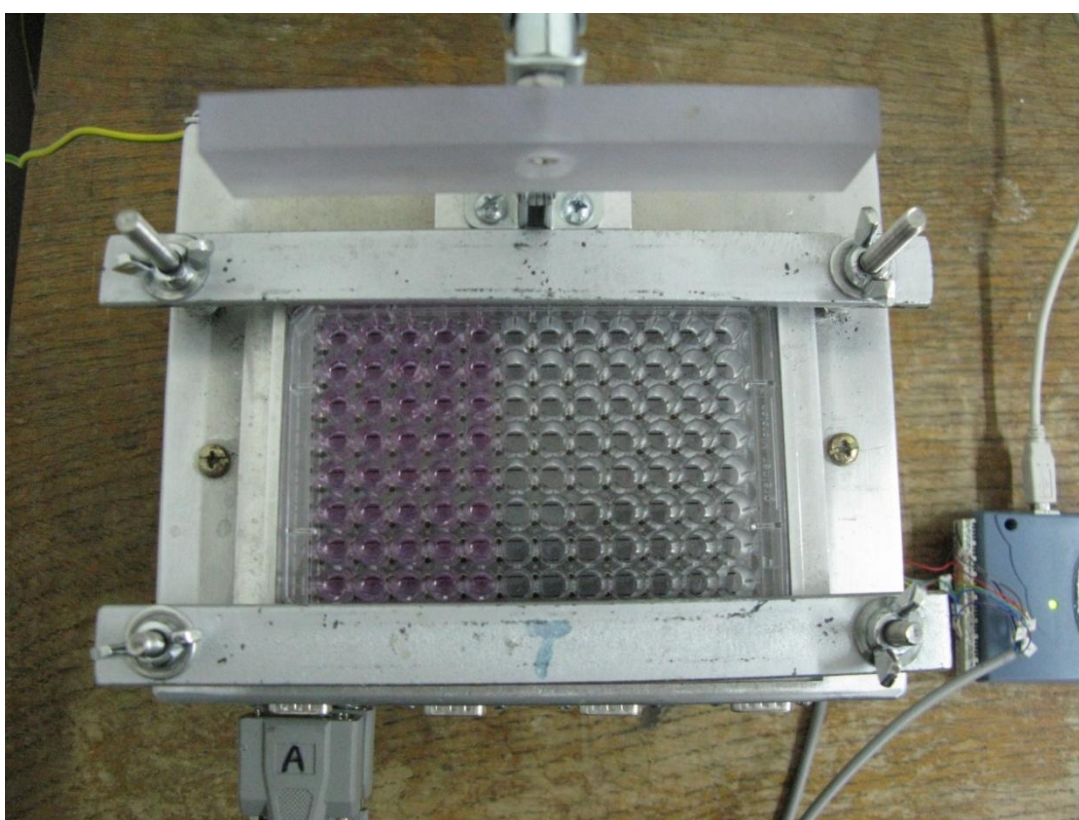


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΩΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ
ΠΜΣ «ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

Ανάπτυξη κυτταρικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση βαρέων μετάλλων



ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

του μεταπτυχιακού φοιτητή Ρούτσιου Δημήτριου

Πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών
υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σ. Κίντζιου.

Αθήνα 2012

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«Ανάπτυξη κυτταρικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση βαρέων
μετάλλων »**

Ρούτσιος Δημήτριος

Αθηνά 2012

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κίντζιος Σπυρίδων, Καθηγητής

Επιβλέπων

Μπουράνης Δημήτριος, Καθηγητής

Μέλος

Λάμπρου Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μέλος

*“ Στον αδερφό μου Κωστή,
στον παππού μου Κωνσταντίνο,
στη συζυγό μου Βικτώρια
και σε όλους τους καλούς μου φίλους”*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το θέμα της παρούσας πτυχιακής εργασίας μου ανέθεσε ο καθηγητής μου Δρ. Σπυρίδων Κίντζιος, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά τόσο για το γεγονός ότι με δέχτηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Και Μορφολογίας Φυτών του Γ.Π.Α., όσο και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την άψογη συνεργασία που είχαμε καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της μελέτης.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους καθηγητές του Γ.Π.Α. Δρ. Δημήτριου Μπουράνη και Δρ. Νικόλαου Λάμπρου για τη συμμετοχή τους στη συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή της μελέτης μου.

Επίσης, ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Και Μορφολογίας Φυτών για τις πολύτιμες συμβουλές τους και το ενδιαφέρον που έδειξαν για τη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ τους καλούς μου φίλους και συμφοιτητές Γιώργο Τσανικλίδη και Κώστα Σκαρμούτσο, καθώς και τον Γιώργο Κατοίκο για την άριστη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACh:	Ακετυλοχολίνη
AChE:	Ακετυλοχολινεστεράση
AChR:	Υποδοχέας της ακετυλοχολίνης
BERA:	Βιοηλεκτρική Μέθοδος Αναγνώρισης
CBBs:	Κυτταρικοί βιοαισθητήρες
DMEM:	Θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας ζωικών κυττάρων
ENFET:	Ενζυμικά – επαγόμενο FET
FETs:	Βιοαισθητήρες επαγόμενου πεδίου
GABA:	γ - αμινο βουτυρικό οξύ
ISEs:	Επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων
ISFET:	Ιόν – εκλεκτικό FET
NTs:	Νευροδιαβιβαστές

Περίληψη

Τα βαρέα μέταλλα είναι φυσικά παρόντα στα πετρώματα και τα μεταλλεύματα και γι' αυτό εμφανίζονται πάντα στο έδαφος, τα ιζήματα, τα προϊόντα και σε ζωντανούς οργανισμούς. Η υπερβολική, ασυνήθιστη συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων σε ιδιαίτερα μέσα οδηγεί σε μόλυνση και κατά συνέπεια απαιτούνται αξιόπιστες μέθοδοι για την ανίχνευσή τους.

Τα μέταλλα - σε αντίθεση με τις περισσότερες τοξικές οργανικές ενώσεις - δεν αποικοδομούνται, και γι' αυτό συσσωρεύονται στο περιβάλλον. Τελικά, ένα μέρος αυτών καταλήγει με τη βιολογική τροφική αλυσίδα στον άνθρωπο, στον οποίο προκαλούν χρόνιες ή οξείες βλάβες. Αυτά λόγω της εκτεταμένης χρήσης τους συναντώνται συχνά σε πολλές κατηγορίες τροφίμων και ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους έχει περιοριστεί στη χρήση κλασικών τεχνικών της αναλυτικής χημείας, όπως χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών. Παρόλο που οι μέθοδοι αυτοί παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία, είναι χρονοβόρες και απαιτούν την παρουσία εξειδικευμένου και έμπειρου προσωπικού, όπως επίσης και την χρήση υψηλού κόστους εξοπλισμού. Επιπλέον, δεν έχουν την ικανότητα διεξαγωγής αναλύσεων τοξικών ουσιών επί τόπου και σε πραγματικό χρόνο.

Σ' αυτή τη μελέτη αναπτύχθηκε μια καινοτόμος διάταξη κυτταρικού βιοαισθητήρα, για την ανίχνευση βαρέων μετάλλων στο νερό, βασιζόμενη στη μέτρηση των αλλαγών του μεμβρανικού δυναμικού ακινητοποιημένων κυττάρων, σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας της μεθόδου βιοηλεκτρικής αναγνώρισης BERA (Bioelectric Recognition Assay). Τα κύτταρα ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου (1η μέθοδος) και σε πλακίδια με αγαρόζη (2η μέθοδος), προκειμένου να διατηρηθούν οι φυσιολογικές τους λειτουργίες.

Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές: N2a (καρκινικά κύτταρα νευροβλαστώματος), Vero (νεφρικά κύτταρα πράσινου πιθήκου) και φυτικά κύτταρα (πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού *Nicotiana tabacum*). Συνολικά μελετήθηκε η απόκριση των κυτταρικών βιοαισθητήρων σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις, (1ppm, 500ppb, 100ppb, 10ppb και 1ppb), δύο βαρέων μετάλλων, του μόλυβδου (Pb) και του κάδμιου (Cd).

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

Abstract

Heavy metals are present naturally in rocks and minerals and therefore always occur in soil, sediment, and products as well as in living organisms. The excessive, unusual concentration of heavy metals in particular leads to contamination and therefore requires reliable methods for their detection.

Metals - in contrast to the more toxic organic compounds – are not degraded, and thus accumulate in the environment. Because of their extensive use they are often found in many food categories, but conventional methods of analysis, chromatographic and spectroscopic techniques, are sufficiently sensitive but time consuming, and require the presence of specialized and experienced personnel, as well as the use of highly expensive equipment. These standard analysis methods do not have the ability to detect toxic substances in real time.

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

Three different kind of cells have been used; N2a (neuroblastoma cancer cells), Vero (kidney cells from green monkey) and plant cells (protoplasts from leaves of *Nicotiana tabacum*). This study presents the response of the cellular biosensors to five different concentrations, (1ppm, 500 ppb, 100ppb, 10ppb, 1ppb), two heavy metals, lead (Pb) and cadmium (Cd)

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Κεφάλαιο 1: Βιοαισθητήρες και ο ρόλος τους στην βιοτεχνολογία

1.1 Εισαγωγή στους αισθητήρες	1
1.2 Χημικοί αισθητήρες.....	4
1.3 Εισαγωγή στους βιοαισθητήρες	6
1.3.1 Ορισμός-Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων	6
1.3.2 Ταξινόμηση βιοαισθητήρων	9
1.3.3 Χαρακτηριστικά βιοαισθητήρων	17
1.3.4 Πλεονεκτήματα βιοαισθητήρων	21
1.3.5 Εφαρμογές των βιοαισθητήρων.....	23
1.4 Κυτταρικοί βιοαισθητήρες.....	26
1.4.1 Σχεδιασμός κυτταρικού βιοαισθητήρα	29
1.4.2 Ηλεκτροφυσιολογικές μέθοδοι μέτρησης-Εφαρμογές	33
1.4.3 Μέθοδος Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης, BERA	35
1.4.4 Γενιές κυτταρικών βιοαισθητήρων.....	36
1.4.5 Θεωρία κυτταρικής λειτουργίας και απόκρισης.....	36
1.4.5.1 Μετάδοση σημάτων στους κυτταρικούς βιοαισθητήρες- Ιοντικά Κανάλια .	42
1.4.5.2 Νευροδιαβιβαστές (Neurotransmitters, NTs)	46
1.4.5.3 Ακετυλοχολίνη και ακετυλοχολινεστεράση	47
1.4.5.4 Υποδοχέας της ακετυλοχολίνης	49
1.4.6 Βελτίωση κυτταρικών βιοαισθητήρων	50
1.4.7 Ανίχνευση τοξικών ουσιών με τη χρήση κυτταρικών βιοαισθητήρων	51

Κεφάλαιο 2: Βαρέα Μέταλλα

2.1 Εισαγωγή στα βαρέα μέταλλα	53
2.2 Πηγές βαρέων μετάλλων	54
2.3 Τοξικότητα βαρέων μετάλλων	55

2.3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα των βαρέων μετάλλων	57
2.4 Χαρακτηριστικά βαρέων μετάλλων	57
2.5 Βαρέα μέταλλα τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία	65
2.5.1 Μόλυβδος (Pb)	65
2.5.2 Κάδμιο (Cd).....	75
2.6 Βαρέα μέταλλα και επιπτώσεις στην υγεία	81
2.6.1 Χημικοί επιμολυντές στην τροφική αλυσίδα	81
2.6.2 Υδάτινα συστήματα και επιπτώσεις στον οργανισμό	83
2.6.3 Επαγγελματική έκθεση:Επιπτώσεις στη νοσηρότητα και στη θνησιμότητα.....	85

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 3: Υλικά και μέθοδοι

3.1 Βαρέα μέταλλα.....	87
3.2 Βιολογικό υλικό	87
3.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός	88
3.4 Κατασκευή κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5ης γενιάς.....	88
3.4.1 Βιοαισθητήρες με τη μορφή σφαιριδίου	88
3.4.2 Βιοαισθητήρες σε πλακίδιο ELISA	89
3.5 Διάταξη κυτταρικού βιοαισθητήρα.....	90
3.5.1 Βιοαισθητήρας με τη μορφή σφαιριδίου	90
3.5.2 Βιοαισθητήρας σε πλακίδιο ELISA.....	91
3.6 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων βαρέων μετάλλων	92
3.7 Μέθοδοι ανάλυσης δειγμάτων.....	93
3.7.1 Βιοαισθητήρας με τη μορφή σφαιριδίου	93
3.7.2 Βιοαισθητήρας σε πλακίδιο ELISA.....	93

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

4.1 Απόκριση κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA στα προς ανάλυση δείγματα.....	94
4.1.1 Αποτελέσματα απόκρισης κυτταρικών βιοαισθητήρων 5 ^{ης} γενιάς με τη μορφή σφαιριδίου(κύτταρα N2a, Vero και πρωτοπλάστε από φύλλα καπνού)	94
4.2.1 Αποτελέσματα απόκρισης κυτταρικών βιοαισθητήρων 5ης γενιάς σε πλακίδιο ELISA (κύτταρα N2a, Vero και πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού).....	99

Κεφάλαιο 5: Συζήτηση

5.1 Σκοπός – Συμπεράσματα	103
---------------------------------	-----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	109
---------------------------	-----

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

1.1. Εισαγωγή στους αισθητήρες

Η είσοδος στον 21^ο αιώνα σηματοδοτεί την είσοδο στην "εποχή της πληροφορίας". Η εμφάνιση νέων δυνατοτήτων ταυτόχρονου χειρισμού πολυάριθμων πηγών πληροφοριών, καθώς επίσης και εφαρμογής ιδιαίτερα αποτελεσματικών μεθόδων ταξινόμησης και ανάκτησης δεδομένων, δημιούργησαν νέες απαιτήσεις, στις ήδη υπάρχουσες μεθόδους άντλησης και επεξεργασίας πληροφοριών. Τη σημερινή εποχή, πλέον, είναι δυνατή η χρήση συστημάτων αντίληψης και μέτρησης, των λεγόμενων αισθητήρων, ικανών να μετρήσουν φυσικά μεγέθη, όπως θερμοκρασία, πίεση, ηλεκτρικό δυναμικό, ένταση φωτός, ιξώδες. Οι φυσικοί αισθητήρες, όπως αυτοί που απαντώνται στους ζωντανούς οργανισμούς, συνήθως αποκρίνονται σε ερεθίσματα ηλεκτροχημικού χαρακτήρα, δηλαδή η λειτουργία τους βασίζεται στη μεταφορά ιόντων, όπως συμβαίνει στις νευρικές ίνες. Οι πρώτοι αισθητήρες και όργανα μέτρησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μηχανικής φύσεως. Η συστηματική μελέτη του ηλεκτρισμού, οδήγησε στην ανάπτυξη νέων αισθητήρων, ηλεκτρικής φύσεως, οι οποίοι οδηγούσαν στην παραγωγή αναλογικού σήματος. Στους τεχνητούς αισθητήρες, η μετάδοση των πληροφοριών διεξάγεται υπό ηλεκτρική μορφή επίσης, αλλά και μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων (Fraden 2004; Taylor – Schultz 1996). Σημαντική ώθηση στην εξέλιξη των αισθητήρων έδωσε η ανάγκη εξέλιξης της τεχνολογίας, καθώς και αντιμετώπισης και επίλυσης ποικίλλων προβλημάτων της σύγχρονης έρευνας στο πεδίο των θετικών επιστημών. Οι

αισθητήρες είναι ένα από τα βασικότερα στοιχεία των σύγχρονων συστημάτων, δεδομένου ότι καθορίζουν την ποιότητα των πληροφοριών που προκύπτουν από την πραγματική ζωή και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο και τη λήψη καθοριστικών αποφάσεων. Αποτελούν ζωτικής σημασίας τμήμα των περισσότερων βιομηχανικών οργάνων, οργάνων μεταφοράς κ.α. και ο ρόλος τους στα περιβαλλοντικά συστήματα, στα συστήματα υγείας και σε άλλους τομείς, γίνεται όλο και πιο σημαντικός. Η παγκόσμια αγορά αισθητήρων αναπτύσσεται γρήγορα και ο βαθμός καινοτομίας είναι εξαιρετικά υψηλός. Οι αισθητήρες, οι οποίοι λειτουργούν με βάση τις νέες αρχές και βασίζονται στην χρήση νέων υλικών και καινοτόμων τεχνολογικών μεθόδων, είναι ακριβέστεροι, γρηγορότεροι, μικρότερου μεγέθους, χαμηλότερης ισχύος και οικονομικότεροι. Η έρευνα στη νανοτεχνολογία και στην βιοτεχνολογία θα συμβάλλει σημαντικά, στην βελτίωση των ήδη υπάρχοντων εξελιγμένων αισθητήρων και στην εμφάνιση των μελλοντικών.

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

Τα βασικά στοιχεία που απαρτίζουν ένα αισθητήρα είναι μια ενεργός επιφάνεια, (active surface), ένας μετατροπέας σήματος, (transducer) και ένα ηλεκτρονικό τμήμα. Η ενεργός επιφάνεια ενός αισθητήρα αποτελείται από το συστατικό αναγνώρισης, (recognition element), που πραγματοποιεί την ανίχνευση και το οποίο μπορεί να είναι κάποιο ακινητοποιημένο βιομόριο ή στρώμα πολυμερών. Το συστατικό αναγνώρισης είναι ένα βασικό τμήμα για κάθε αισθητήρα, καθώς ενισχύει την ικανότητα της συσκευής να αντιδράσει επιλεκτικά με κάποια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία ή με μια επιθυμητή

ομάδα συστατικών, αποφεύγοντας έτσι την ανεπιθύμητη αλληλεπίδραση με άλλα συστατικά. Ο μετατροπέας σήματος, είναι μια συσκευή που ανιχνεύει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ενεργό επιφάνεια και την προς μέτρηση ουσία και μετατρέπει την παρατηρούμενη μεταβολή, (φυσική, χημική), σε μετρήσιμο σήμα (Eggins 2002). Η μεταβολή που λαμβάνει χώρα στον μετατροπέα σήματος και που οφείλεται στην παρουσία της ενεργού επιφάνειας, εκφράζεται ως ένα συγκεκριμένο σήμα, το οποίο δύναται να συμπεριλαμβάνει μεταβολές μεγεθών, όπως είναι η σύνθετη αντίσταση, η τάση, η ένταση του φωτός, η ανάκλαση, το βάρος, η θερμοκρασία, κ.α. Ο μετατροπέας σήματος, αποτελεί το δυσκολότερο και πιο κρίσιμο τμήμα ενός αισθητήρα, καθώς η ποιότητα και η αρχή κατασκευής του καθορίζουν και τα χαρακτηριστικά του αισθητήρα. Για να γίνει δυνατή η κατασκευή ενός μετατροπέα σήματος κάποιου μακροσκοπικού μεγέθους, θα πρέπει να κατασκευαστεί μια δομή στην οποία οι μεταβολές του μακροσκοπικού μεγέθους θα μπορούν να επιφέρουν μεταβολή σε κάποιο ηλεκτρικά μετρήσιμο μέγεθος. Ένας μετατροπέας από μόνος του δεν αποτελεί μια ιδιαίτερα αξιόπιστη λύση σαν αισθητήρας, καθώς τα ηλεκτρικά σήματα τα οποία συνήθως παράγει είναι πολύ μικρής έντασης και έτσι τις περισσότερες φορές είναι δύσκολα μετρήσιμα. Σαν μια ελάχιστη διαμόρφωση θα μπορούσε να θεωρηθεί η χρήση ενός μετατροπέα μαζί με ένα μεταλλάκτη, ώστε να προκύψει ένα πιο σταθερό σήμα, κάτι το οποίο δεν είναι επίσης αρκετό, εάν ληφθούν υπόψη οι διακυμάνσεις της τάσης ή η μεταβολή της θερμοκρασίας. Ο όρος αισθητήρας πρέπει να διαχωρίζεται από τον όρο μετατροπέα. Ο μετατροπέας μετατρέπει ένα τύπο ενέργειας σε κάποιον άλλο, ενώ ο αισθητήρας μετατρέπει κάθε τύπο ενέργειας σε ηλεκτρική. Τέλος, το ηλεκτρικό τμήμα του αισθητήρα είναι υπεύθυνο για την επεξεργασία και την ενίσχυση του παραγόμενου σήματος.

Οι αισθητήρες βαθμονομούνται με εφαρμογή γνωστών φυσικών μεγεθών και καταγραφή της απόκρισης του συστήματος. Τα χαρακτηριστικά ενός αισθητήρα καθορίζουν την απόδοση του, τη σταθερότητα της λειτουργίας του και την ταχύτητα της απόκρισης του στα ερεθίσματα που δέχεται. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να είναι είτε στατικά, είτε δυναμικά. Τα στατικά χαρακτηριστικά ενός αισθητήρα καθορίζουν την απόδοση του σε μια σταθερή κατάσταση και είναι τα ακόλουθα: η πιστότητα, η ικανότητα ακρίβειας, επαναληψιμότητας, αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων, η διακριτική ικανότητα, η μονοτονικότητα της συνάρτησης μεταφοράς, η ευαισθησία στην μέτρηση και στην διαταραχή, η γραμμική απόκριση, η πλήρης κλίμακα εισόδου και

εξόδου, η υστέρηση, το εύρος, το σφάλμα μη γραμμικότητας, τα σφάλματα βαθμονόμησης και τέλος τα συστηματικά και τυχαία σφάλματα. Εκτός από τα στατικά χαρακτηριστικά, τα οποία αναφέρονται στην περίπτωση εκείνη όπου έχει επέλθει ισορροπία μεταξύ σήματος εξόδου και αισθητήρα, δηλαδή όταν τα σήματα εισόδου και εξόδου δεν μεταβάλλονται πλέον συναρτήσει του χρόνου, κάθε αισθητήρας διαθέτει και δυναμικά χαρακτηριστικά. Τα δυναμικά αυτά χαρακτηριστικά περιγράφουν την συμπεριφορά του αισθητήρα μεταξύ της χρονικής εκείνης στιγμής, κατά την οποία το σήμα εισόδου μεταβάλλεται, έως την χρονική στιγμή που το σήμα εξόδου σταθεροποιείται εκ νέου. Τα δυναμικά όπως και τα στατικά χαρακτηριστικά ισχύουν εντός κάποιου συγκεκριμένου εύρους συνθηκών λειτουργίας του αισθητήρα και εάν ο αισθητήρας βρεθεί εκτός αυτού του εύρους, τότε τα δυναμικά χαρακτηριστικά δύνανται να μεταβληθούν.

Η ταξινόμηση των αισθητήρων μπορεί να γίνει με βάση τη λειτουργία που επιτελούν, (μέτρηση πίεσης, θερμοκρασίας), τη φυσική αρχή στην οποία στηρίζεται η λειτουργία τους ή τον τύπο του μεταγωγέα σήματος που διαθέτουν, (Janata – Bezegh 1988). Βάσει της κύριας μορφής ενέργειας που μεταφέρει το σήμα τους, κατηγοριοποιούνται σε: i) μηχανικούς, ii) θερμικούς, iii) ηλεκτρικούς, iv) μαγνητικούς, v) ακτινοβολίας και vi) (βιο)χημικούς (Hulanicki et al. 1991).

1.2. Χημικοί αισθητήρες

Ένας από τους τομείς της Αναλυτικής Χημείας με ιδιαίτερη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια είναι οι χημικοί αισθητήρες. Αυτή η νέα γενιά αισθητήρων, αποτελεί μια πολύπλοκη επέκταση συστημάτων μέτρησης των φυσικών αισθητήρων. Οι χημικοί αισθητήρες ορίζονται ως συσκευές οι οποίες αντιδρούν με μια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία, με ένα συγκεκριμένο τρόπο, μέσω κάποιας χημικής αντίδρασης και χρησιμοποιούνται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της αναλυτέας αυτής ουσίας. Η ίδια η παρουσία της αναλυόμενης ουσίας στην επιφάνεια της συσκευής θα μεταφέρει ποιοτική αναλυτική πληροφορία, ενώ ο αριθμός των θέσεων που καταλαμβάνονται από μια τέτοια ουσία θα αποδώσει ένα ποσοτικό αποτέλεσμα. Τα όργανα αυτά έχουν την ικανότητα για την συνεχή και άμεση εξαγωγή των πληροφοριών

που αφορούν τη χημική σύσταση ενός δείγματος Στόχος τους είναι η αναγνώριση και η επιλογή μιας αναλυόμενης ουσίας (ή μιας ομάδας χημικών ουσιών), η οποία είναι παρούσα είτε μέσα στην αέρια είτε μέσα στην υγρή φάση πιθανότατα συνδυασμένη με μεγάλη ποικιλία άλλων ουσιών (Eggins 2002).

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

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

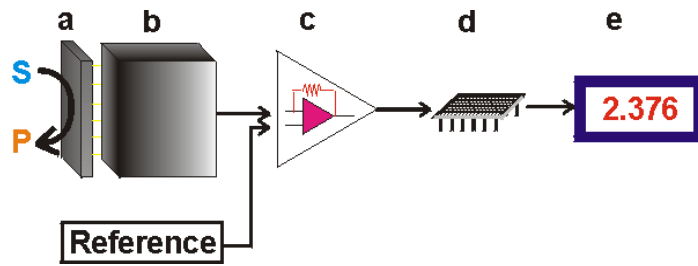
1.3. Εισαγωγή στους βιοαισθητήρες

1.3.1. Ορισμός-Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων

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

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

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

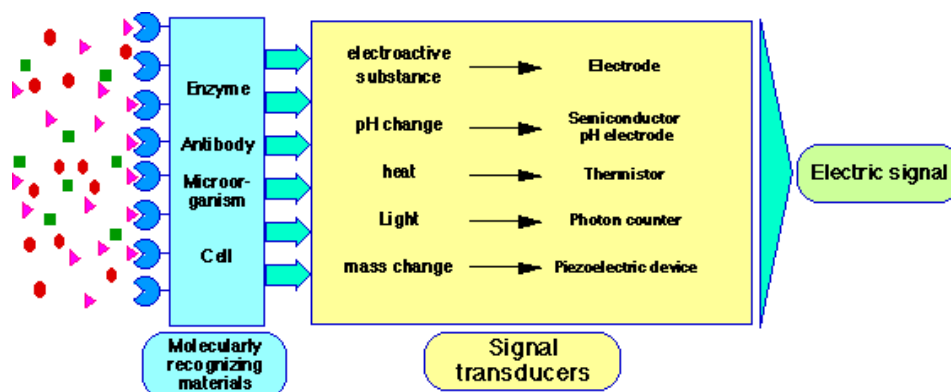


Σχηματικό διάγραμμα που παρουσιάζει τα κύρια στοιχεία ενός βιοαισθητήρα. Ο βιοκαταλύτης (α) μετατρέπει το υπόστρωμα σε προϊόν. Αυτή η αντίδραση γίνεται αντιληπτή από το μετατροπέα (β) ο οποίος τη μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα. Το εξαγόμενο ρεύμα ενισχύεται (γ) επεξεργάζεται (δ) και εμφανίζεται στην οθόνη(ε) (www.lsbu.ac.uk)

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

Οι βιοαισθητήρες είναι ευαίσθητοι σε φυσικά και χημικά ερεθίσματα και μετατρέπουν μια βιολογική απόκριση σε ηλεκτρικό σήμα, μεταδίδοντας έτσι πληροφορίες για μια ζωτική διαδικασία και για μια βιοχημική ή φυσιολογική μεταβολή. Η ικανότητα των βιολογικών μορίων να αντιδρούν με συστατικά πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων, επιτρέπει στους βιοαισθητήρες να χρησιμοποιούνται σε ποικίλες εφαρμογές, όπως είναι η ανίχνευση τοξικών και ρυπαντικών ουσιών στο νερό, στον αέρα και στο έδαφος, οι ποιοτικοί έλεγχοι τροφίμων και ο εντοπισμός μορίων ιατρικής σημασίας, όπως ορμονών, σακχάρων και πεπτιδίων υγρών του σώματος. Οι βιοαισθητήρες, επίσης, μπορούν να ανιχνεύσουν την συγκέντρωση ουσιών και άλλες παραμέτρους βιολογικού ενδιαφέροντος, χωρίς άμεση χρήση βιολογικών συστημάτων, όπως συμβαίνει στη βιομηχανία τροφίμων.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια ραγδαία αύξηση στις διαγνωστικές μεθόδους που βασίζονται σε βιοαισθητήρες που αποτελούνται από ζωντανά, άθικτα κύτταρα και σε ορισμένες περιπτώσεις ιστούς, κινητικά οργανίδια ή ακόμα και ολόκληρους οργανισμούς (Kintzios 2007). Η ικανότητα των βιοαισθητήρων να μετρούν εξειδικευμένα και με μεγάλη ευαισθησία σχεδόν οποιοδήποτε χημικό δυναμικό, πιστεύεται ότι θα οδηγήσει στην αποκλειστική τους χρήση στη βιομηχανία και στην ζωή για τους πάσης φύσεως ελέγχους. Η γενική αρχή λειτουργίας των βιοαισθητήρων, (Σχήμα 1.1), προσομοιάζει με εκείνη των κλασικών ηλεκτροδίων μέτρησης pH ή διαφοράς δυναμικού. Ο βιοαισθητήρας μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα της σύζευξης δύο κύριων τμημάτων, του βιολογικού υλικού, (bioelement), το οποίο λειτουργεί ως το ενεργό τμήμα ανίχνευσης και του μετατροπέα σήματος, (transducer). Το ενεργό τμήμα ανίχνευσης ενός βιοαισθητήρα, είναι κάποιο βιολογικό μόριο (ιστός, μικροοργανισμός, κυτταρικός υποδοχέας, ένζυμο, αντίσωμα, νουκλεϊκό οξύ), κάποιο στοιχείο βιολογικής προέλευσης ή κάποιο βιομημητικό μόριο.



Principle of Biosensors

Σχήμα 1.1 : Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων

(πηγή :www.jaist.ac.jp)

Το βιολογικό υλικό εμφανίζει εκλεκτικότητα για μια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία και έτσι είναι υπεύθυνο για την εξειδικευμένη μοριακή αναγνώριση της ουσίας αυτής και την επιλεκτικότητα της συσκευής, καθιστώντας την έτσι ένα δυναμικό εργαλείο σε περιπτώσεις όπου απαιτείται υψηλή εκλεκτικότητα. Το βιολογικό τμήμα

είναι στενά συνδεδεμένο με ένα μετατροπέα σήματος, (μεταλλάκτη). Ο μετατροπέας σήματος, είναι απαραίτητος για την μετατροπή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή (βιο)χημικής μεταβολής, που προκύπτει κατά την διαδικασία της μοριακής αναγνώρισης της ουσίας - στόχου από το βιολογικό υλικό, σε ηλεκτρικής φύσεως πληροφορία, η οποία θα συμβάλλει στην αναγνώριση κάποιου συγκεκριμένου στοιχείου ή στην ανίχνευση και στον διαχωρισμό των διαφορετικών βιοχημικών συστατικών μιας σύνθετης ουσίας, καθώς οι διαστάσεις του παραγόμενου ηλεκτρικού σήματος αντιστοιχούν στην συγκέντρωση της αναλυτέας ουσίας. Λειτουργεί με φυσικοχημικό τρόπο και συνδυάζει την εξειδίκευση και την εκλεκτικότητα του βιολογικού τμήματος με την υπολογιστική δύναμη του μικροεπεξεργαστή. Τέλος, το ηλεκτρικό τμήμα του βιοαισθητήρα λαμβάνει το σήμα από τον μετατροπέα ενέργειας, το καταγράφει και το εκφράζει υπό μορφή μετρήσεων (Mehvar – Abdi 2004).



Εικόνα 1.1: Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρα

1.3.2. Ταξινόμηση βιοαισθητήρων

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

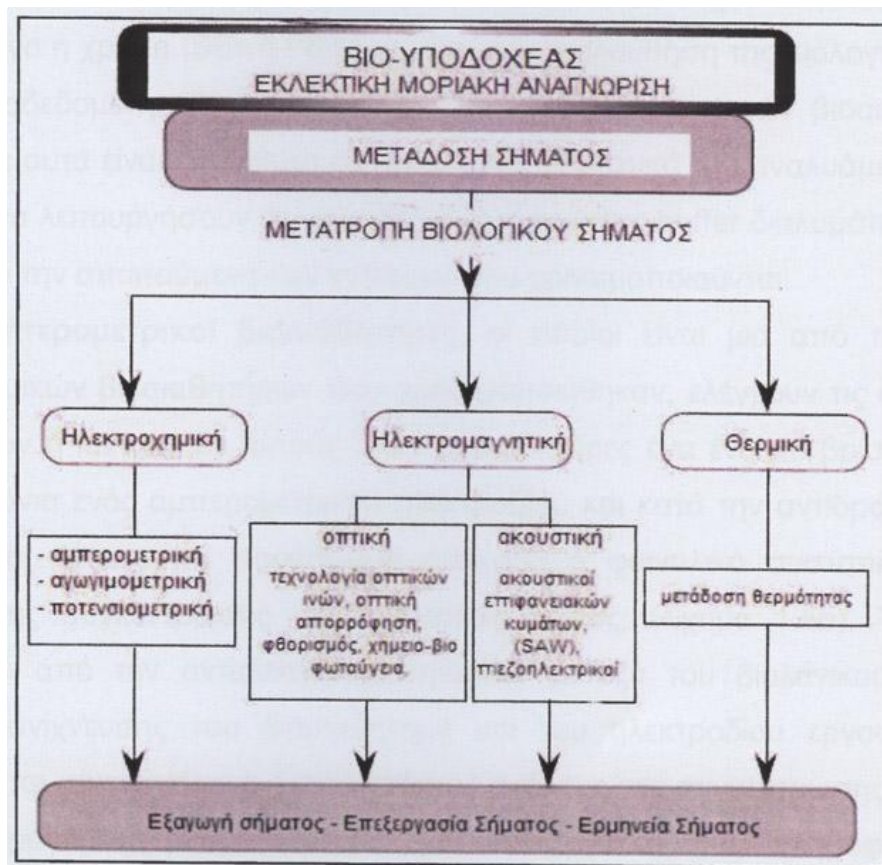
Η ταξινόμηση των βιοαισθητήρων μπορεί να γίνει με τα παρακάτω κριτήρια:

- i. Τον μετατροπέα σήματος
- ii. Το βιολογικό υλικό-αισθητήριος υποδοχέας

iii. Την τεχνική ακινητοποίησης.

i) Μετατροπέας σήματος

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



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

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

- Ποτενσιομετρικούς,
- Αμπερομετρικούς και
- Αγωγιμομετρικούς

Οι ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες, υπολογίζουν το οξειδωτικό/αναγωγικό δυναμικό μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης. Στην ποτενσιομετρία καταγράφεται το δυναμικό που διαρρέει ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος. Αυτοί οι βιοαισθητήρες κάνουν χρήση ενζύμων ακινητοποιημένων στην επιφάνεια μιας pH-ευαίσθητης συσκευής, (Keusgen 2002). Οι δύο σημαντικότεροι εκπρόσωποι των ποτενσιομετρικών αισθητήρων, είναι τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων (ISEs) και οι αισθητήρες επαγόμενου πεδίου (FETs). Οι ενζυμικές αντιδράσεις οδηγούν πολύ συχνά στην παραγωγή ιόντων και γι' αυτό το λόγο η χρήση ISEs ή FETs για την παρακολούθηση της βιολογικής αναγνώρισης είναι ευρέως διαδεδομένη. Ένας περιορισμός των ποτενσιομετρικών βιοαισθητήρων είναι ότι τα συστήματα αυτά είναι ευαίσθητα σε pH-ενεργά συστατικά του αναλυόμενου δείγματος και έτσι μπορούν να λειτουργήσουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις buffer διαλυμάτων, γεγονός όμως που δεν ωφελεί την απαιτούμενη των ενζύμων που χρησιμοποιούνται.

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι είναι μια από τις πρώτες κατηγορίες ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων που χρησιμοποιήθηκαν, ελέγχουν τις διαδικασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων ή ιόντων. Σε αυτούς τους βιοαισθητήρες ένα ένζυμο βρίσκεται ακινητοποιημένο στην επιφάνεια ενός αμπερομετρικού ηλεκτροδίου και κατά την αντίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα, (όπως για παράδειγμα σάκχαρο ή φαινολικο

συστατικό), παράγεται ρεύμα ανάλογο της συγκέντρωσης της αναλυτέας ουσίας. Το παραγόμενο σήμα προέρχεται από την ανταλλαγή ηλεκτρονίων μεταξύ του βιολογικού υλικού του ενεργού τμήματος ανίχνευσης του βιοαισθητήρα και του ηλεκτροδίου εργασίας. Η αλλαγή αυτή καταγράφεται, είναι ανάλογη ή αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της αναλυτέας ουσίας και το παραγόμενο ρεύμα, ύστερα από επεξεργασία δίνει πληροφορίες σχετικά με την σύσταση του δείγματος. Ο βιοαισθητήρας γλυκόζης των Clark και Lyons βασίζεται σε αυτή την αρχή λειτουργίας. Μειονέκτημα αυτών των συστημάτων αποτελεί η ευαισθησία τους σε ενδογενή συστατικά του προς ανάλυση δείγματος, όπως επίσης και ο κίνδυνος οξειδωσης ή αναγωγής συστατικών που εμπλέκονται στην διαδικασία αναγνώρισης (Keusgen 2002).

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

Στους οπτικούς βιοαισθητήρες οι οποίοι είναι μαζί με τους ηλεκτροχημικούς, οι πιο ευρέως διαδεδομένοι, ανιχνεύεται αλλαγή στις οπτικές ιδιότητες είτε του βιολογικού μορίου παρουσία του αναλυτή, είτε της ίδιας της αναλυτέας ουσίας κατά την βιολογική αναγνώριση και αυτή η μεταβολή συσχετίζεται με την συγκέντρωση του αναλυτή. Βασίζονται, κυρίως, σε αλλαγές στην απορρόφηση, ή στον φθορισμό μιας κατάλληλης ένωσης, που λειτουργεί ως δείκτης.

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

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

ii) Βιολογικό υλικό

➤ Με βάση την φύση των βιομορίων αναγνώρισης:

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

Τα **ένζυμα** είναι το πιο διαδεδομένο είδος βιολογικών μορίων που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Πρόκειται για πρωτεΐνες αποτελούμενες από μία ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες με συγκεκριμένη τρισδιάστατη διάταξη στο χώρο και δρουν καταλυτικά παρουσία κάποιων μορίων, που ονομάζονται συμπαραγόντες. Η αξιοσημείωτη επιλεκτικότητα, η μεγάλη καταλυτική δραστηριότητα καθώς και η γρήγορη κινητική των περισσοτέρων ενζύμων είναι τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που εστίασαν το ενδιαφέρον των ερευνητών στη χρήση ενζύμων στους βιοαισθητήρες. Από τα μειονεκτήματα ξεχωρίζουν το μεγάλο κόστος και η αστάθεια των περισσοτέρων ενζύμων.

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

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

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

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

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

- a) βιοκαταλυτικούς βιοαισθητήρες, στους οποίους ο υποδοχέας μπορεί να είναι ένζυμο, κύτταρο ή ιστός και
- b) βιοαισθητήρες συγγένειας, όπου ο υποδοχέας μπορεί να είναι DNA, RNA, ή αντίσωμα. Οι βιοκαταλυτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται σε μία αντίδραση που καταλύεται από μακρομόρια, τα οποία είτε είναι παρόντα στον αρχικό βιολογικό περιβάλλον, είτε έχουν απομονωθεί, ή παραχθεί προηγουμένως με κατάλληλο τρόπο, βασίζονται κυρίως στην ακινητοποίηση ενζύμων πάνω σε μία

ηλεκτροδιακή επιφάνεια, τα οποία είναι εκλεκτικά σε συγκεκριμένες ενώσεις, που αποτελούν υποστρώματα τους. Τρία είδη βιοκαταλυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν:

- Ένζυμα (μόνο- ή πολύ- ένζυμα). Τα ένζυμα που συχνά ακινητοποιούνται είναι οι οξειδάσες και τελικά ανιχνεύεται το παραγόμενο υπεροξείδιο του υδρογόνου. Μπορούν όμως να ακινητοποιηθούν και δεϋδρογονάσες, οπότε τελικώς ανιχνεύεται το NADH.
- Ολόκληρα κύτταρα (μικροοργανισμοί, όπως βακτήρια, μύκητες, ευκαρυωτικά κύτταρα, ζυμομύκητες) ή οργανίδια των κυττάρων, ή συστατικά των κυττάρων (μιτοχόνδρια, κυτταρικά τοιχώματα).
- Ιστοί (φυτικοί ή ζωικοί). Οι βιοαισθητήρες συγγένειας, βασίζονται στην αλληλεπίδραση της προς ανάλυση ένωσης με μακρομόρια ή οργανωμένα συγκροτήματα μορίων, τα οποία είτε έχουν απομονωθεί από το βιολογικό τους περιβάλλον, είτε έχουν τροποποιηθεί προηγουμένως με κατάλληλο τρόπο. Κάποια χρονική στιγμή επέρχεται ισορροπία, δημιουργείται ένα σύμπλοκο και συνεπώς δεν παρατηρείται κατανάλωση της προς ανάλυση ένωσης από τον ακινητοποιημένο βιολογικό παράγοντα. Η αλληλεπίδραση που πραγματοποιείται, μπορεί να είναι αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου ή αλληλεπίδραση δέκτη-ανταγωνιστή.

iii) Τεχνικές ακινητοποίησης

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

Η μέθοδος της ακινητοποίησης του βιολογικού συστατικού επηρεάζει σημαντικά τη σταθερότητα του. Αυτό έχει άμεση επίδραση στα χαρακτηριστικά λειτουργίας του βιοαισθητήρα (storage, operational stability). Η ακινητοποίηση βοηθάει όχι μόνο στη διαμόρφωση της απαιτούμενης εγγύτητας ανάμεσα στο βιολογικό υλικό και στον

μετατροπέα, αλλά βοηθάει επίσης και στην σταθεροποίηση του συστήματος προκειμένου αυτό να ξαναχρησιμοποιηθεί.

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

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

Ακινητοποίηση κυττάρων σε αλγινικό ασβέστιο

Αρκετά συνηθισμένη είναι η ακινητοποίηση των κυττάρων εντός πολυμερικού πλέγματος από αλγινικό ασβέστιο. Τα βιοπολυμερή γενικά επιτρέπουν τη διάχυση μορίων προς και από τα ακινητοποιημένα κύτταρα, είναι μη τοξικά, έχουν καλή μηχανική σταθερότητα και σχετικά σταθερή δομή. Το αλγινικό οξύ προέρχεται από κυανοφύκη και έχει ως δομικές μονάδες το β-D-μαννοπυρανοζυλο-ουρονικό οξύ και το α-L-γλυκοπυρανοζυλο-ουρονικό οξύ. Τα αλγινικά άλατα συνήθως είναι διαθέσιμα με τη μορφή υδατικού αλγινικού νατρίου και έχουν χρησιμοποιηθεί για πάνω από 65 χρόνια στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων ως παράγοντες πήξης, ως γαλακτωματοποιητές, για το σχηματισμό λεπτών μεμβρανών και γενικά ως παράγοντες σχηματισμού στερεού κολλοειδούς. Η προσθήκη διαλύματος αλγινικού οξέος σε διάλυμα ασβεστίου, έχει ως αποτέλεσμα τον άμεσο πολυμερισμό με την καθίζηση του αλγινικού ασβεστίου. Δημιουργείται έτσι μια στιγμιαία πηκτωματοποίηση καθώς τα ιόντα του ασβεστίου διαπερνούν το αλγινικό οξύ. Το πήγμα που προκύπτει είναι βιοχημικά αδρανές και μηχανικά σταθερό, με πόρους που είναι κατάλληλοι για ακινητοποίηση κυττάρων (Bickerstaff 1997).

1.3.3. Χαρακτηριστικά βιοαισθητήρων

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

➤ **Ακρίβεια**

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

➤ **Υστέρηση**

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

➤ **Σφάλματα βαθμονόμησης**

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

λανθασμένη καταγραφή της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην αλλαγή αυτής της ποσότητας.

➤ **Συστηματικά σφάλματα**

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

➤ **Τυχαία σφάλματα**

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

➤ **Πλήρης κλίμακα εισόδου**

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

➤ **Πλήρης κλίμακα εξόδου**

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

➤ **Διακριτική Ικανότητα**

Ορίζεται ως η ελάχιστη μεταβολή της μετρήσιμης φυσικής ποσότητας που χρειάζεται για να παρατηρηθεί ανιχνεύσιμη μεταβολή στο σήμα εξόδου. Η ελάχιστη

μεταβολή της μετρήσιμης ποσότητας από το μηδέν ορίζεται ως όριο της διακριτικής ικανότητας.

➤ **Επαναληψιμότητα, Ικανότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων**

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

➤ **Επιλεκτικότητα**

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

➤ **Ευαισθησία**

Η ευαισθησία ενός βιοαισθητήρα είναι η παράγωγος της συνάρτησης μεταφοράς ως προς τη μετρήσιμη φυσική ποσότητα για μια ορισμένη τιμή της ποσότητας αυτής, Για μια γραμμική συνάρτηση μεταφοράς, η ευαισθησία του βιοαισθητήρα είναι γραμμική. Ένας βιοαισθητήρας με ιδανικά χαρακτηριστικά έχει μεγάλη και σταθερή ευαισθησία.

➤ **Μονοτονικότητα**

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

➤ **Σταθερότητα**

Η σταθερότητα του βιοαισθητήρα εξαρτάται κυρίως από το χρόνο ζωής του βιολογικού του μορίου. Όλοι οι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε

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

➤ **Εύρος συχνοτήτων**

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

➤ **Χρόνος απόκρισης**

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

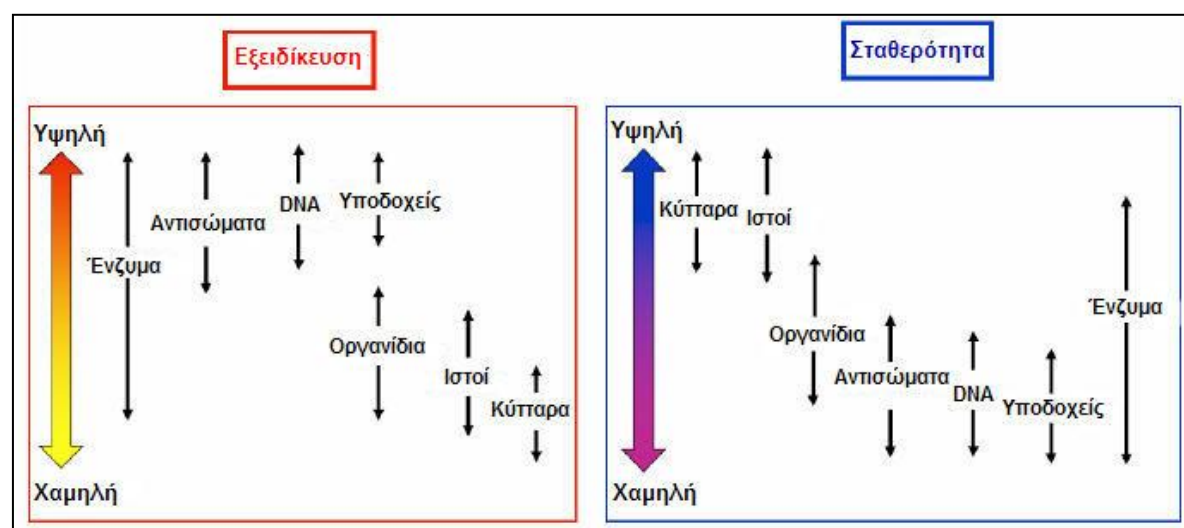
➤ **Γραμμική Απόκριση**

Είναι γενικά επιθυμητό η απόκριση ενός βιοαισθητήρα να μεταβάλλεται γραμμικά με το μετρούμενο μέγεθος. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται η σχέση μεταξύ του σήματος εισόδου (οριζόντιος άξονας) και του σήματος εξόδου (κατακόρυφος άξονας) (Σχήμα 1.3). Η μη γραμμικότητα εκφράζεται ως η μέγιστη απόκλιση μεταξύ των σημείων και της γραμμής και συνήθως εκφράζεται ως η απόκλιση του εύρους του βιοαισθητήρα.

Εκτός από τα στατικά χαρακτηριστικά ενός βιοαισθητήρα, τα οποία αναφέρονται στην περίπτωση όπου έχει επέλθει ισορροπία μεταξύ σήματος εισόδου και βιοαισθητήρα, δηλαδή όταν πλέον τα σήματα εισόδου και εξόδου δεν μεταβάλλονται πλέον συναρτήσει του χρόνου, κάθε βιοαισθητήρας διαθέτει και δυναμικά χαρακτηριστικά. Τα δυναμικά χαρακτηριστικά περιγράφουν τη συμπεριφορά του

αισθητήρα μεταξύ της στιγμής κατά την οποία το σήμα εισόδου μεταβάλλεται, έως την στιγμή κατά την οποία το σήμα εξόδου θα σταθεροποιηθεί εκ νέου. Τα δυναμικά χαρακτηριστικά ισχύουν, όπως και τα στατικά, εντός συγκεκριμένου εύρους συνθηκών λειτουργίας του βιοαισθητήρα. Εάν ο βιοαισθητήρας βρεθεί να λειτουργεί εκτός αυτού του εύρους, τότε τα δυναμικά χαρακτηριστικά αναμένεται να μεταβληθούν.

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



Σχήμα 1.3: Διαβάθμιση εξειδίκευσης και σταθερότητας βιοαισθητήρων, ανάλογα με το βιολογικό τους υλικό

1.3.4. Πλεονεκτήματα βιοαισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες πλεονεκτούν ιδιαίτερα έναντι των κλασσικών αναλυτικών μεθόδων, όπως της αέριας και της υγρής χρωματογραφίας, (GC, LC) και της φασματομετρίας μαζών, (MS), καθώς δεν ανιχνεύουν απλά την παρουσία μιας χημικής ουσίας, αλλά παρέχουν πληροφορίες και για την βιοδιαθεσιμότητα της ουσίας αυτής και για τις δυσμενείς επιπτώσεις που μπορεί να επιφέρει σε βιολογικά συστήματα. Επίσης, υπερτερούν και των συμβατικών χημικών βιοαισθητήρων (αναλυτική χημεία), χρησιμοποιούν βιολογικά συστήματα στην θέση χημικών συστημάτων, όπως κύτταρα,

ένζυμα, αντισώματα και η παρακολούθηση των επιθυμητών παραμέτρων διεξάγεται *in vivo* (Mehrvan – Abdi 2004; Robbens et al. 2005).

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

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

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

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

Παρ' όλα αυτά, έχουν και ορισμένους περιορισμούς, όπως είναι οι ηλεκτροχημικά ενεργές επιφάνειες των αναλυτέων ουσιών και η βραχυχρόνια σταθερότητα τους, καθώς όντας συστήματα που χρησιμοποιούν απομονωμένα βιολογικά συστατικά, αντιμετωπίζουν προβλήματα που αφορούν την σταθερότητα και τον χρόνο ζωής των βιολογικών αυτών συστατικών, (Mehrvar – Abdi 2004). Επίσης, υπάρχει η πιθανότητα να παρατηρηθούν σημαντικές αποκλίσεις στις αποκρίσεις των βιοαισθητήρων που χρησιμοποιούν κύτταρα ή οργανισμούς από διαφορετικές σειρές, κάτι που υποδεικνύει την ανάγκη για συνεχή και προσεκτικό έλεγχο των συνθηκών ανάπτυξης των διαφορετικών σειρών βιολογικού υλικού που χρησιμοποιείται, προκειμένου να απαλειφθούν τυχόν διαφοροποιήσεις μεταξύ τους. Η ηλικία, η θερμοκρασία, ο πληθυσμός και ο αερισμός μιας καλλιέργειας, είναι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απόκριση ενός βιοαισθητήρα (Ramakrishna et al. 2005).

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

1.3.5. Εφαρμογές των βιοαισθητήρων

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

✓ Ιατρικοί - Φαρμακευτικοί - Διαγνωστικοί Έλεγχοι

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

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

✓ Περιβαλλοντικοί έλεγχοι

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

✓ **Βιομηχανικοί Έλεγχοι**

Οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο σε βιομηχανίες παραγωγής και ζυμώσεων, προκειμένου να ελέγξουν την παραγωγή σακχάρων, αμινοξέων, αντιβιοτικών, ειδικευμένων χημικών ουσιών, συντηρητικών, αντιμικροβιακών ουσιών και μερικών γενετικά τροποποιημένων πρωτεϊνών. Επίσης ελέγχουν τις διαδικασίες παραγωγής, την ποιότητα των προϊόντων και χρησιμοποιούνται για την διεξαγωγή μετρήσεων των αποβλήτων των βιομηχανιών. Οι βιοαισθητήρες βρίσκουν εφαρμογή στους ποιοτικούς ελέγχους τροφίμων, που αποσκοπούν στον καθορισμό της ποιότητας και στην πιστοποίηση της συμμόρφωσης με την νομοθεσία.

✓ **Γεωργικοί έλεγχοι**

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

✓ **Βιοτεχνολογικές διεργασίες**

Γενικά οι βιοτεχνολογικές διαδικασίες είναι πολύ πολύπλοκες και τα κύτταρα ή οι μικροοργανισμοί πρέπει να καλλιεργούνται κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Γι' αυτό το λόγο ο ακριβής και άμεσος προσδιορισμός για τον έλεγχο των συνθηκών της ζύμωσης είναι απαραίτητος. Οι βιοαισθητήρες λόγω της δυνατότητας που προσφέρουν για αναλύσεις σε πραγματικό χρόνο, έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση τέτοιων διαδικασιών.

✓ **Άλλες εφαρμογές**

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

1.4. Κυτταρικοί βιοαισθητήρες

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

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

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

Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες αποτελούνται από τα ίδια τμήματα που απαρτίζουν τους βιοαισθητήρες γενικά, (Κεφάλαιο 1.3.1). Στους κυτταρικούς βιοαισθητήρες η

διαδικασία μεταγωγής σημάτων διεξάγεται σε δυο στάδια. Τα κύτταρα λειτουργούν ως πρωταρχικοί μεταγωγείς, "μετατρέποντας" την ανιχνεύσιμη ουσία σε κυτταρικό σήμα. Ένας δευτερεύων μεταγωγέας σήματος απαιτείται για την μετατροπή της κυτταρικής /βιοχημικής απόκρισης σε ανιχνεύσιμο σήμα, προκειμένου να αναλυθεί, (Σχήμα 1.4). Ο τύπος του δευτερεύοντα μεταγωγέα σήματος που θα χρησιμοποιηθεί, εξαρτάται από τον τύπο του κυτταρικού σήματος που θα εξεταστεί (Bedioui 1999).

Υπάρχουν πολλοί λόγοι για τους οποίους τα ζωντανά κύτταρα είναι κατάλληλα για τις διαδικασίες ανίχνευσης. Παρόλο που τα κύτταρα είναι οι μικρότερες δομικές μονάδες όλων των οργανισμών, πέραν των ιών και των prions, διαθέτουν υψηλά εξελιγμένα βιοχημικά μονοπάτια, γεγονός που τους παρέχει μεγάλη ευαισθησία σε μεγάλο εύρος βιοχημικών ερεθισμάτων. Καθώς οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες κάνουν χρήση απευθείας μετρήσεων της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων και των μεταβολών που υποκινούνται στα κύτταρα από τοξικές ουσίες, (μεταβολή ηλεκτροχημικής κυτταρικής απόκρισης), παρέχουν την δυνατότητα ανίχνευσης άγνωστων ουσιών. Αυτές οι ιδιότητες διαχωρίζουν τους κυτταρικούς βιοαισθητήρες από τους μοριακούς βιοαισθητήρες, οι οποίοι βασίζονται στην εξέταση άλλων γεγονότων. Οι ανοσοαισθητήρες ή οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες, ανιχνεύουν την δημιουργία δεσμών μεταξύ συγκεκριμένων δομικών μονάδων. Η δημιουργία δεσμού, όμως, δεν παρέχει πληροφορίες για την φυσιολογική επίδραση μιας αναλυτέας ουσίας. Επίσης, οι ανοσοαισθητήρες και οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες περιορίζονται στην ανίχνευση συγκεκριμένων, ήδη αναγνωρισμένων ουσιών. Αντιθέτως, οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτενή μελέτη ουσιών με άγνωστη βιοχημική δομή (Hulanicki et al. 1991). Δυνητικές εφαρμογές, οι οποίες θα μπορούσαν να επωφεληθούν από την εκτενή μελέτη της λειτουργικότητας κάποιων ουσιών, είναι η φαρμακολογία, η κυτταρική βιολογία, η τοξικολογία και περιβαλλοντικοί έλεγχοι (Bedioui 1999).

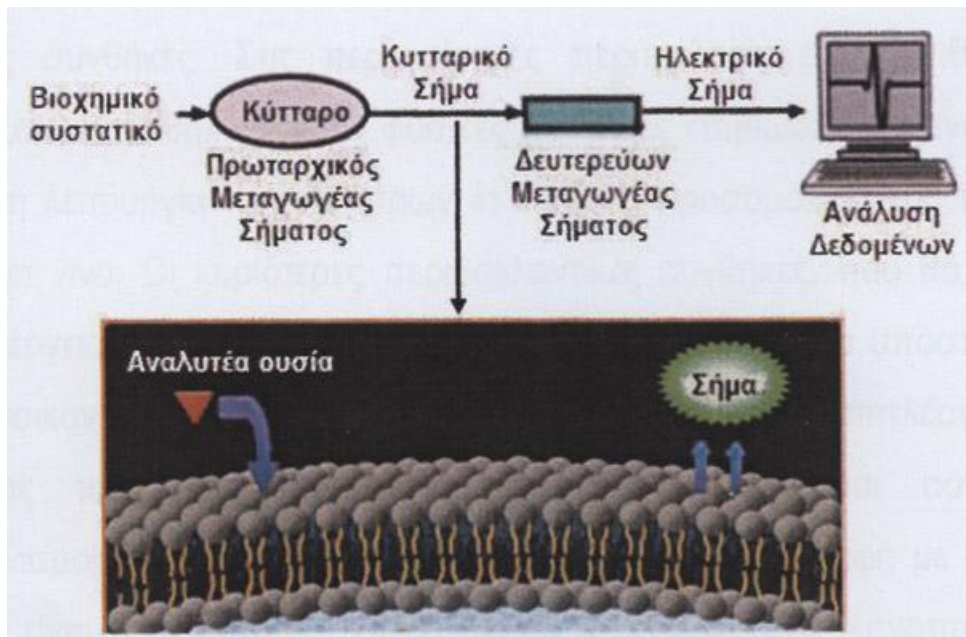
Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες έχουν το πλεονέκτημα της αυξημένης σταθερότητας, της μεγάλης βιοκαταλυτικής δραστηριότητας, ενώ το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να παρέχουν σχετικές κυτταρικές πληροφορίες σε απόκριση με το δείγμα και να μετρούν την δραστικότητά του. Με άλλα λόγια οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι εκτελούν λειτουργίες όπως τα κύτταρα, όχι μόνο ανιχνεύουν την παρουσία ενός στοιχείου, αλλά είναι ακόμη ικανοί να αποκρίνονται με έναν τρόπο που προσφέρει επίγνωση της φυσιολογικής επίδρασης του δείγματος στα κύτταρα (Gilchrist et al. 2001,

Stenger et al. 2001). Επιπλέον η ανάγκη για βιοαισθητήρες με χρόνο ζωής εβδομάδων ή μηνών αποκλείει τη χρήση ηλικιωμένων κυττάρων, κάτι που απαιτεί κατανάλωση χρόνου για συλλογή και προετοιμασία των κυττάρων. Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες επίσης παρέχουν ένα περισσότερο πολύπλοκο – σύνθετο αισθητήριο σύστημα το οποίο περιλαμβάνει πολλαπλά ολοκληρωμένα μοριακά συστατικά και έχουν το πλεονέκτημα της οικονομικής βιομηχανοποίησής τους.

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

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

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



Σχήμα 1.4: Μονοπάτια μεταγωγής σήματος σε ένα κυτταρικό βιοαισθητήρα (Fraden 2004, DeBusschere 2002).

1.4.1. Σχεδιασμός κυτταρικού βιοαισθητήρα

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

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

κυττάρων που χρησιμοποιούν οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες είναι τα βακτηριακά κύτταρα και οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες είναι οι μικροβιακοί βιοαισθητήρες. Λιγότερο συχνά, χρησιμοποιούνται κύτταρα ανωτέρων φυτών και ζώων στους λεγόμενους βιοαισθητήρες ιστών, (tissue biosensors).

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

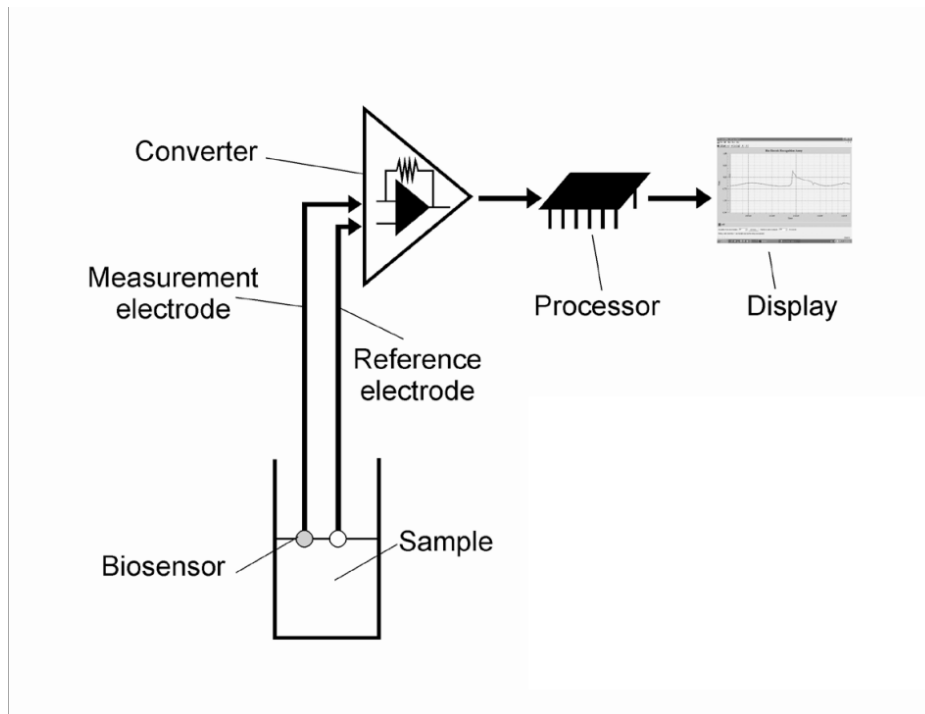
Ένα άλλο στοιχείο που πρέπει να εξεταστεί κατά τον σχεδιασμό ενός κυτταρικού βιοαισθητήρα είναι ο τύπος του δευτερεύοντα μετατροπέα σήματος που θα επιλεγεί.

Το κατάλληλο κυτταρικό σήμα που θα μελετηθεί και αντίστοιχα ο κατάλληλος μετατροπέας σήματος που θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε έναν κυτταρικό βιοαισθητήρα, εξαρτάται από την εφαρμογή για την οποία θα χρησιμοποιηθεί ο βιοαισθητήρας. Η βέλτιστη επιλογή ενός μετατροπέα σήματος σχετίζεται άμεσα με τον τύπο των κυττάρων που έχουν επιλεγεί για τον συγκεκριμένο κυτταρικό βιοαισθητήρα και η επιθυμητή μέθοδος του δευτερεύοντος μεταγωγέα σήματος θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από την εξαγωγή ερμηνεύσιμων αποτελεσμάτων και από την διεξαγωγή των αναλύσεων σε πραγματικό χρόνο (Borkholder 1998; DeBusschere 2002). Σε προσπάθειες ανάπτυξης κυτταρικών βιοαισθητήρων, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τύποι μετατροπέων σήματος, προκειμένου να εξεταστεί και να επεξεργαστεί η ανταπόκριση των κυττάρων και η παραγωγή του κατάλληλου σήματος. Υπάρχουν διάφοροι τύποι κυτταρικών σημάτων, τα οποία θα μπορούσαν να εξεταστούν, ως αποτέλεσμα των κυτταρικών αντιδράσεων και να δώσουν τις επιθυμητές πληροφορίες. Μια κατηγορία σημάτων αφορά τον έλεγχο των ενδοκυτταρικών διεργασιών, όπως την μελέτη των διαδικασιών αντιγραφής και μετάφρασης του DNA ή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Άλλοι τύποι κυτταρικών μηνυμάτων είναι οι μεταβολές στον μεταβολισμό των κυττάρων ή η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Μια άλλη πηγή κυτταρικών πληροφοριών, είναι η μέτρηση της μεταβολής του ηλεκτρικού δυναμικού του κυττάρου, δηλαδή της μεμβρανικής ηλεκτρικής δραστηριότητας μερικών τύπων ηλεκτρικά ενεργών κυττάρων, μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Επειδή το ηλεκτρικό δυναμικό των κυττάρων επηρεάζεται από πολυάριθμες κυτταρικές βιοχημικές διεργασίες, οι κυτταρικοί αισθητήρες που βασίζονται στην ηλεκτρική δραστηριότητα των κυττάρων, επωφελούνται από την υψηλή ευαισθησία των κυττάρων που χρησιμοποιούν. Στην περίπτωση μέτρησης του κυτταρικού δυναμικού, οι δευτερεύοντες μεταγωγείς σημάτων μπορεί να είναι εξωκυτταρικά μικροηλεκτρόδια (Σχήμα 1.5). Η επιλογή της μεθόδου μέτρησης και εξέτασης του εξωκυτταρικού δυναμικού, ως μηχανισμού κύριας μεταγωγής σήματος από το κύτταρο, περιορίζει αυτομάτως τον αριθμό των πιθανών κυτταρικών τύπων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, σε εκείνα τα οποία είναι ηλεκτρικά ενεργά και παράγουν μετρήσιμο εξωκυτταρικό δυναμικό, καθώς έτσι γίνεται δυνατός ο προσδιορισμός τοξικών, φαρμακευτικών και άλλων ουσιών που επηρεάζουν την ηλεκτρική δραστηριότητα των κυττάρων και μια κατηγορία τέτοιων κυττάρων είναι τα νευρικά κύτταρα, για τα οποία γίνεται εκτενής αναφορά παρακάτω. Η πολυπλοκότητα

των μονοπατιών σηματοδότησης των κυττάρων, καθιστά ικανή την οποιαδήποτε αναλυτέα ουσία να παράγει κάποιον συνδυασμό των προαναφερθέντων τύπων κυτταρικών σημάτων.

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

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



Σχήμα 1.5: Διάταξη κυτταρικού βιοαισθητήρα (τύπου BERA)

(Moschopoulou et al. 2008)

1.4.2. Ηλεκτροφυσιολογικές μέθοδοι μέτρησης – Εφαρμογές

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

- Άμεση αλληλεπίδραση των μικροηλεκτροδίων με την κυτταρική μεμβράνη
- Αλληλεπίδραση με στοιχεία-αναλύτες παρόντα στο εξωκυτταρικό Μικροπεριβάλλον
- Αλληλεπίδραση με άλλα μέρη του στόχου, όπως το στερεό κολλοειδές και το διάλυμα που είναι συγκεντρωμένο στους πόρους της μήτρας (ακινητοποιημένοι κυτταρικοί βιοαισθητήρες) ή με το διάλυμα καλλιέργειας (εναιώρημα κυτταρικών βιοαισθητήρων).

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

Η γενική αρχή λειτουργίας των μεθόδων που βασίζονται σε ηλεκτρόδιο είναι η εξής: κατασκευάζεται ένα ηλεκτρόδιο το οποίο αποτελείται από αγώγιμο σύρμα (π.χ. άργυρο, χρυσό ή πλατίνα) τοποθετημένο σε πιπέττα γεμάτη από ηλεκτρολυτικό διάλυμα. Με το σύστημα αυτό, όταν η άκρη της πιπέττας έρθει σε επαφή με το βιολογικό υλικό, δημιουργείται μια αγώγιμη γέφυρα, μέσα από την οποία μπορεί να συνδεθεί μια συσκευή καταγραφής ρεύματος ή δυναμικού. Εκτός από το ηλεκτρόδιο μέτρησης υπάρχει και το ηλεκτρόδιο αναφοράς σε μια σταθερή τιμή ρεύματος ή δυναμικού.

Συνήθως χρησιμοποιείται σύστημα δυο ζευγών ηλεκτροδίων (μέτρησης – αναφοράς) έτσι ώστε, να είναι δυνατή η μέτρηση του ρεύματος ή του δυναμικού μετά από εξωγενή εφαρμογή ρεύματος ή δυναμικού (αμπερομετρία – βολταμετρία) (Guilbault 1991).

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

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

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

ανθεκτικότητα, ταχεία απόκριση λόγω της λεπτής επιφάνειας ανιχνεύσεως (μεμβράνης) και ευκολία μαζικής παραγωγής (Κλώνης 1997).

1.4.3. Μέθοδος Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης, BERA

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

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

Επιπροσθέτως, έχει χρησιμοποιηθεί η μέθοδος BERA για την ανίχνευση παρουσίας ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και την επίδραση που μπορεί να έχουν στην κυτταρική διαίρεση των φύλλων στο φυτό *Spirodela polyrrchiza* (G. Moschoroulou et al. 2007), καθώς και για την ανίχνευση οργανικών τοξικών ουσιών, όπως φυτοφαρμάκων (Mavrikou. et al. 2008, Flampouri et al. 2010) και της 2, 4, 6-τριχλωροανισόλης (Varelas et al. 2010).

1.4.4. Γενιές Κυτταρικών Βιοαισθητήρων

Έως σήμερα έχουν αναπτυχθεί έξι γενιές κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA και στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται η 5^η γενιά με δύο διαφορετικές μεθόδους. Επιγραμματικά, στην 1^η γενιά ο βιοαισθητήρας περιείχε ακινητοποιημένα κύτταρα σε 0,8% αγαρόζη και είχε την μορφή σωλήνα 15 ml. Η 2^η γενιά είχε, επίσης, την μορφή σωλήνα και τα κύτταρα ήταν ακινητοποιημένα σε αγαρόζη, με την διαφορά ότι είχε πολύ μικρότερο όγκο (1 ml), οπότε απαιτούσε μικρότερη ποσότητα υλικών (Kintzios et al. 2001a,b, 2003, Pistola 2003). Η 3^η και 4^η γενιά κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA (Kintzios et al. 2006, Marinopoulou 2005) είχαν την μορφή επίπεδης στοιβάδας και στην μεν 3^η γενιά τα κύτταρα ήταν ακινητοποιημένα σε «φλούδα» αλγινικού ασβεστίου, στην δε 4^η γενιά δημιουργήθηκε ένα αγώγιμο πλέγμα αλγινικού ασβεστίου με πηγαδάκια στον πυθμένα των οποίων υπήρχαν τα ηλεκτρόδια και γινόταν εφαρμογή των κυττάρων μέσα σε αυτά τα πηγαδάκια. Οι βιοαισθητήρες BERA 3^{ης} γενιάς είναι κατάλληλοι για την μελέτη της κυτταροδιαίρεσης και της 4^{ης} γενιάς για την μελέτη επικοινωνίας των κυττάρων και αλληλεπίδρασης με διάφορες ουσίες. Η 5^η γενιά αισθητήρων έχει μορφή σφαιριδίου αποτελούμενου από κύτταρα ακινητοποιημένα σε πήγμα αλγινικού ασβεστίου, διαμέτρου μόλις 2 χιλιοστών. Η 6^η γενιά είναι σχηματικά όμοια με την 5^η, με τη διαφορά ότι τα κύτταρα έχουν τροποποιηθεί («μιμητικά κύτταρα») έτσι ώστε να φέρουν στην επιφάνεια τους υποδοχείς (αντισώματα ή ένζυμα) ικανούς να αντιδράσουν εκλεκτικά με τα υπό ανίχνευση μόρια. Οι Moschoroulou and Kintzios (2006) ανέπτυξαν έναν υβριδικό τύπο βιοαισθητήρα BERA (αισθητήρας 6^{ης} γενιάς), βασισμένο σε θηλαστικά κύτταρα τα οποία είχαν τροποποιηθεί μεμβρανικώς με SOD (δισμουτάση του O₂⁻). Ακόμη, έχουν χρησιμοποιηθεί κύτταρα των οποίων η μεμβράνη τροποποιήθηκε με ειδικά αντισώματα για την ανίχνευση του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς (Moschoroulou et al. 2008).

1.4.5. Θεωρία κυτταρικής λειτουργίας και απόκρισης

Καθώς τα κύτταρα αποτελούν τους πρωταρχικούς μεταγωγείς σημάτων των κυτταρικών βιοαισθητήρων, είναι απαραίτητη η γνώση της δομής και της ηλεκτροφυσιολογίας τους, προκειμένου να γίνει αντιληπτή η διαδικασία παραγωγής

σημάτων από αυτά και οι περιορισμοί που εμπλέκονται στον σχεδιασμό των κυτταρικών βιοαισθητήρων.

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

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

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

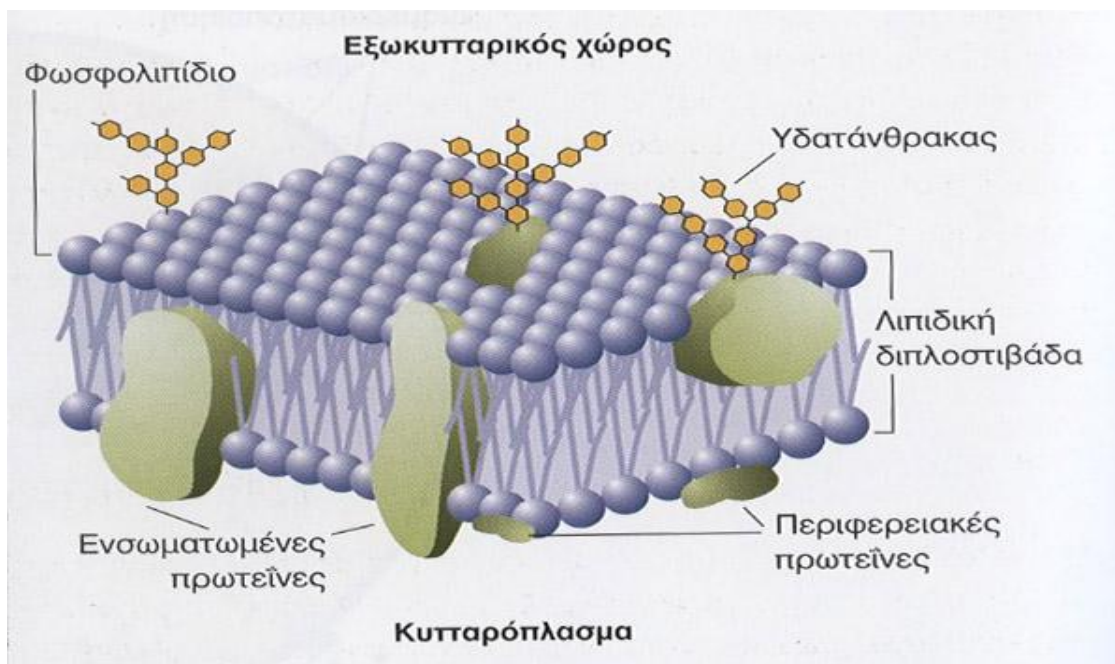
Δέκτες εξωτερικών ερεθισμάτων: η μεμβράνη έχει βασικό ρόλο στη μεταγωγή μηνυμάτων (signal transduction), δηλαδή στην απόκριση του κυττάρου σε ένα εξωτερικό σήμα. Οι μεμβράνες έχουν υποδοχείς (receptors), οι οποίοι δεσμεύουν ειδικά διάφορα μόρια, όπως ορμόνες, παράγοντες αύξησης κ.α. Η αλληλεπίδραση των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

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

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

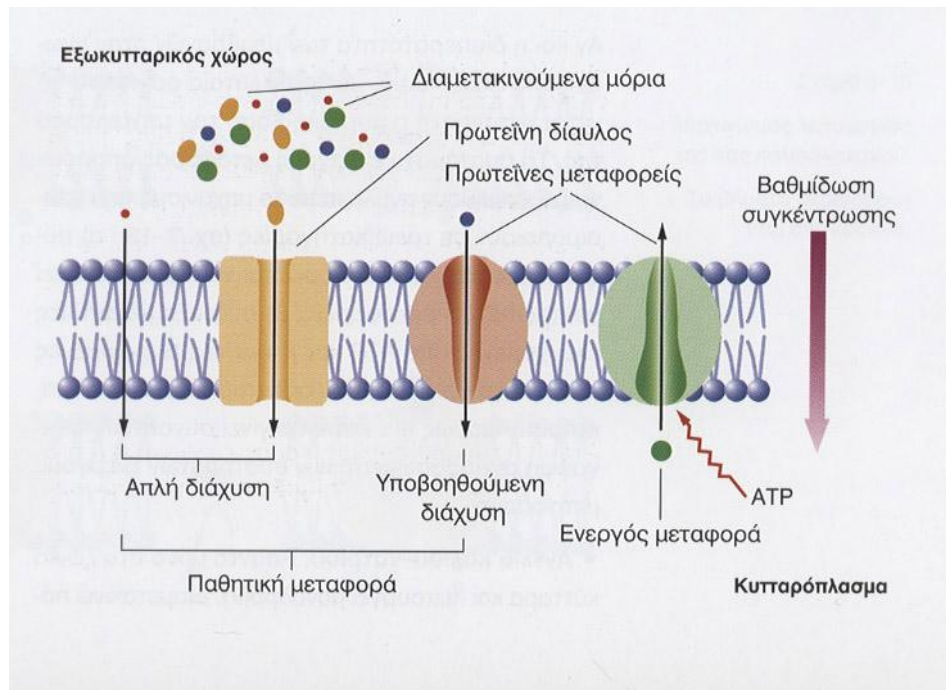
Ταυτόχρονα, αποτελούν συνήθως και τον πρωταρχικό στόχο στην εισβολή βακτηρίων και ιών, στη δράση χημικών και φαρμακευτικών ουσιών, καθώς και στην έκθεση σε φυσικούς παράγοντες του περιβάλλοντος. Συνοπτικά, ο ρόλος τους είναι ιδιαίτερα σημαντικός στις εξής τέσσερις κύριες διεργασίες: 1) Μετατροπή ενέργειας, 2) Μεταφορά ύλης, 3) Αισθητήρια μεταγωγή και μετάδοση σήματος, δηλαδή ανίχνευση των μεταβολών των περιβαλλοντικών συνθηκών και αντίστοιχη επαγωγή της κυτταρικής αντίδρασης σε αυτές και 4) Επεξεργασία πληροφορίας. Στη σύνθεση όλων των κυτταρικών μεμβρανών συμμετέχουν σε διαφορετικό ποσοστό, τα εξής κύρια συστατικά: πρωτεΐνες, (διαμεμβρανικές / επιφανειακές), λιπίδια, υδρογονάνθρακες,

γλυκοπρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες, ιόντα και νερό. Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από δύο στρώματα, το στρώμα των φωσφολιπιδίων και το στρώμα των πρωτεϊνικών μορίων που περιτυλίγουν το κύτταρο (σχήμα 1.6). Οι πρωτεΐνες που απαντώνται στο διπλό στρώμα είναι: πρωτεΐνες-υποδοχείς, (receptor proteins) και πρωτεΐνες-προσκόλλησης (adhesion proteins), οι οποίες εξετάζουν την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων και είναι σημαντικές για την συμπεριφορά των κυττάρων και την οργάνωση τους σε ιστούς, πρωτεΐνες αναγνώρισης και πρωτεΐνες-μεταφορείς που ρυθμίζουν τη μετακίνηση του νερού και των διαλυτών μορίων μέσω της μεμβράνης. Πολλές σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η μεταφορά ηλεκτρονίων, πραγματοποιούνται με ένζυμα συνδεδεμένα με επιφάνειες μεμβρανών. Η κυτταρική μεμβράνη είναι επιλεκτικά διαπερατή και εμπλέκεται στην διαδικασία της όσμωσης και της ενεργούς πρόσληψης ιόντων και μορίων. Οι ουσίες που εισέρχονται στο κύτταρο είναι συγκεκριμένες και αυτό επιτρέπει στα κύτταρα να ελέγχουν την εσωτερική τους σύνθεση (Bedioui 1999).



Σχήμα 1.6: Σχηματική απεικόνιση μεμβράνης σύμφωνα με το μοντέλο ρευστού μωσαϊκού (Μαρμάρας, Λαμπροπούλου-Μαρμάρα 2005)

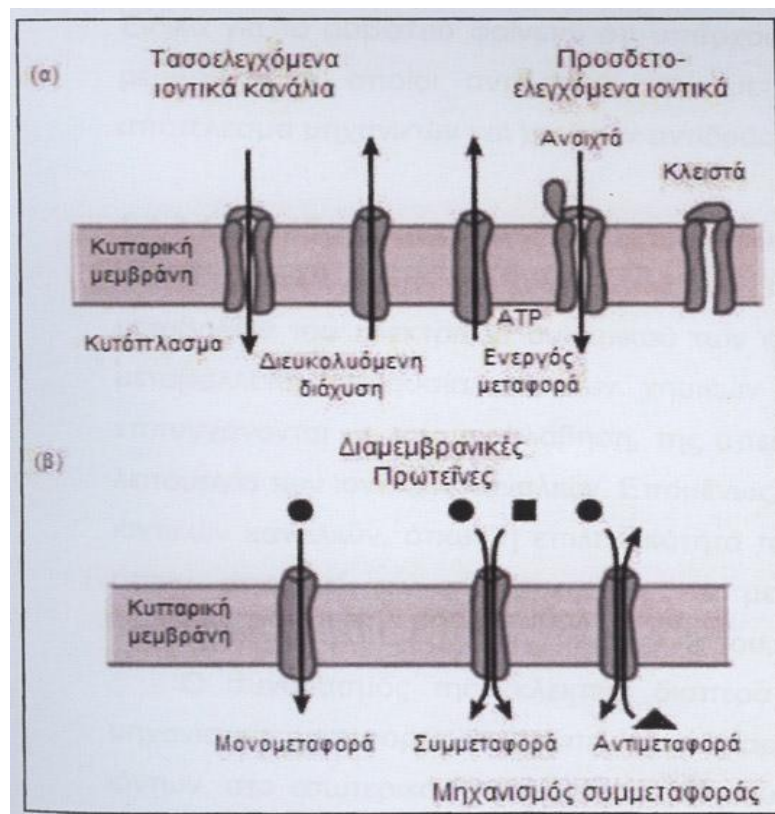
Στο κύτταρο η μεταφορά συστατικών μέσω της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις τρόπους, με απλή διάχυση, με παθητική μεταφορά και με ενεργό μεταφορά (Σχήμα 1.7).



Σχήμα 1.7: Συστήματα μεταφοράς μορίων διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης (Μαρμάρας, Λαμπροπούλου-Μαρμάρα 2005)

Γενικά, υπάρχουν τρεις τύποι μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς, οι οποίες δημιουργούν σύμπλοκο με το ιόν ή μόριο το οποίο περνά μέσα από την μεμβράνη: οι πρωτεΐνες - μεταφορείς για την μεταγωγή σημάτων (carriers), οι αντλίες ιόντων (ion pumps) και οι διάυλοι - κανάλια ιόντων (ion channels) (Σχήμα 1.8). Η ταχύτητα μεταφοράς μορίων για τις αντλίες ιόντων είναι χαμηλή, (<500 μόρια/sec), για τους φορείς είναι μέση, (500-10000 μόρια/sec) και για τις διόδους ιόντων είναι ταχύτερη, (10000-πολλά εκατομ. μόρια/sec). Οι κατηγορίες αυτές διαφέρουν ως προς την μορφή της ενέργειας που χρησιμοποιούν. Οι αντλίες ιόντων χρησιμοποιούν χημική, από την υδρόλυση του ATP ή φωτεινή ενέργεια, ενώ οι μεταφορείς και οι διάυλοι ιόντων βασίζονται κυρίως σε ηλεκτροχημικές διαβαθμίσεις ιόντων. Στην παθητική μεταφορά, (διευκολυνόμενη διάχυση), εμπλέκονται πρωτεϊνικοί μεταφορείς, και κανάλια ιόντων και

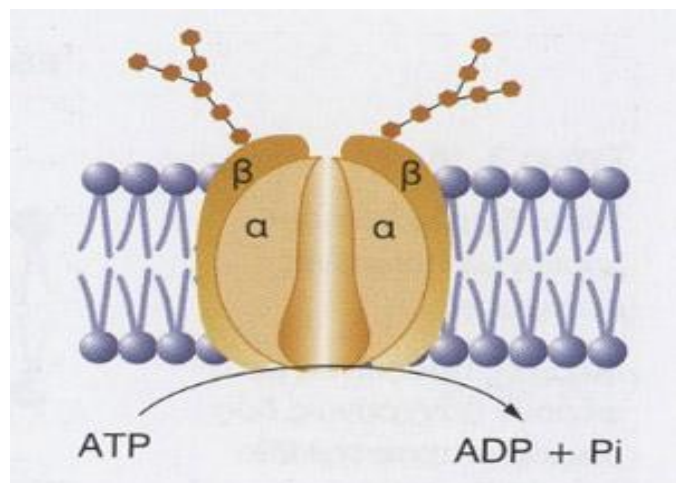
η μεταφορά των συγκεκριμένων ιόντων γίνεται ενάντια στην κλίση του ηλεκτρικού δυναμικού. Στην ενεργό μεταφορά εμπλέκονται πρωτεϊνικοί μεταφορείς και αντλίες ιόντων και τα ιόντα κινούνται αντίθετα προς την ηλεκτροχημική βαθμίδα. Η ενεργός μεταφορά κινεί τα μόρια ενάντια στο δυναμικό συγκέντρωσης και χρειάζεται ενέργεια υπό μορφή ATP η οποία προσφέρεται από τις ειδικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, για την κίνηση των ιόντων προς εξισορρόπηση της συγκέντρωσης τους μέσα και έξω από το κύτταρο. Στην παθητική μεταφορά τα μόρια κινούνται χρησιμοποιώντας το δυναμικό συγκέντρωσης, δεν απαιτείται ενέργεια και διαμεσολαβούν οι πρωτεΐνες καναλιών ιόντων.



Σχήμα 1.8: Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς. α) Κανάλια ιόντων και αντλίες ιόντων, β) Πρωτεΐνες μεταφορείς (Borkholder 1998)

Η αντλία νατρίου-καλίου, (Σχήμα 1.9), η οποία αποτελεί το πιο κλασικό παράδειγμα πρωτεΐνης-φορέα ενεργού μεταφοράς, κινεί ενεργά το Na^+ έξω από το κύτταρο ενάντια στο απότομο ηλεκτροχημικό του δυναμικό και κινεί το K^+ μέσα σε αυτό. Η αντλία αυτή αποτελείται κατά βάση από μια ATP-άση, η οποία είναι ειδικό ένζυμο αποφωσφορυλίωσης του ATP. Οι ATP-άσεις τροφοδοτούν το κύτταρο με ιόντα και

'ενεργοποιούν' την κυτταρική μεμβράνη δημιουργώντας ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό, κάτι που εξασφαλίζει την λειτουργία των μεταφορέων και των ιοντικών καναλιών. Σχεδόν το ένα τρίτο της ενέργειας που χρειάζεται ένα απλό ζωικό κύτταρο καταναλώνεται στην τροφοδότηση αυτής της αντλίας, ενώ αγγίζει τα δύο τρίτα στις περιπτώσεις των νευρικών κυττάρων. Επειδή η αντλία υδρολύει το ATP (Na^+ έξω και K^+ μέσα), είναι επίσης γνωστή και ως ATPase Na^+-K^+ . Οι αντλίες ιόντων μπορούν να συνδεθούν με μια πηγή ενέργειας, όπως στην περίπτωση της αντλίας Na^+-K^+ , για να καταλύσουν την ενεργό μεταφορά. Οι αντλίες ιόντων, οι οποίες συμμετέχουν στην ενεργό μεταφορά, χρησιμοποιούν ενέργεια, μεταβολική ή ηλεκτροχημική, για να κινήσουν τις διαλυτές ουσίες ακόμα κι ενάντια στο ηλεκτροχημικό τους δυναμικό. Εάν αυτή η αντλία σταματήσει να λειτουργεί ή εάν παρεμποδιστεί η λειτουργία της, τότε συσσωρεύεται Na^+ μέσα στο κύτταρο ενώ η συγκέντρωση του K^+ μέσα στο κύτταρο μειώνεται.



Σχήμα 1.9: Μοντέλο της αντλίας νατρίου-καλίου
(Μαρμάρας, Λαμπροπούλου-Μαρμάρα 2005)

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

δίοδοι στην κυτταρική μεμβράνη, οι οποίοι αντιδρούν στην μεταβολή της συγκέντρωσης του ασβεστίου ως αποτέλεσμα μηχανικών και χημικών αντιδράσεων στην κυτταρική μεμβράνη.

Η αντλία ασβεστίου απαντά στην πλασματική μεμβράνη και στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (Ε.Δ.). Χρησιμεύει για τη διακίνηση ιόντων ασβεστίου στον εξοκυτταρικό χώρο ή στον αυλό του Ε.Δ. Όπως και η αντλία νατρίου-καλίου, η αντλία Ca είναι μια ATP-άση, η οποία φωσφορυλιώνεται και απόφωσφορυλιώνεται κατά τη διαμετακίνηση των ιόντων. Είναι γνωστό ότι τα Ca^{2+} παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μυϊκής συστολής. Όταν ένα κύτταρο διεγείρεται από ένα νευρικό παλμό, ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα ασβέστιο, προκαλώντας τη μυϊκή συστολή. Καθώς το κύτταρο επανέρχεται στην κατάσταση ηρεμίας, τα ιόντα Ca^{2+} επιστρέφουν γρήγορα στο σαρκοπλασματικό δίκτυο με τη βοήθεια της αντλίας ασβεστίου. Η έξοδος των ιόντων Ca^{2+} είναι υποχρεωτικά συζευγμένη με την είσοδο ιόντων Na^+ και στην περίπτωση αυτή η κατευθυντήρια δύναμη του συστήματος οφείλεται στην είσοδο των ιόντων Na^+ , τα οποία διατηρούν τη βαθμίδωση συγκέντρωσης με το σύστημα $Na^+ K^+$ -ATPάσης.

1.4.5.1. Μετάδοση σημάτων στους κυτταρικούς βιοαισθητήρες - Ιοντικά Κανάλια

Η βασική αρχή για έναν κυτταρικό βιοαισθητήρα που βασίζεται σε μετρήσεις των μεταβολών του ηλεκτρικού δυναμικού των κυττάρων είναι ότι το δυναμικό αυτό μπορεί να μεταβάλλεται παρουσία κάποιων χημικών συστατικών. Στην ουσία αυτές οι μεταβολές επιτυγχάνονται με την μεσολάβηση, της απευθείας ή όχι, μεταβολής που δημιουργείται στην λειτουργία των ιοντικών καναλιών. Επομένως, είναι απαραίτητη η μελέτη των μηχανισμών των ιοντικών καναλιών, όπως η επιλεκτικότητά τους και η παρεμπόδιση της λειτουργίας τους, η οποία αποτελεί τον πιο άμεσο τρόπο μεταβολής του μεμβρανικού δυναμικού, καθώς υπάρχουν και τρόποι έμμεσης μεταβολής του, μέσω περίπλοκων κυτταρικών μονοπατιών. Ο συνδυασμός της εκλεκτικά διαπερατής κυτταρικής μεμβράνης και των σύνθετων μηχανισμών μεταφοράς, επιτρέπει στο κύτταρο να διατηρεί πολύ διαφορετικές συγκεντρώσεις ιόντων, στο εσωτερικό και στο εξωτερικό του, οι οποίες οδηγούν σε μια διαφορά δυναμικού μέσα και έξω από την κυτταρική μεμβράνη. Μια

ισορροπία δυναμικού (resting potential) επιτυγχάνεται με την ισορροπία των χημικών και ηλεκτρικών δυνάμεων επί των ιόντων. Στην κατάσταση αυτή δεν παρατηρείται ροή ιόντων και το διαμεμβρανικό δυναμικό παραμένει σταθερό. Η κατανομή των ιόντων εντός και εκτός του κυττάρου καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά διαπερατότητας της λιπιδιακής διπλοστιβάδας και από την δραστηριότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς.

Η κίνηση των ιόντων μέσα και έξω από το κύτταρο, αποτελεί την βάση για την ηλεκτρική δραστηριότητα των κυττάρων και η αναγκαιότητα διακίνησης τους εξυπηρετείται από την ύπαρξη των ιοντικών καναλιών, των οποίων ο ρόλος έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς το διπλό στρώμα της κυτταρικής μεμβράνης δεν είναι περατό για τα ιόντα. Η λειτουργία των ιοντικών καναλιών είναι να επιτρέπει σε συγκεκριμένα ανόργανα ιόντα, πρωτίστως Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ή Cl^- , να περάσουν γρήγορα κάτω από τα ηλεκτροχημικά τους δυναμικά τους, πέρα από το διπλό λιπιδιακό στρώμα. Αυτή η δυνατότητα να ελέγχονται οι ιοντικές ροές μέσω αυτών των καναλιών είναι ουσιαστική για πολλές λειτουργίες των κυττάρων. Τα γενικά δομικά χαρακτηριστικά των ιοντικών καναλιών, η θέση τους στο κύτταρο και ο σημαντικός λειτουργικός τους ρόλος τα καθιστούν στόχους για την ανάπτυξη φαρμακευτικών ουσιών.

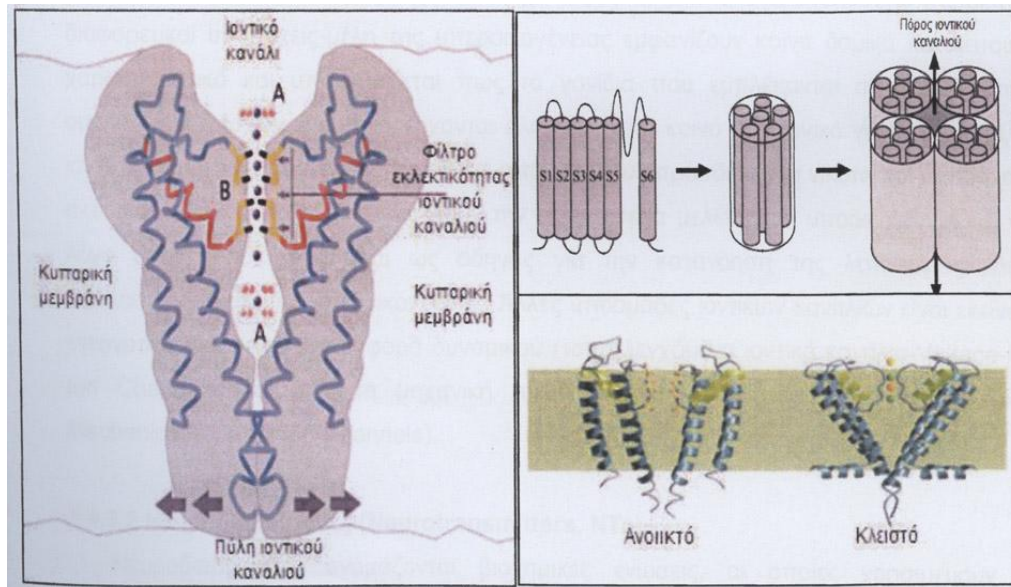
Τα ιοντικά κανάλια, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες-μεταφορείς, διαμορφώνουν υδρόφιλους πόρους που εκτείνονται διαμεμβρανικά, οι οποίοι μόλις ανοίξουν, επιτρέπουν στις διαλυτές ουσίες να περάσουν μέσα από αυτούς. Η κατευθυντήρια δύναμη για τη μεταφορά αυτή παρέχεται από το ηλεκτροχημικό δυναμικό της διαλυτής ουσίας μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού του κυττάρου. Τα περισσότερα ιοντικά κανάλια έχουν στενούς πόρους και που μπορούν να ανοίγουν και να κλείνουν. Το πιο στενό σημείο αυτών των ιδιαίτερα εκλεκτικών πόρων, αποτελεί το φίλτρο εκλεκτικότητας τους, του οποίου το μέγεθος και η μοριακή σύνθεση είναι υπεύθυνα για τον καθορισμό των ιόντων που θα διαπεράσουν το ιοντικό κανάλι. Δύο σημαντικές ιδιότητες διαχωρίζουν τα ιοντικά κανάλια από τους απλούς υδάτινους πόρους. Κατά πρώτον, εμφανίζουν ιοντική επιλεκτικότητα, επιτρέποντας έτσι σε κάποια ανόργανα ιόντα να περάσουν και σε κάποια άλλα όχι. Αυτό δείχνει πως οι πόροι τους πρέπει να είναι αρκετά στενοί σε συγκεκριμένα σημεία ώστε να εξαναγκάζουν τα ιόντα να έρθουν σε επαφή με τα τοιχώματα τους και τελικά μόνο ιόντα συγκεκριμένου μεγέθους και φορτίου να είναι σε θέση να τα διαπεράσουν. Η υψηλή τους εκλεκτικότητα δεν βασίζεται

μόνο στο μέγεθος των ιόντων, αλλά και σε μια σειρά περίπλοκων μοριακών αλληλεπιδράσεων. Κατά δεύτερον, τα ιοντικά κανάλια δεν παραμένουν συνέχεια ανοιχτά. Αντί αυτού, δρουν σαν πύλες οι οποίες ανοίγουν για λίγο και ύστερα κλείνουν ξανά. Τα κανάλια ιόντων εμφανίζουν τρεις λειτουργικές καταστάσεις: α) βρίσκονται εν ηρεμία, δηλαδή είναι κλειστά και ικανά να ενεργοποιηθούν, β) είναι ενεργά, ανοιχτά και γ) βρίσκονται σε κατάσταση ανερεθιστότητας, δηλαδή είναι κλειστά και ανίκανα να ενεργοποιηθούν. Τις περισσότερες φορές η πύλη ανοίγει αντιδρώντας σε κάποιο συγκεκριμένο ερέθισμα.

Για την κατανόηση των ιδιοτήτων των ιοντικών καναλιών είναι απαραίτητη η γνώση της γενικής δομής τους (Σχήμα 1.10). Η κοινή δομή τους περιλαμβάνει έναν κεντρικό υδατοπληρούμενο πόρο διαμέσου του οποίου διακινούνται τα ιόντα. Ο πόρος σχηματίζεται συνήθως από τέσσερις έως πέντε υψηλής ομολογίας διαμεμβρανικές δομές α-έλικας, οι οποίες μπορεί να ανήκουν και σε διαφορετικές υπομονάδες. Η κάθε περιοχή από αυτές, αποτελείται από έξι διαμεμβρανικά χάσματα (S1- S6) και σε κάθε περιοχή υπάρχει μια θηλιά μεταξύ των τμημάτων πέντε και έξι. Πιστεύεται ότι το φίλτρο εκλεκτικότητας του ιοντικού καναλιού αποτελείται από τέσσερα αμινοξέα. Στα κανάλια ασβεστίου αυτό αποτελείται από τέσσερις γλουταμινικές περιοχές, ενώ στα κανάλια νατρίου υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές αμινοξικές περιοχές, ασπαρτικού οξέος, γλυκίνης, λυσίνης και αλανίνης. Η αντικατάσταση των τεσσάρων αυτών αμινοξέων με γλουταμινικά, θα καταστήσει τα κανάλια νατρίου εκλεκτικά στο ασβέστιο. Τα τασοελεγχόμενα ιοντικά κανάλια για να λειτουργήσουν, απαιτούν την ύπαρξη μιας περιοχής ανίχνευσης του δυναμικού. Στα ιοντικά κανάλια νατρίου και ασβεστίου αυτή η περιοχή απαντάται στο διαμεμβρανικό χάσμα S4, το οποίο κινείται ανταποκρινόμενο σε κάποιο ανάλογο σήμα και προκαλεί έτσι κάποια διαφορά δυναμικού.

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

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



Σχήμα 1.10: Δομή ιοντικών καναλιών και απεικόνιση κλειστών και ανοικτών ιοντικών καναλιών, (Gilchrist 2003)

1.4.5.2. Νευροδιαβιβαστές (Neurotransmitters, NTs)

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

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

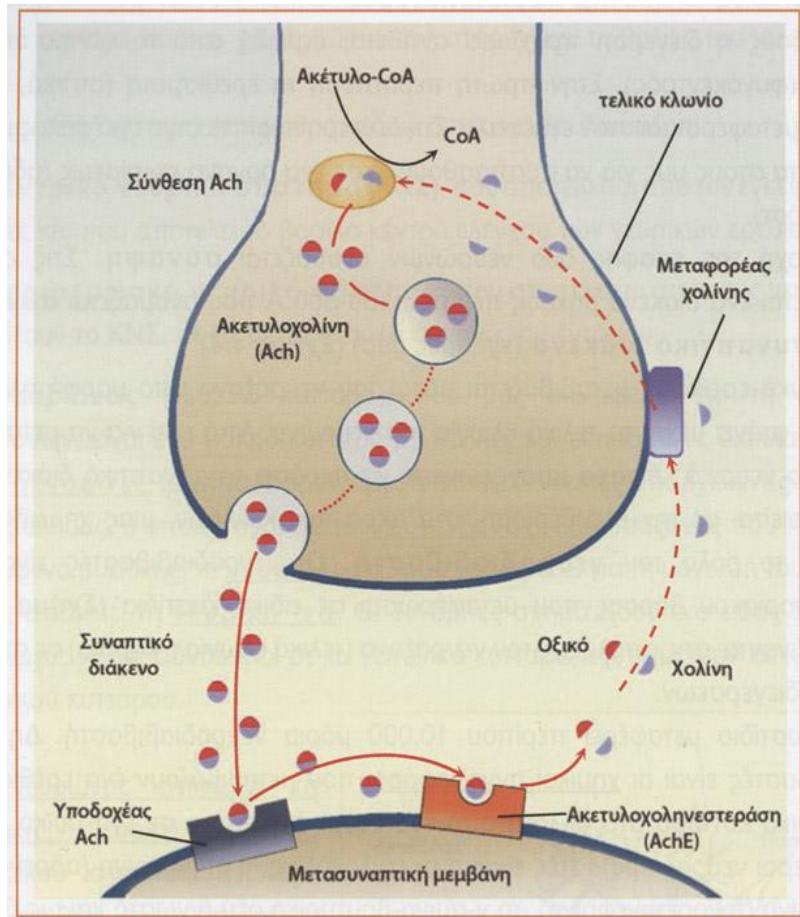
1.4.5.3. Ακετυλοχολίνη και ακετυλοχολινεστεράση

Η ακετυλοχολίνη, (Acetylcholine-ACh), το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση, (εστεράση της χολίνης-Acetylcholinesterase, AChE), είναι γνωστό ως ο κύριος μεταβιβαστής των ερεθισμάτων κατά μήκος των συνάψεων μεταξύ γειτονικών άκρων νεύρων και κατά μήκος των νευρομυϊκών συνδέσμων συγκεκριμένων νευρώνων του αυτόνομου νευρικού συστήματος, όπως επίσης και πολλών νευρώνων του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η ακετυλοχολίνη συντίθεται στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων, με την καταλυτική δράση του ενζύμου ακετυλο-τρανσφεράση της χολίνης, (Choline Acetyl Transferase, Chat), από τη χολίνη και το ακετυλοσυνένζυμο Α, (ακετυλ-CoA), το οποίο χρησιμεύει ως δότης της ακετυλικής ομάδας. Από τις δύο αυτές ουσίες, το ακετυλ-CoA συντίθεται στα μιτοχόνδρια, που αφθονούν στις νευρικές απολήξεις, ενώ η χολίνη προσλαμβάνεται στη νευρική απόληξη από τον εξωκυττάριο χώρο με τη μεσολάβηση μιας νατριοεξαρτώμενης πρωτεΐνης-μεταφορέα.

Μετά τη σύνθεση της, μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα σε ειδικά κυστίδια, τα λεγόμενα συνοπτικά κυστίδια, (103-104 μόρια/κυστίδια) όπου και εναποθηκεύεται και από όπου εκκρίνεται στην συνοπτική σχισμή. Κατά την αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και την ανάπτυξη του δυναμικού δράσης, ελευθερώνονται ιόντα Ca^{2+} , που αντιδρούν με μια πρωτεΐνη της μεμβράνης των αποθηκευτικών κυστιδίων, τη συναπτοταγμίνη, αποσταθεροποιώντας την και απελευθερώνοντας έτσι την ACh από την προσυναπτική μεμβράνη με τον μηχανισμό της εξωκύτωσης. Μετά την απελευθέρωση της, η ACh διανύει τη συνοπτική σχισμή και διεγείρει τους υποδοχείς της στη

μετασυναπτική μεμβράνη. Εν συνεχεία, διασπάται με υδρόλυση, στο συνοπτικό χάσμα, καταλυόμενη από το ένζυμο AChE, προς χολίνη και οξικό οξύ, τα οποία είναι αδρανή προϊόντα, (Σχήμα 1.11). Τα προϊόντα υδρόλυσης της ACh, προσλαμβάνονται με ενεργητική μεταφορά από το προσυναπτικό κύτταρο για την εκ νέου σύνθεση της. Παρεμπόδιση της ακετυλοχολινεστεράσης, σημαίνει ότι η ακετυλοχολίνη παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, δηλαδή συσσωρεύεται στα άκρα των νεύρων, οι λειτουργίες των οποίων διαταράσσονται και η βλάβη αυτή μπορεί να προκαλέσει τον θάνατο. Συνήθως στα ασπόνδυλα η διαταραχή αυτή προκαλεί παράλυση του αναπνευστικού συστήματος.

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



Σχήμα 1.11: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της ακετυλοχολίνης σε μία χολινεργική σύναψη (Ζιώγας, Μαρκόγλου 2007)

1.4.5.4. Υποδοχέας της ακετυλοχολίνης

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

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

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

1.4.6. Βελτίωση κυτταρικών βιοαισθητήρων

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

- Χρησιμοποιώντας κύτταρα που εμφανίζουν εξειδικευμένη απόκριση με φυσικό τρόπο. Αυτή η προσέγγιση, όμως, βασίζεται στην διαθεσιμότητα τέτοιων κυτταρικών συστημάτων.
- Επιλέγοντας κύτταρα (συνήθως *in vitro*), που χαρακτηρίζονται από αποκρίσεις βελτιωμένης εκλεκτικότητας και ευαισθησίας ως προς κάποια συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία. Ωστόσο, οι κυτταρικές αυτές καλλιέργειες τείνουν να

παραλλάσσονται σημαντικά ύστερα από επαναλαμβανόμενες υποκαλλιέργειες, χάνοντας έτσι με το χρόνο ένα τμήμα της εξειδίκευσης τους.

- Παρεμποδίζοντας ορισμένα ανεπιθύμητα μεταβολικά μονοπάτια ή συστήματα μεταφοράς.
- Χρησιμοποιώντας περισσότερους από ένα μεταβολικούς τύπους κυττάρων.
- Μετασχηματίζοντας τα κύτταρα, έτσι ώστε να εκφράζεται ένας υποδοχέας στην επιφάνεια τους, εξειδικευμένο ως προς την αναλυτέα ουσία ή να εκφράζεται κάποιο συστατικό του μεταβολισμού, εξειδικευμένο ως προς την επιθυμητή αναλυτέα ουσία. Οι εξελίξεις που σημειώνονται στον τομέα της μεμβρανικής και της γενετικής μηχανικής, θα επιτρέψουν τον σχεδιασμό κυτταρικών βιοαισθητήρων υψηλής εξειδίκευσης και επιλεκτικότητας, υπό ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες.
- Τέλος, μια προσέγγιση που θα μπορούσε να μειώσει την επίδραση του περιβαλλοντικού αυτού "θορύβου", είναι η χρήση ενός ελεγχόμενου κυτταρικού πληθυσμού, ο οποίος θα είναι εκτεθειμένος στις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες με τα κύτταρα εκείνα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο, με τη διαφορά ότι θα απουσιάζει η έκθεση τους σε κάποιο δείγμα. Η χρήση ταυτόχρονων διαφορετικών μετρήσεων κυτταρικών σημάτων, μπορεί να επιτρέψει την εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών για τα κυτταρικά σήματα παρουσία περιβαλλοντικών μεταβολών. Κάθε περιβαλλοντική αλλαγή θα έχει ως αποτέλεσμα μια απόκριση κοινότυπου χαρακτήρα η οποία θα μπορεί να απορριφθεί, αφού τα επιθυμητά σήματα θα προκαλέσουν μια διαφορετική απόκριση. Παρόλα αυτά υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί στην συγκεκριμένη προσέγγιση, καθώς τα κύτταρα δεν παρουσιάζουν τέλεια ομοιομορφία και μπορεί να αντιδράσουν με διαφορετικό τρόπο στο ίδιο περιβαλλοντικό ερέθισμα.

1.4.7. Ανίχνευση τοξικών ουσιών με τη χρήση κυτταρικών βιοαισθητήρων

Μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις που έχει να αντιμετωπίσει η τεχνολογία των βιοαναλυτικών συστημάτων, είναι η επιτυχής ανίχνευση και ο προσδιορισμός πολυάριθμων τοξικών ουσιών, σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, με μεγάλη ακρίβεια και

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

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

2.1. Εισαγωγή στα βαρέα μέταλλα

Τα βαρέα μέταλλα ανήκουν σε ένα ασαφές υποσύνολο στοιχείων που παρουσιάζουν μεταλλικές ιδιότητες, και περιλαμβάνει κυρίως μεταβατικά μέταλλα, ορισμένα μεταλλοειδή, λανθανίδες και ακτινίδες. Πολλοί διαφορετικοί ορισμοί έχουν προταθεί-ορισμένοι με βάση την πυκνότητα όπως η ομάδα μετάλλων που η πυκνότητά τους είναι πάνω από 4 ή 5 ή 6 g/cm³, άλλοι με το ειδικό τους βάρος είναι μεγαλύτερο από 4 ή 5 και άλλοι με τις χημικές ιδιότητες ή την τοξικότητα. Ο όρος βαρύ μέταλλο έχει χαρακτηριστεί "παρερμηνεία" σε μια τεχνική έκθεση της IUPAC, λόγω του αντιφατικού ορισμού και της έλλειψης μίας «συνεκτικής επιστημονικής βάσης» και χρησιμοποιείται συνήθως για τα ακόλουθα μέταλλα: κάδμιο (Cd), χρώμιο (Cr), χαλκός (Cu), υδράργυρος (Hg), νικέλιο (Ni), μόλυβδος (Pb) και ψευδάργυρος (Zn). Υπάρχει επίσης και ο εναλλακτικός όρος τοξικό μέταλλο, για τον οποίο δεν υπάρχει ακριβής ορισμός. Όπως αναλύεται στη συνέχεια, τα βαρέα μέταλλα μπορεί να περιλαμβάνουν στοιχεία ελαφρύτερο από τον άνθρακα και να αποκλείουν ορισμένα από τα βαρύτερα μέταλλα.

Κυρίως τέσσερα στοιχεία, ο υδράργυρος (Hg), ο μόλυβδος (Pb), το κάδμιο (Cd) και το αρσενικό (As) (παρότι μη αустηρά μέταλλο) είναι αυτά που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο περιβαλλοντικό κίνδυνο εξαιτίας της εκτεταμένης χρήσης τους και ανίχνευσής τους, της τοξικότητάς τους και της ευρείας κατανομής τους. Κανένα από τα παραπάνω στοιχεία δεν έχει διεισδύσει μέχρι σήμερα στο περιβάλλον σε τέτοια έκταση, ώστε ν' αποτελέσει εκτεταμένο κίνδυνο. Εν τούτοις, το κάθε ένα έχει ανιχνευθεί σε τοξικά επίπεδα σε συγκεκριμένα μέρη τα τελευταία χρόνια.

Τα βαρέα μέταλλα είναι φυσικά παρόντα στα πετρώματα και τα μεταλλεύματα και γι' αυτό εμφανίζονται πάντα στο έδαφος, τα ιζήματα, τα προϊόντα και σε ζωντανούς οργανισμούς. Η υπερβολική, ασυνήθιστη συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων σε ιδιαίτερα μέσα οδηγεί σε μόλυνση. Τα μέταλλα - σε αντίθεση με τις περισσότερες τοξικές οργανικές ενώσεις - δεν αποικοδομούνται, και γι' αυτό συσσωρεύονται στο περιβάλλον. Τελικά, ένα μέρος αυτών καταλήγει με τη βιολογική τροφική αλυσίδα στον άνθρωπο, στον οποίο προκαλούν χρόνιες ή οξείες βλάβες.

2.2. Πηγές βαρέων μετάλλων και μόλυνση

A. Μη Σημειακές πηγές βαρέων μετάλλων

- **Φυσικές πηγές :** Φυσικές διεργασίες όπως η αποσάθρωση και η διάβρωση των πετρωμάτων και του εδάφους απελευθερώνουν συχνά τα βαρέα μέταλλα στα υδάτινα οικοσυστήματα και στον αέρα. Άλλες μη σημειακές συνεισφορές προέρχονται από τη σήψη των φυτών και τα κατάλοιπα των ζώων, την ατμοσφαιρική εναπόθεση των αερομεταφερόμενων μορίων από την ηφαιστειακή δραστηριότητα, τη διάβρωση που προκαλεί ο αέρας, τον καπνό της δασικής πυρκαγιάς, τα εκκρίματα των φυτών κλπ. Λόγω των φυσικών πηγών, τα φυσικά επιφανειακά νερά περιέχουν πάντοτε ίχνη μετάλλων.
- **Ανθρωπογενείς πηγές :** Οι επιφανειακές απορροές από μεταλλεία και μεταλλευτικές δραστηριότητες έχουν συνήθως χαμηλό pH και περιέχουν υψηλά επίπεδα μετάλλων όπως ο σίδηρος, το μαγγάνιο, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το νικέλιο και το κοβάλτιο. Η καύση των φυσικών καυσίμων μολύνει την ατμόσφαιρα με σύμπλοκα μετάλλων που στη συνέχεια εναποτίθενται στην επιφάνεια του εδάφους. Οι απορροές με τα νερά των βροχών σε αστικές περιοχές περιέχουν συχνά μέταλλα από τους δρόμους και την ατμοσφαιρική σκόνη. Οι γεωργικές δραστηριότητες με τη χρήση λιπασμάτων υψηλών συγκεντρώσεων σε μέταλλα, φυτοφαρμάκων, ξηρών ουσιών, συντηρητικών μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση των συγκεντρώσεων σε υδάτινα οικοσυστήματα μέσω της απορροής.

B. Σημειακές πηγές βαρέων μετάλλων

- **Ανθρωπογενείς πηγές :** Στα απόβλητα των αποχετεύσεων περιέχονται μέταλλα από μεταβολικά απόβλητα, διαβρώσεις των υδροσωλήνων και καταναλωτικά προϊόντα. Βιομηχανικά απόβλητα και λάσπη αποβλήτων από πολλούς τομείς της βιομηχανικής δραστηριότητας που σχετίζονται με τη χρήση μετάλλων (μεταλλουργίας και κατασκευής μεταλλικών αντικειμένων, ηλεκτρονικών, χρωμάτων και χρωστικών, υφασμάτων, χάρτου κλπ.) αυξάνουν το φορτίο των μετάλλων σε υδάτινα οικοσυστήματα. Αγροτικά απόβλητα όπως τα απορρίμματα χοίρων και πουλερικών, οι κοπριές και τα λύματα αλλά και η αποτέφρωση αστικών και μη αποβλήτων (διαρροές, ατμοσφαιρική καθίζηση, διάβρωση των αποβλήτων) οδηγούν στην ρύπανση των επιφανειακών υδάτων με βαρέα μέταλλα.

Τα βαρέα μέταλλα στα επιφανειακά νερά μπορούν να βρεθούν είτε ως διαλυμένα ή ως δεσμευμένα σε μικροσωματίδια υδροξειδίων, οξειδίων κλπ. Η διαλυτή φάση είναι συνήθως ως ιόντα και οργανομεταλλικά σύμπλοκα. Η δυναμική τους συμπεριφορά στα επιφανειακά νερά εξαρτάται από τη σύνθεση των ιζημάτων και της χημείας του νερού. Ίζημα αποτελούμενο από λεπτή άμμο και λάσπη, γενικά περιέχει υψηλά επίπεδα προσροφημένων μετάλλων ενώ η παρουσία χουμικών οξέων, οργανο-αργίλων και οργανο-οξειδίων είναι περιοριστική ως προς την διαλυτή διαθεσιμότητά τους. Η χημεία του νερού καθορίζει το ποσοστό απορρόφησης και προσρόφησης των μετάλλων από και προς το ίζημα. Η προσρόφηση αφαιρεί το μέταλλο από την υδάτινη στήλη και αποθηκεύει το μέταλλο στο υπόστρωμα. Η απορρόφηση επιστρέφει το μέταλλο στην υδάτινη στήλη, όπου η επανακυκλοφορία και η βιοαφομοίωση μπορούν να πραγματοποιηθούν. Τα μέταλλα μπορούν να εκροφηθούν από το ίζημα εάν το νερό εμφανίσει συνθήκες αύξησης της αλατότητας, μείωσης της οξειδοαναγωγικής ικανότητας, ή μείωσης του pH.

2.3. Τοξικότητα των βαρέων μετάλλων

Για τη διαβίωση τους, η πλειοψηφία των οργανισμών χρειάζονται ίχνη βαρέων μετάλλων όπως ο χαλκός, το μαγγάνιο, ο σίδηρος, το κοβάλτιο, ο ψευδάργυρος, το

χρώμιο, το σελήνιο και το μολυβδαίνιο. Τα περισσότερα από τα ιχνοστοιχεία είναι συστατικά των ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών που είναι σημαντικά για τις μεταβολικές διαδικασίες. Οι συγκεντρώσεις των απαραίτητων ιχνομετάλλων στους οργανισμούς είναι συνήθως ομοιοστατικά ελεγχόμενες και έτσι ώστε η λήψη από το περιβάλλον να ρυθμίζεται ανάλογα με τη θρεπτική απαίτηση. Τα αποτελέσματα στους οργανισμούς είναι προφανή όταν ο μηχανισμός πρόσληψης παραβιάζεται είτε ως αποτέλεσμα της ανεπάρκειας πηγών ή λόγω υπερβολικού φορτίου μετάλλου (τοξικότητα). Οι οργανισμοί είναι σε θέση να ανεχτούν τις μικρές διακυμάνσεις στη συγκέντρωση των πιο πολλών ιχνομετάλλων ενώ επίσης πολλοί οργανισμοί είναι σε θέση να ρυθμίσουν τις συγκεντρώσεις μετάλλων στους ιστούς τους. Τα ψάρια και τα αρθρόποδα οστρακόδερμα, μπορούν να εκκρίνουν ουσιώδη μέταλλα, όπως ο χαλκός, ο ψευδάργυρος και ο σίδηρος, τα οποία βρίσκονται σε περίσσεια. Μερικά, μπορούν επίσης να εκκρίνουν μη ουσιώδη, δευτερεύοντα μέταλλα, όπως ο υδράργυρος και το κάδμιο, αν και αυτό δεν επιφέρει μεγάλα αποτελέσματα. Η έκταση της προσρόφησης εξαρτάται από το μέταλλο, το προσροφητικό μέσο, τα φυσιοχημικά χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος (π.χ. pH, σκληρότητα ύδατος και οξειδοαναγωγική ικανότητα) και τις συγκεντρώσεις άλλων μετάλλων και σύνθετων χημικών ουσιών παρόντων στα επιφανειακά νερά. Η συγκέντρωση του μετάλλου σε βιοδιαθέσιμη μορφή δεν είναι απαραίτητως ανάλογη προς τη συνολική συγκέντρωση του μετάλλου. Η τοξικότητα για τα βαρέα μέταλλα εξαρτάται ισχυρά από τη χημική μορφή του στοιχείου (speciation). Για παράδειγμα οι τοξικότητες του μεταλλικού Pb^{2+} και του Pb στη μορφή ομοιοπολικών μορίων διαφέρουν σημαντικά. Οι ενώσεις των βαρέων μετάλλων που είναι σχεδόν πλήρως αδιάλυτες περνούν μέσα από το οργανισμό χωρίς να προκαλέσουν σημαντικά προβλήματα.

Βαρέα μέταλλα όπως ο μόλυβδος, ο υδράργυρος, το κάδμιο και το αρσενικό είναι επικίνδυνα στη μορφή των ιόντων τους και όταν είναι συνδεδεμένα με μικρές αλυσίδες ατόμων άνθρακα. Βιοχημικά, ο μηχανισμός της τοξικής δράσης τους οφείλεται στην ισχυρή συγγένεια των μεταλλοκατιόντων τους με το θείο. Έτσι οι σουλφυδρυλικές ομάδες, -SH, οι οποίες συχνά εμφανίζονται στα ένζυμα που ελέγχουν την ταχύτητα των κρίσιμων μεταβολικών αντιδράσεων στο ζωντανό οργανισμό, ενώνονται εύκολα με τα κατιόντα των βαρέων μετάλλων που προσλήφθηκαν με την τροφή, ή με μόρια που περιέχουν μέταλλα. Αυξημένες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων μπορούν να

προκαλέσουν ιστολογικές και μορφολογικές αλλαγές στους ιστούς και αλλαγές στη φυσιολογία, βιοχημεία, συμπεριφορά και αναπαραγωγή των υδρόβιων οργανισμών.

2.3.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα των μετάλλων

Αρκετοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα των μετάλλων σε σχέση με τη λειτουργία και την ανάπτυξη των ζωντανών οργανισμών αναφορικά με τις μεταβολικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα και επιδρούν καθοριστικά σε αυτούς.

Η παράμετρος θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει σημαντικά το μεταβολισμό και την τοξικότητα των ξενοβιοτικών ουσιών και ιδιαίτερα των μετάλλων. Η αύξηση της θερμοκρασίας στα υδάτινα οικοσυστήματα έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή τοξικότητα των μετάλλων στους υδρόβιους οργανισμούς ο βαθμός της οποίας εξαρτάται από το είδος του οργανισμού και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μετάλλου.

Επίσης, το pH είναι σημαντικός αβιοτικός παράγοντας που προσδιορίζει σε μεγάλο βαθμό την πρόσληψη μετάλλων από φυτικούς οργανισμούς στο έδαφος, επηρεάζει τη διάχυση των μετάλλων υπό μορφή αλάτων μέσα από τα εδαφικά στρώματα και τα ιζήματα. Η τοξική δράση των βαρέων μετάλλων στα νερά οφείλεται αρκετές φορές στις όξινες εναποθέσεις, η οποίες οδηγούν στη μετατροπή των μετάλλων και των ενώσεών τους σε περισσότερο τοξικές δομές.

Η τοξικότητα των μετάλλων αυξάνεται, όπως είναι φυσικό με την αύξηση των συγκεντρώσεων στο περιβάλλον και στους βιολογικούς ιστούς, τα μίγματα μετάλλων παρουσιάζουν συνεργική δράση και ορισμένα μέταλλα μπορούν να εκτοπίσουν άλλα χρήσιμα μέταλλα για τη λειτουργία των οργανισμών. Τα βαρέα μέταλλα παρουσιάζουν καρκινογόνο δράση μέσω οξειδωτικών μηχανισμών στο κυτταρικό DNA.

2.4. Χαρακτηριστικά συγκεκριμένων βαρέων μετάλλων

- **Αρσενικό:** Αποτελεί ίσως το πιο τοξικό μεταλλοειδές στοιχείο και σε μεγάλες ποσότητες είναι πολύ επικίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Στα νερά υπάρχει σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (0.5-2.0 $\mu\text{g/L}$ με 0.62 $\mu\text{g/L}$ μέση τιμή παγκοσμίως) λόγω της αποσάθρωσης των πετρωμάτων και του εδάφους με μεταλλεύματα φωσφορικών

αλάτων. Εντούτοις, ανθρωπογενείς πηγές μπορούν συμβάλλουν στην ιδιαίτερη μόλυνση του περιβάλλοντος με αρσενικό λόγω των χρήσεών του όπως: χρωστικές ουσίες, φαρμακευτικά είδη, φυτοφάρμακα, συντηρητικά ξύλου, πρόσθετες ουσίες τροφών πουλερικών και χοίρων, καύση των φυσικών καυσίμων, απορρυπαντικά, μεταλλεία, κράματα μολύβδου για τις σφαίρες και τα μπαρουτόβολα. Στα φυσικά νερά, εμφανίζονται κυρίως οι μορφές, As^{+5} , As^{+3} και μεθυλιωμένο As. Σχηματίζει ποικίλες ανόργανες και οργανικές ενώσεις διαφορετικής τοξικότητας στους υδρόβιους οργανισμούς.

Η τοξικολογική σημασία του αρσενικού συνδέεται με την ομοιότητά του με το φώσφορο. Αυτό επιφέρει το σπάσιμο των μεταβολικών αλυσίδων από το αρσενικό. Η απορρόφηση του αρσενικού μπορεί να επιφέρει εμετούς, διάρροιες, και καρδιακές ανωμαλίες. Η οξεία δηλητηρίαση από αρσενικό μπορεί να προκύψει από την απορρόφηση περισσότερου από περίπου 100 mg του στοιχείου. Η χρόνια δηλητηρίαση εμφανίζεται με την απορρόφηση μικρών ποσών αρσενικού σε μεγάλο χρονικό διάστημα. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι το στοιχείο είναι καρκινογόνο. Το μεγαλύτερο επιτρεπτό όριο του αρσενικού στο νερό πόσης είναι 10 µg/L.

- **Υδράργυρος:** Ο Hg είναι το μόνο μέταλλο που βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου σε υγρή μορφή, και επειδή διαστέλλεται ομοιόμορφα με την αύξηση της θερμοκρασίας, χρησιμοποιείται ευρέως στα ιατρικά θερμόμετρα. Συναντάται σε τρεις μορφές: στοιχειακός υδράργυρος, οργανικός και ανόργανος υδράργυρος. Είναι ο πτητικότερος απ' όλα τα μέταλλα και ο ατμός του είναι πολύ τοξικός. Ο υγρός Hg είναι ισχυρά τοξικός και το μεγαλύτερο τμήμα του αποβάλλεται. Διαχέεται από τους πνεύμονες στο αίμα και στη συνέχεια διαπερνά στον εγκέφαλο όπου προσβάλλει το νευρικό σύστημα.

Μεγάλες ποσότητες ατμών Hg απελευθερώνονται στο περιβάλλον με την καύση του άνθρακα και του πετρελαίου, που περιέχουν πάντοτε ιχνοποσότητες του στοιχείου αυτού, καθώς και με την αποτέφρωση στερεών αποβλήτων που περιέχουν προϊόντα με Hg όπως οι μπαταρίες. Αυτή η πηγή ατμοσφαιρικού Hg έχει αυξηθεί σημαντικά στον 20^ο αιώνα και τώρα συναγωνίζεται την εκπομπή από τα ηφαίστεια.

Στην ατμόσφαιρα, η πλειονότητα του Hg είναι στην αέρια κατάσταση, και μόλις ένα πολύ μικρό ποσοστό του είναι συνδεδεμένο με αιωρούμενα σωματίδια. Ο

ατμοσφαιρικός υγρός Hg μπορεί να ταξιδεύει μεγάλες αποστάσεις πριν αποτεθεί στη γη ή στα υδατικά συστήματα. Οργανικές ενώσεις του Hg χρησιμοποιούνται ως μυκητοκτόνα στη γεωργία και τη βιομηχανία και καταλήγουν στο περιβάλλον ως αποτέλεσμα των εφαρμογών αυτών. Κατά την επαφή όμως των ενώσεων αυτών με το έδαφος διασπώνται και ο υδράργυρος παγιδεύεται υπό μορφή αδιάλυτων ενώσεων με τις θειικές ομάδες σε αργιλώδες και οργανικό υλικό. Το μέγιστο επιτρεπτό όριο στο πόσιμο νερό είναι 1 µg/L.

- **Χρώμιο:** Το χρώμιο είναι ένα στοιχείο που υπάρχει σε πετρώματα, στα ζώα, στα φυτά, στο έδαφος και στη σκόνη και στα αέρια ηφαιστειών. Υπάρχουν δύο μορφές ειδών χρωμίου που μπορούν να βρεθούν στο νερό: χρώμιο Cr+3 και χρώμιο Cr+6. Η τρισθενής μορφή είναι περισσότερο άφθονη στα φυσικά νερά. Το χρώμιο εισάγεται στο νερό κυρίως από ανθρωπογενές πηγές όπως εργοστάσια ηλεκτροεπιμεταλλώσεων, επεξεργασίας δέρματος και εγκαταστάσεις παραγωγής υφαντών, επεξεργασία ξύλου, καίγοντας άνθρακα και πετρέλαιο, παραγωγή χάλυβα και ανοξειδωτού χάλυβα (περιέχει 12-15% χρώμιο), παραγωγή ραδιοφώνων και βίντεο και στα laser. Η μέση τιμή σε ποταμούς παγκοσμίως είναι 0.7 µg/L ενώ έχουν μετρηθεί και τιμές έως 20 µg/L στον ποταμό Ρήνο το 1988.

Η τοξικότητα του χρωμίου στους υδρόβιους οργανισμούς είναι συνήθως χαμηλή. Το τρισθενές χρώμιο είναι απαραίτητο για αρκετούς οργανισμούς ενώ το εξασθενές είναι πολύ τοξικό στη χλωρίδα και πανίδα. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο υδράργυρος, το κάδμιο, ο χαλκός, ο μόλυβδος, το νικέλιο κι ο ψευδάργυρος είναι περισσότερο τοξικά από το χρώμιο. Οι χρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία είναι αναπνευστικές και δερματολογικές. Οι επιπτώσεις στην υγεία από την έκθεση σε εξασθενές χρώμιο περιλαμβάνουν τη διάρροια, τη στομαχική και την εντερική αιμορραγία, και τη ζημία συκωτιού και νεφρών. Τα τοξικά αποτελέσματα μπορούν να μεταφερθούν προς τα παιδιά μέσω του πλακούντα. Επιπλέον, σε περίπτωση χρόνιας έκθεσης σε χρώμιο μέσω σκόνης, το στοιχείο μπορεί να είναι καρκινογόνο στο αναπνευστικό σύστημα. Το μέγιστο επιτρεπτό όριο για το πόσιμο νερό είναι 50 µg/L.

- **Χαλκός:** Ο χαλκός είναι από τα πρώτα μέταλλα που χρησιμοποίησε ο άνθρωπος και οι ενώσεις του είναι ευρέως κατανεμημένες στη φύση συμπεριλαμβανομένου των επιφανειακών νερών και κάποιων υπόγειων νερών. Εμφανίζεται με τη μορφή διαλυμένων ή αδιάλυτων ενώσεων. Σε νερά με μεγάλες συγκεντρώσεις υδρογονανθράκων, ο χαλκός βρίσκεται ως ιόντα Cu^{2+} και με μορφή συμπλόκων. Σχηματίζει ενώσεις και σύμπλοκα με τα πυριτικά άλατα, σουλφίδια, νιτρικά άλατα και φωσφορικά άλατα. Μεταξύ των οργανικών ενώσεων υπάρχουν σύμπλοκα Cu με αμινοξέα, πολυπεπτίδια και χουμικές ουσίες. Μείωση του διαλυμένου οξυγόνου του νερού, της σκληρότητας, της θερμοκρασίας, του pH μπορούν να αυξήσουν την τοξικότητα Cu^{2+} .

Μόλυνση χαλκού μπορεί να προέλθει κυρίως από τις ακόλουθες πηγές: μετάλλευση και μεταλλουργία (βιομηχανικά λύματα), παραγωγή κραμάτων Cu (ορείχαλκος, μπρούντζος), διάβρωση των καλωδίων και των συσκευών που είναι φτιαγμένες από χαλκό, μπρούντζο, ή ορείχαλκο, υπερβολική χρήση των φυτοφαρμάκων που περιέχουν χαλκό. Οι διαλυτές ενώσεις του χαλκού αποτελούν τη μεγαλύτερη απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Συνήθως οι υδατοδιαλυτές ενώσεις χαλκού εμφανίζονται στο περιβάλλον κατά την αποδέσμευσή τους κατά τη διάρκεια γεωργικών εφαρμογών. Η μέση τιμή σε μεγάλους ποταμούς παγκοσμίως είναι 1.48 $\mu\text{g/L}$.

Ο χαλκός είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο συστατικό για τον ανθρώπινο μεταβολισμό. Η καθημερινή απαίτηση Cu από έναν ενήλικα ισούται με 1.25 mg (WHO 1996). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του χαλκού είναι επιβλαβείς για την υγεία. Επειδή ο χαλκός δεν συσσωρεύεται στον οργανισμό τόσο εύκολα όπως ο υδράργυρος ή ο μόλυβδος, έχει καθοριστεί πως για να είναι επιβλαβής, η ημερήσια δόση χαλκού πρέπει να φτάνει τόσο ψηλά όσο τα 100 mg. Συγκεντρώσεις χαλκού πάνω από 1 mg/L μπορεί να είναι επιβλαβείς για τα ψάρια και να περιορίζει επίσης την ανάπτυξη της βλάστησης. Η τοξική επίδραση στα ψάρια περιλαμβάνει επίσης αλλαγές στην βιοχημεία, ανατομία, φυσιολογία, ανάπτυξη και συμπεριφορά τους.

Το μέγιστο επιτρεπτό όριο της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το πόσιμο νερό είναι 0.1-3.0 mg/L αλλά για τα ψάρια και την υδρόβια ζωή είναι πολύ μικρότερα (0.005-0.112 mg/L). Η αντίστοιχη τιμή της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας για τα πόσιμα νερά είναι 3 mg/L.

- **Ψευδάργυρος:** Ο ψευδάργυρος είναι σχετικά συνηθισμένο στοιχείο που βρίσκεται στο περιβάλλον. Στο νερό εμφανίζεται ως κατιόν Zn^{+2} , με μορφή διαλυτών οργανικών και ανόργανων συμπλόκων, ή αδιάλυτη μορφή - ως υδροξείδια, θειικά άλατα και ανθρακικά άλατα. Τυπικές συγκεντρώσεις στα νερά είναι από 5 έως 10 $\mu\text{g/L}$ ενώ η μέση τιμή σε μεγάλους ποταμούς παγκοσμίως είναι 0.60 $\mu\text{g/L}$.

Ο ψευδάργυρος είναι φυσικά παρών στο φλοιό της γης, με μορφή μεταλλευμάτων. Διαπερνά στα υπόγεια νερά από το έδαφος που βρίσκεται κοντά σε αποθέσεις μεταλλευμάτων ψευδάργυρου ή άλλων αποθέσεων που είναι πλούσιες σε ενώσεις ψευδάργυρου. Στα επιφανειακά νερά ο ψευδάργυρος είναι συνήθως ανθρωπογενούς προέλευσης. Ο ψευδάργυρος φτάνει στα επιφανειακά νερά με τους ρύπους σκόνης και τα βιομηχανικά λύματα (μεταλλουργία και χημικές βιομηχανίες). Οι ενώσεις ψευδαργύρου, μεταξύ άλλων, χρησιμοποιούνται, για παραγωγή χρωμάτων, βάψιμο, παραγωγή υφαντών, απολυμαντικά μέσα, συντηρητικά ξύλου κ.ά

Η πιο σχετικά διαδεδομένη πηγή του ψευδαργύρου στο περιβάλλον είναι ο γαλβανισμένος χάλυβας. Η διάθεση λυμάτων και η χρήση των λιπασμάτων είναι επίσης μια σημαντική πηγή του ψευδαργύρου στο έδαφος και το νερό. Ο ψευδάργυρος μπορεί να βρίσκεται στο νερό, κυρίως στο πόσιμο νερό, ως αποτέλεσμα διάβρωσης μετάλλων - γαλβανισμένων σωλήνων ή μηχανών. Από περιβαλλοντικής άποψης ο ψευδάργυρος είναι κυρίως τοξικός για τα φυτά, ενώ ελαφρώς τοξικός για τα ζώα και τους ανθρώπους.

Το μέγιστο επιτρεπτό όριο της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το πόσιμο νερό είναι 0.1-5 mg/L αλλά για τα ψάρια και την υδρόβια ζωή είναι πολύ μικρότερα (0.03-2.0 mg/L). Η αντίστοιχη τιμή της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας για τα πόσιμα νερά είναι 3 mg/L .

- **Νικέλιο:** Το νικέλιο είναι μια ένωση που εμφανίζεται στο περιβάλλον μόνο σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Τυπικές συγκεντρώσεις νικελίου σε ποταμούς είναι 0.3-1.0 $\mu\text{g/L}$ ενώ η μέση τιμή μεγάλων ποταμών παγκοσμίως είναι 0.8 $\mu\text{g/L}$. Εμφανίζεται με τη μορφή Ni^{2+} στο νερό και ορισμένες φορές ως ανθρακικό νικέλιο. Χρησιμοποιείται σε πολλές διαφορετικές εφαρμογές. Η πιο κοινή εφαρμογή του νικελίου είναι η χρήση του ως συστατικό του χάλυβα και σε άλλα μεταλλικά προϊόντα. Μπορεί να βρεθεί, επίσης, σε συνήθη μεταλλικά αντικείμενα όπως τα κοσμήματα, στις μπαταρίες και στις χρωστικές. Τα τρόφιμα περιέχουν φυσικώς μικρές ποσότητες νικελίου. Η σοκολάτα

και τα λίπη είναι γνωστό ότι περιέχουν σημαντικά υψηλές ποσότητες. Το νικέλιο μπορεί επίσης να βρεθεί στα απορρυπαντικά. Οι άνθρωποι μπορούν να εκτεθούν στο νικέλιο με την αναπνοή του αέρα, το πόσιμο νερό, την κατανάλωση των τροφίμων ή το κάπνισμα τσιγάρων. Η επαφή του δέρματος με το μολυσμένο από νικέλιο χώμα ή νερό, μπορεί επίσης να οδηγήσει στην έκθεση στο νικέλιο. Σε μικρές ποσότητες το νικέλιο είναι απαραίτητο, αλλά όταν η λήψη είναι πολύ υψηλή μπορεί να αποτελέσει κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία.

Ο ανθρώπινος οργανισμός περιέχει περίπου 10 mg νικελίου. Πρόσληψη πολύ μεγάλων ποσοτήτων νικελίου έχει τις ακόλουθες συνέπειες: υψηλότερες πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου των πνευμόνων, καρκίνου στη μύτη, καρκίνου στο λάρυγγα και καρκίνου του προστάτη, ασθένεια και ίλιγγο μετά από την έκθεση στο αέριο νικελίου, εμβολισμό πνευμόνων, αναπνευστική ανεπάρκεια, ανωμαλίες κατά τη γέννηση, άσθμα και χρόνια βρογχίτιδα, αλλεργικές αντιδράσεις όπως δερματικός κνησμός, κυρίως από τα κοσμήματα, καρδιακές ανωμαλίες. Καρκινογένεση - Το νικέλιο και ορισμένες ενώσεις νικελίου έχουν προσδιορισθεί ως καρκινογόνες ουσίες. Η Διεθνής Επιτροπή Έρευνας του Καρκίνου (International Agency for Research on Cancer - IARC) έχει τοποθετήσει τις ενώσεις νικελίου στην ομάδα 1 (υπάρχουν επαρκή στοιχεία για την καρκινογένεση στους ανθρώπους) και το νικέλιο στην ομάδα 2 Β (παράγοντες που είναι ενδεχομένως καρκινογόνοι στους ανθρώπους). Το μέγιστο επιτρεπτό όριο της Ευρωπαϊκής Ένωσης στα πόσιμα νερά είναι 50 µg/L.

- **Σίδηρος:** Ο σίδηρος, ένα από τα αφθονότερα μέταλλα στη γη, είναι απαραίτητος στις περισσότερες μορφές ζωής και στην κανονική ανθρώπινη φυσιολογία. Ο σίδηρος εφαρμόζεται παγκοσμίως για εμπορικούς λόγους, και παράγεται στα ποσά των 500 εκατομμυρίων τόνων ετησίως. Περίπου 300 εκατομμύρια τόνοι ανακυκλώνονται. Ο κύριος λόγος είναι ότι ο σίδηρος χρησιμοποιείται σε περισσότερες εφαρμογές από ενδεχομένως οποιοδήποτε άλλο μέταλλο. Τα κράματα σιδήρου χρησιμοποιούνται σε δοχεία, στα αυτοκίνητα, στις μηχανές πλυντηρίων, στις γέφυρες, στα κτήρια, ακόμη και στα μικρά ελατήρια. Οι ενώσεις σιδήρου εφαρμόζονται ως χρωστικές ουσίες στο γυαλί και εμπεριέχονται στα φαρμακευτικά προϊόντα, τις χημικές ουσίες, τα λιπάσματα σιδήρου, ή τα φυτοφάρμακα.

Ο σίδηρος είναι ένα αναπόσπαστο τμήμα των πρωτεϊνών και των ενζύμων που διατηρούν την καλή υγεία. Στους ανθρώπους, ο σίδηρος είναι ένα απαραίτητο συστατικό των πρωτεϊνών που λαμβάνουν μέρος στην μεταφορά οξυγόνου. Είναι επίσης απαραίτητος για την διαδικασία της ανάπτυξης των κυττάρων και τη διαφοροποίηση. Η ανεπάρκεια του σιδήρου περιορίζει την παράδοση οξυγόνου στα κύτταρα, με συνέπεια την κούραση, την κακή απόδοση στην εργασία και τη μειωμένη ανοσία. Αφ' ετέρου, τα υπερβολικά ποσά σιδήρου μπορούν να οδηγήσουν στην τοξικότητα και ακόμη και το θάνατο. Είναι ένα βασικό στοιχείο στο μεταβολισμό σχεδόν όλων των ζωντανών πλασμάτων.

Ο διαλυμένος σίδηρος έχει κυρίως τη μορφή $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ (aq) σε όξινα και ουδέτερα υδάτινα συστήματα και συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου. Σχηματίζει διάφορα σύμπλοκα με οργανικές και ανόργανες ενώσεις, οι οποίες είναι γενικά διαλυτές στο νερό. Συνήθως υπάρχει διαφορά μεταξύ υδατοδιαλυτών ενώσεων Fe^{2+} και γενικά των αδιάλυτων ενώσεων του Fe^{3+} . Η μέση τιμή του σιδήρου σε μεγάλους ποταμούς παγκοσμίως είναι 66 $\mu\text{g/L}$ αλλά μπορεί να φτάσει και 1000 $\mu\text{g/L}$. Το μέγιστο επιτρεπτό όριο της Ευρωπαϊκής Ένωσης στα πόσιμα νερά είναι 200 $\mu\text{g/L}$.

- **Μαγγάνιο:** Το μαγγάνιο είναι μια πολύ κοινή ένωση που μπορεί να βρεθεί παντού στη γη. Το μαγγάνιο είναι ένα από τα τρία απαραίτητα τοξικά ιχνοστοιχεία, το οποίο σημαίνει ότι είναι όχι μόνο απαραίτητο για τους ανθρώπους να επιζήσουν, αλλά είναι και τοξικό όταν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις είναι παρούσες στο ανθρώπινο σώμα. Το μαγγάνιο συμμετέχει σε πολλές διεργασίες όπως στο σχηματισμό του συνδετικού, νευρικού ιστού, τη σύνθεση της χοληστερόλης, το μεταβολισμό των λιπών, των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων κλπ. Η έλλειψη του στον οργανισμό δημιουργεί πόνους στα μάτια, κακή μνήμη, ζάλη και μακροχρόνιες διαταραχές αναπαραγωγής. Οι επιδράσεις υψηλών συγκεντρώσεων του μαγγανίου εμφανίζονται κυρίως στην αναπνευστική οδό και τον εγκέφαλο. Τα συμπτώματα της δηλητηρίασης μαγγανίου είναι παραισθήσεις, αφηρημάδα και βλάβη των νεύρων. Οι ενώσεις μαγγανίου είναι πειραματικά διφορούμενοι καρκινογόνοι παράγοντες. Η μέση τιμή του μαγγανίου σε μεγάλους ποταμούς παγκοσμίως είναι 34 $\mu\text{g/L}$ και το μέγιστο επιτρεπτό όριο της Ευρωπαϊκής Ένωσης στα πόσιμα νερά είναι 50 $\mu\text{g/L}$.

Μέταλλο ενδιαφέροντος	Βασική δραστηριότητα
Αρσενικό	Χρωστικές και χρώματα, εντομοκτόνα/ζιζανιοκτόνα, Μεταλλουργική επεξεργασία μετάλλων, γυαλί και κεραμικά, βυρσοδεψία
Χρώμιο και ενώσεις του	Ανοδίωση, τσιμέντο, χρωστικές, χρώματα, επιμεταλλώσεις, βυρσοδεψία
Κοβάλτιο και ενώσεις του	Καταλύτες, ίνες, χρώματα, χαρτί και χαρτοπολτός
Χαλκός και ενώσεις του	Επιμεταλλώσεις, ηλεκτρικά/ηλεκτρονικά, Επεξεργασία επιφανειών, εντομοκτόνα, απόσταξη άνθρακα, οξείδωση κυανιούχων, πλαστικά
Σίδηρος και ενώσεις του	Αλουμίνιο, επιμεταλλώσεις, χρωστικές, ηλεκτρονικά, διοξείδιο του τιτανίου
Μόλυβδος και ενώσεις του	Συσσωρευτές, τυπογραφία, εξάτμιση αυτοκινήτων, εκρηκτικά, πυροτεχνήματα, εντομοκτόνα, χρώματα, διυλιστήρια, πετροχημικά
Μαγγάνιο και ενώσεις του	Καταλύτες, συσσωρευτές, γυαλί, χρώματα, πυροτεχνήματα
Υδράργυρος: Οργανικός	Εντομοκτόνα
Υδράργυρος: Ανόργανος	Ηλεκτρικά/ηλεκτρονικά, εντομοκτόνα, συσσωρευτές, φωτογραφικά, επιστημονικά όργανα, χρώματα, φαρμακευτικά υλικά, χαρτί/χαρτοπολτός, καταλύτες, τσιμέντο, καύση άνθρακα/πετρελαίου
Κασσίτερος και ενώσεις του	Επιμεταλλώσεις
Ψευδάργυρος και ενώσεις του	Συνθετικές ίνες, επιμεταλλώσεις, χαρτί/χαρτοπολτός, επεξεργασία ελαστικών
Βηρύλλιο και ενώσεις του	Πυρηνική βιομηχανία, σιδηρούχα και μη κράματα αεροναυπηγικής
Νικέλιο και ενώσεις του	Επιμεταλλώσεις, συσσωρευτές, καταλύτες
Κάδμιο και ενώσεις του	Χρωστικές, χρώματα, επιμεταλλώσεις, πολυμερή

Πίνακας 1.1 : Βιομηχανικές πηγές απόθεσης μετάλλων στο περιβάλλον

2.5. Βαρέα μέταλλα τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Τα βαρέα μέταλλα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι ο μόλυβδος (Pb) και το κάδμιο (Cd). Πρόκειται για δύο από τα πιο τοξικά στοιχεία.

Στη συνέχεια αναφέρονται περισσότερα στοιχεία σχετικά με τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα αυτών των δύο βαρέων μετάλλων.

2.5.1. Μόλυβδος (Pb) (λατινικά:plumbum)

➤ Ιστορική αναδρομή

Ο Μόλυβδος είναι χημικό μεταλλικό στοιχείο με σύμβολο Pb. Είναι ένα από τα παλαιότερα μέταλλα που χρησιμοποιήθηκαν από την ανθρωπότητα. Η συστηματική και



Εικόνα 1.2: Κροκοΐτης PbCr₄

εντατική εκμετάλλευση των αργυρομολυβδούχων μεταλλευμάτων ξεκινά κατά τη διάρκεια της Αθηναϊκής Δημοκρατίας το 508 π.Χ. Με τον άργυρο του Λαυρίου και τη φορολογία ο Περικλής κατασκεύασε τα περίφημα μνημεία του Χρυσού Αιώνα των Αθηνών.

Μετά την κλασσική αρχαιότητα διακόπτεται κάθε σοβαρή μεταλλευτική και μεταλλουργική δραστηριότητα. Στο διάστημα 1875-1904 ξεκινά στο Λαύριο η εξόρυξη του μολύβδου, η οποία μέχρι το 1895 εξελίσσεται σε ένα ολοκληρωμένο συγκρότημα παραγωγής. Στο τέλος της δεκαετίας του 1920, η συνεχιζόμενη πτώση των τιμών του μολύβδου και η σταδιακή εξάντληση των κοιτασμάτων καθιστούν ασύμφορη την εξόρυξη του μεταλλεύματος και μειώνεται η παραγωγή του. Το συγκρότημα του Λαυρίου διέκοψε οριστικά τη λειτουργία του το 1989.



Εικόνα 1.3 Αγγλεσίτης, PbSO₄

Ο μόλυβδος ήταν γνωστός στους αρχαίους Αιγυπτίους και Βαβυλώνιους. Οι Ρωμαίοι τον χρησιμοποιούσαν για σωλήνες και συγκολλήσεις υλικών. Ο μόλυβδος ήταν ένα από τα πρώτα μεταλλεύματα που εξορύχτηκαν στην Βόρεια Αμερική. Με ειδική επεξεργασία τον χρησιμοποιούσαν για την κατασκευή σφαιριδίων.

Σήμερα χρησιμοποιείται ως συστατικό στοιχείο σε πολλά προϊόντα.

➤ **Γενικά χαρακτηριστικά του μολύβδου**

Ο μολύβδος είναι ιχνοστοιχείο και βρίσκεται φυσικά στο έδαφος και το νερό. Ο



Εικόνα 1.4: Κερρουσίτης, $PbCO_3$

μεταλλικός μολύβδος δεν διαλύεται στο νερό αλλά μπορεί να σχηματίσει ενώσεις ως Pb^{2+} . Ο σχηματισμός των ενώσεων εξαρτάται από την οξύτητα και τη θερμοκρασία του νερού. Ο μολύβδος είναι ένα μαλακό, ελατό μέταλλο, επίσης, θεωρείται ένα από τα βαρέα μέταλλα. Ο μολύβδος έχει ένα γαλάζιο χρώμα που αλλάζει σε θαμπό γκριζο χρώμα όταν εκτίθενται στον αέρα. Παρουσιάζει ασημένια γυαλάδα όταν λειώνει.

Ο μολύβδος συναντάται στο φυσικό περιβάλλον (ο γαληνίτης (ένωση μολύβδου και θείου) είναι η κύρια πηγή εξόρυξης του μετάλλου) αλλά και σε τεχνητή μορφή εκατοντάδες χρόνια και χρησιμοποιείται ως συστατικό σε πάρα πολλά προϊόντα, όπως π.χ. σε σμάλτα κεραμικών, συσσωρευτών (μπαταριών), ηλεκτροδίων συγκόλλησης, κραμάτων για σφαίρες και σκάγια, βάρη και αποτελεί μέρος του καλάι, του κασσίτερου, εύτηκτων κραμάτων και θωρακίσεων ακτινοβολίας, πλαστικά (ως σταθεροποιητής), ηλεκτρικών καλωδίων, χρωμάτων, βερνικιών κ.λπ. Άλλα ορυκτά του είναι ο κερρουσίτης, $PbCO_3$, ο αγγλεσίτης, $PbSO_4$ και ο κροκοΐτης, $PbCrO_4$.



Εικόνα 1.5: Απόβλητα από μπαταρίες Pb

Ο μολύβδος έχει τον υψηλότερο ατομικό αριθμό (82) όλων των σταθερών στοιχείων, αν και το επόμενο στοιχείο, το βισμούθιο, έχει χρόνο ημιζωής τόσο μεγάλο (μεγαλύτερο από την εκτιμώμενη ηλικία του σύμπαντος), που μπορεί να θεωρηθεί σταθερό.

Παγκοσμίως παράγονται περίπου 3,5 εκατομ. τόννοι μολύβδου τον χρόνο (στοιχεία 2007). Κυριότερες παραγωγί χώρες: Κίνα, Αυστραλία, ΗΠΑ, Περού.

Ο μολύβδος παρουσιάζει αρχικά ασημένια γυαλάδα, αλλά η επιφάνεια θαμπώνει γρήγορα στον αέρα. Είναι ένα πυκνό, όλκιμο, πολύ μαλακό, πολύ ελατό, γαλάζιο μέταλλο

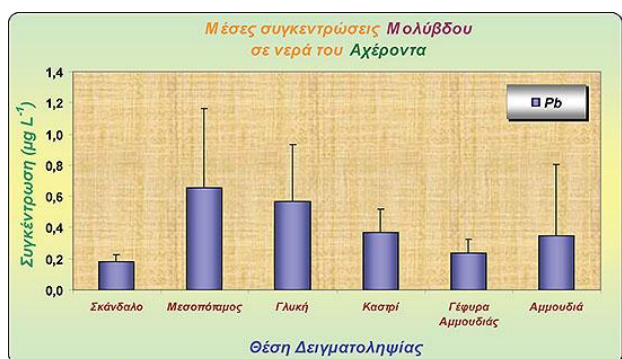
που έχει κακή ηλεκτρική αγωγιμότητα. Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικός στη διάβρωση, και λόγω αυτής της ιδιότητάς του, χρησιμοποιείται σε δοχεία διαβρωτικών υγρών (π.χ., θειικό οξύ). Επειδή είναι πολύ ελατός και ανθεκτικός στη διάβρωση χρησιμοποιείται ευρέως στον κατασκευαστικό τομέα, για παράδειγμα σε εξωτερικά καλύμματα και αρθρώσεις στεγών. Ο μόλυβδος μπορεί να σκληρυνθεί με την προσθήκη μικρής ποσότητας αντιμονίου ή άλλων μετάλλων όπως το ασβέστιο. Όλες οι μορφές μολύβδου, εκτός από την ^{204}Pb , είναι το τελικό προϊόν ραδιενεργούς διάσπασης. Ο μόλυβδος είναι δηλητηριώδης, επίσης, όπως είναι οι διάφορες οξειδωμένες μορφές του.

Το επίπεδο του μολύβδου στο έδαφος συνήθως δεν ξεπερνά τα 50 ppm, ωστόσο η συχνή χρήση του μολύβδου από τον άνθρωπο έχει προκαλέσει την αυξημένη παρουσία του στο περιβάλλον. Διεθνώς έχουν καταγραφεί και συγκεντρώσεις μολύβδου άνω των 11.000 ppm.

Οι πηγές μολύβδου στα φυσικά νερά περιλαμβάνουν επίσης τις εναποθέσεις σκόνης μολύβδου από την ατμόσφαιρα, υγρά απόβλητα από τις βιομηχανίες (κυρίως χαλυβουργίες και παραγωγής μολύβδου), αστικές απορροές και εκροές από μεταλλεία. Σήμερα, μεγαλύτερες ποσότητες μολύβδου παράγονται από την ανακύκλωση παρά από μεταλλεύματα. Η μέση τιμή σε μεγάλους ποταμούς παγκοσμίως είναι 0.079 $\mu\text{g/L}$ ενώ συγκεντρώσεις που έχουν ανιχνευθεί είναι μέχρι και 30 $\mu\text{g/L}$. Το μέγιστο επιτρεπτό όριο στα πόσιμα νερά είναι 10 $\mu\text{g/L}$ σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας και 50 $\mu\text{g/L}$ για την Ευρωπαϊκή Ένωση.

Ο μόλυβδος είναι δηλητηριώδης και μπορεί να βλάψει τις νευρικές συνδέσεις (ειδικά σε μικρά παιδιά) και να προκαλέσει διαταραχές του αίματος και του εγκεφάλου. Όπως και ο υδράργυρος, ένα άλλο βαρύ μέταλλο, ο μόλυβδος είναι ισχυρή νευροτοξίνη που συσσωρεύεται στους μαλακούς ιστούς και τα οστά σε βάθος χρόνου.

Δηλητηριάσεις από μόλυβδο έχουν αναφερθεί στην αρχαία Ρώμη, την αρχαία Ελλάδα, και την αρχαία Κίνα.



Εικόνα 1.6: Μέσες συγκεντρώσεις Pb σε νερά του Αχέροντα

➤ Χημικά χαρακτηριστικά

Κατά τη διαδικασία καύσης ο παραγόμενος μόλυβδος έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

Αντιμόνιο: λιγότερο από 0,40%

Κασσίτερο: λιγότερο από 2,00%

Βισμούθιο: λιγότερο από 0,04%

Αρσενικό: λιγότερο από 1,00%

Σίδηρο: λιγότερο από 3,00%

Κάδμιο: λιγότερο από 0,40%

Επίσης, παρουσιάζει μεγάλη αντοχή έναντι των οξέων και λόγω της υψηλής του πυκνότητας, χρησιμοποιείται στη θωράκιση κατά των ακτίνων Χ.

Σημείο τήξης (°C)	Σημείο βρασμού (°C)	Ειδικό βάρος (g/cm ³)	Αφθονία στο φλοιό της Γης (ppm)	Αφθονία στη θάλασσα (ppm)
327	1740	11,3	14	3x10⁻⁵

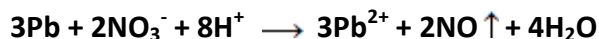
Οξειδωτικές καταστάσεις

- Η μόνη σταθερή οξειδωτική κατάσταση του Pb σε υδατικά διαλύματα είναι η Pb(II).
- Επίσης υπάρχει και η οξειδωτική κατάσταση Pb(IV), που δεν παρέχει άλατα σταθερά σε υδατικά διαλύματα. Τυπική ένωση του Pb(IV) είναι το PbO₂ (ισχυρό οξειδωτικό αντιδραστήριο), όπως και ο Pb(CH₃COO)₄, που μπορεί να διαλυθεί σε άνυδρο CH₃COOH χωρίς να διασπαστεί και χρησιμοποιείται ως ισχυρό οξειδωτικό στην οργανική σύνθεση.

Διαλυτοποίηση του μολύβδου

- Ο Pb προσβάλλεται από όλα τα οξέα, αλλά επειδή πολλά από τα άλατά του είναι δυσδιάλυτα στο νερό ή στην περίσσεια του οξέος, καλύπτεται από στρώμα αδιάλυτου άλατος που τον προστατεύει από περαιτέρω προσβολή. Ο Pb(NO₃)₂ είναι διαλυτός στο νερό, αλλά επειδή είναι ένα από τα λιγότερο διαλυτά νιτρικά

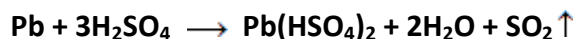
άλατα δεν διαλύεται σε πυκνό νιτρικό οξύ και για το λόγο αυτό ο Pb διαλύεται ευκολότερα σε αραιό HNO₃:



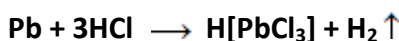
- Το αραιό H₂SO₄ προσβάλλει μόνο επιφανειακά το Pb, επειδή σχηματίζεται προστατευτικό στρώμα αδιάλυτου PbSO₄:



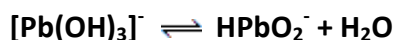
ενώ το πυκνό-θερμό H₂SO₄ τον διαλύει επειδή σχηματίζεται το διαλυτό όξινο θειικό άλας:



- Το αραιό HCl δεν προσβάλλει το Pb, λόγω του δυσδιάλυτου PbCl₂, ενώ το πυκνό-θερμό HCl διαλυτοποιεί τον Pb επειδή σχηματίζεται διαλυτό χλωρισύμπλοκο:

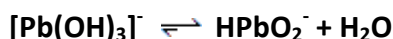
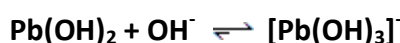


- Ο Pb διαλύεται και σε πυκνά διαλύματα ισχυρών βάσεων με έκλυση υδρογόνου σχηματίζοντας υδροξυσύμπλοκα, όπως [Pb(OH)₄]²⁻ και [Pb(OH)₃]⁻, που βρίσκονται σε ισορροπία με αφυδατωμένες μορφές τους (μολυβδώδη ανιόντα):



Σταθερότητα των διαλυμάτων του

- Τα ιόντα Pb²⁺ δεν υδρολύονται εύκολα και τα διαλύματά τους παραμένουν διαυγή κατά την αραιώση, ωστόσο είναι απαραίτητη η οξίνιση των διαλυμάτων τους για να περιοριστεί η έστω και σε μικρό βαθμό υδρόλυσή τους. Σε αλκαλικά διαλύματα σχηματίζεται δυσδιάλυτο Pb(OH)₂, το οποίο, ως επαμφοτερίζον υδροξείδιο, διαλύεται σε περίσσεια βάσης σχηματίζοντας υδροξυσύμπλοκα, που βρίσκονται σε ισορροπία αφυδατωμένες μορφές τους (μολυβδώδη ανιόντα).



Σχηματισμός συμπλόκων ιόντων

- Pb(II) δεν σχηματίζει σύμπλοκα με την NH₃ και τα ιόντα CN⁻ (χαρακτηριστική διαφορά από τα Cu(II) και Cd(II)), αντίθετα σχηματίζει αρκετά σταθερά σύμπλοκα με οξικά ιόντα, CH₃COO⁻, όπως και με άλλα ανιόντα οργανικών οξέων (τρυγικών, κιτρικών, κ.λπ.), γεγονός που επιτρέπει τη διαλυτοποίηση δυσδιάλυτων αλάτων του, όπως του PbSO₄, με πυκνό διάλυμα CH₃COONH₄.
- $\text{PbSO}_4 + 4\text{CH}_3\text{COO}^- \rightleftharpoons [\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_4]^{2-} + \text{SO}_4^{2-}$
- Ο Pb(II) σχηματίζει σειρά σταθερών συμπλόκων με τα αλογονοϊόντα, π.χ. [PbX]⁺, [PbX₂]⁰, [PbX₃]⁻, [PbX₄]²⁻ (όπου X: Cl, Br, I).

➤ Ειδικά χαρακτηριστικά

- Χαρακτηριστική ιδιότητα του Pb(II) είναι το ότι παρέχει σχετικώς δυσδιάλυτα άλατα με αλογονοϊόντα, τα οποία όμως είναι ουσιαστικώς ευδιάλυτα σε θερμό ύδωρ. Το ότι παρέχει δυσδιάλυτο χλωριούχο άλας, τον κατατάσσει στην Ιη ομάδα κατιόντων μαζί με τον Ag(I) και τον Hg(I). Ωστόσο, η διαλυτότητα του PbCl₂ (σε 100 g ύδατος διαλύονται 0,7 και 3,3 g PbCl₂ στους 0 και 100oC, αντίστοιχα) είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνη των AgCl και Hg₂Cl₂. Αποτέλεσμα της μερικής διαλυτότητας του PbCl₂ είναι η ατελής παραλαβή του κατά τον διαχωρισμό των κατιόντων της Ιης ομάδας από τις υπόλοιπες ομάδες κατιόντων. Για τον λόγο αυτό ο Pb(II) εξετάζεται και στα κατιόντα της ΙΙης ομάδας, εφόσον κλάσμα του αναμένεται να βρεθεί με τα στοιχεία της ομάδας αυτής.
- Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του Pb(II) σε σχέση με τα κατιόντα της ΙΙης ομάδας, είναι ο σχηματισμός δυσδιάλυτου θειικού άλατος, το οποίο είναι διαλυτό παρουσία περίσσειας οξικών ιόντων.

➤ Τυπικές αντιδράσεις Pb²⁺

Ιόντα Cl⁻

$\text{Pb}^{2+} + 2\text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{PbCl}_2$ / Με ιόντα Cl⁻ σχηματίζεται λευκό ίζημα από PbCl₂. Ο PbCl₂ δεν είναι τόσο δυσδιάλυτος, όσο ο AgCl και ο Hg₂Cl₂. Σε 100 g ύδατος διαλύονται 0,7 και 3,3 g

PbCl₂ στους 0 και 100°C, αντίστοιχα. Ο PbCl₂ σχηματίζεται σχετικά με βραδύ ρυθμό, η καθίζησή του με Cl⁻ δεν είναι ποτέ ποσοτική και για τον λόγο αυτό μέρος του Pb²⁺ περνάει και ανιχνεύεται μαζί με τα κατιόντα της ομάδας II.

PbCl₂ + 3OH⁻ ⇌ [Pb(OH)₃]⁻ + 2Cl⁻ / Ο PbCl₂, όπως και άλλα δυσδιάλυτα άλατα του Pb, διαλύεται σε ισχυρώς αλκαλικά διαλύματα σχηματίζοντας ανιοντικά υδροξυσύμπλοκα.

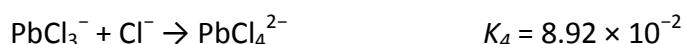
PbCl₂ + 4CH₃COO⁻ ⇌ [Pb(CH₃COO)₄]²⁻ + 2Cl⁻ / Επίσης διαλύεται σε πυκνά διαλύματα οξικών αλάτων (π.χ. CH₃COONH₄) σχηματίζοντας ανιοντικά οξικά σύμπλοκα,...

PbCl₂ + 2S₂O₃²⁻ ⇌ [Pb(S₂O₃)₂]²⁻ + 2Cl⁻ / ...όπως επίσης και σε διαλύματα θειοθειικών ιόντων σχηματίζοντας ανιοντικά θειοθειικά σύμπλοκα.

PbCl₂ + nCl⁻ ⇌ [PbCl_{2+n}]ⁿ⁻ (n=1-2) / Ανάλογα με τον AgCl, παρουσία περίσσειας Cl⁻ σχηματίζει διαλυτά χλωρισύμπλοκα και για τον λόγο αυτό μεγάλη περίσσεια Cl⁻ δεν βοηθά στην πληρέστερη καθίζηση του PbCl₂, αντίθετα τον διαλυτοποιεί.

Ο μόλυβδος σχηματίζει μια σειρά συμπλόκων με ιόντα χλωρίου, ο σχηματισμός των οποίων μεταβάλλει τη χημεία διάβρωσης του μολύβδου. Αυτό θα τείνει να περιορίσει τη διαλυτότητα του μολύβδου σε αλατούχο διάλυμα.

Σταθερές ισορροπίας για τα υδατικά σύμπλοκα χλωριούχου μολύβδου σε θερμοκρασία 25 ° C



➤ Επιπτώσεις στην υγεία

Ο μόλυβδος είναι ένα δηλητηριώδες μέταλλο που μπορεί να βλάψει τις νευρικές συνδέσεις (ειδικά σε μικρά παιδιά) και να προκαλέσει διαταραχές του αίματος και του εγκεφάλου. Δηλητηρίαση από μόλυβδο συνήθως είναι αποτελέσματα κατανάλωσης τροφής ή νερού έχουν μολυνθεί με μόλυβδο. Μπορεί επίσης να εμφανιστεί μετά από τυχαία κατάποση μολυσμένου χώματος, σκόνης, ή βαφών με βάση το μόλυβδο.

Μακροχρόνια έκθεση στο μόλυβδο ή άλατα του (ιδιαίτερα διαλυτά άλατα ή του ισχυρού οξειδωτικού PbO_2) μπορεί να προκαλέσει νεφροπάθεια, και κοιλιακό άλγος. Τα αποτελέσματα του μολύβδου είναι ίδια είτε εισέρχεται στο σώμα μέσω της αναπνοής ή της κατάποσης. Ο μόλυβδος μπορεί να επηρεάσει σχεδόν κάθε όργανο και σύστημα του σώματος. Ο κύριος στόχος της τοξικότητας του μολύβδου είναι το νευρικό σύστημα, τόσο σε ενήλικες και παιδιά. Μακροχρόνια έκθεση μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη απόδοση σε κάποια τεστ που μετρούν τη λειτουργία του νευρικού συστήματος. Μπορεί επίσης να προκαλέσει αδυναμία στα δάχτυλα, στους καρπούς και τους αστραγάλους ή. Η έκθεση στο μόλυβδο προκαλεί, επίσης, μικρή αύξηση της αρτηριακής πίεσης, ιδιαίτερα σε μεσήλικες και ηλικιωμένους και μπορεί να προκαλέσει αναιμία. Η έκθεση σε υψηλά επίπεδα μολύβδου μπορεί να βλάψει σοβαρά τον εγκέφαλο και τους νεφρούς ενηλίκων ή παιδιών και τελικά να προκαλέσει το θάνατο. Σε έγκυες γυναίκες, τα υψηλά επίπεδα έκθεσης στον μόλυβδο μπορεί να προκαλέσουν αποβολή. Χρόνια, υψηλή έκθεση έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη γονιμότητα στους άντρες. Το αντίδοτο και η θεραπεία για δηλητηρίαση από μόλυβδο αποτελείται από διμερκαπρόλη.

Η ανησυχία για τις επιπτώσεις του μολύβδου στην ανάπτυξη γνωστικών ελλειμμάτων στα παιδιά επέφερε εκτεταμένη μείωση της χρήσης του (έκθεση σε μόλυβδο έχει συνδεθεί με τις μαθησιακές δυσκολίες). Οι περισσότερες περιπτώσεις των ενηλίκων με αυξημένα επίπεδα μολύβδου στο αίμα σχετίζονται με την εργασία τους. Υψηλά επίπεδα μολύβδου στο αίμα σχετίζονται με καθυστερημένη εφηβεία στα κορίτσια. Ο μόλυβδος έχει αποδειχθεί πολλές φορές ότι μειώνει μόνιμα τη γνωστική ικανότητα των παιδιών ακόμα και μετά από εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα έκθεσης. Φαίνεται να μην υπάρχει ανιχνεύσιμο κατώτατο όριο κάτω από το οποίο ο μόλυβδος δεν έχει καμία επίδραση στη γνωστική λειτουργία.

Κατά τη διάρκεια του 20ού αιώνα, η χρήση μολύβδου σε χρωστικές βαφών, μειώθηκε σημαντικά λόγω του κινδύνου της δηλητηρίασης από μόλυβδο, ειδικά στα παιδιά. Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1980 έλαβε χώρα μια σημαντική αλλαγή στην τελική χρήση μολύβδου. Μεγάλο μέρος αυτής της αλλαγής ήταν αποτέλεσμα της συμμόρφωσης των καταναλωτών των ΗΠΑ με περιβαλλοντικούς κανονισμούς που μείωσαν σημαντικά ή να εξάλειψαν τη χρήση μολύβδου σε προϊόντα που περιλαμβάνουν τη βενζίνη, τα χρώματα, τις κολλήσεις, και τα συστήματα ύδρευσης. Η χρήση μολύβδου περιορίστηκε περαιτέρω από Οδηγία RoHS της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Ο μόλυβδος μπορεί

να εξακολουθεί να βρίσκεται σε επιβλαβείς ποσότητες σε κεραμικά, βινύλιο (σαν αυτό που χρησιμοποιείται σε σωληνώσεις ή μονώσεις ηλεκτρικών καλωδίων), και ορείχαλκου που κατασκευάζεται στην Κίνα. Μεταξύ του 2006 και 2007, πολλά παιδικά παιχνίδια κατασκευασμένα στην Κίνα ανακλήθηκαν, κυρίως λόγω μολύβδου στα χρώματα που χρησιμοποιούνταν για το χρωματισμό των προϊόντων.

Παλιά σπίτια, μπορεί να εξακολουθούν να περιέχουν σημαντικές ποσότητες χρωμάτων μολύβδου. Το λευκό χρώμα μολύβδου έχει αποσυρθεί από την αγορά στις βιομηχανικές χώρες, αλλά το κίτρινο χρώμα μολύβδου είναι ακόμη σε κυκλοφορία, όπως, για παράδειγμα, το Holcolan Yellow της Holland Colours. Παλιά χρώματα δεν πρέπει να αφαιρούνται με τρίψιμο, καθώς έτσι παράγεται εισπνεύσιμη σκόνη.

Μολυβδούχα άλατα που χρησιμοποιούνται στην κεραμική για βερνίκωμα προκαλούν περιστασιακά δηλητηρίαση, όταν όξινα ποτά, όπως χυμοί φρούτων, μεταφέρουν ιόντα μολύβδου από το βερνίκι. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι αυτό που ήταν γνωστό ως "κολικός Devon» ήταν αποτέλεσμα της χρήσης επένδυσης μολύβδου στις πρέσες εξαγωγής του χυμού μήλων για την παρασκευή μηλίτη. Ο μόλυβδος θεωρείται ότι είναι ιδιαίτερα επιβλαβής στην αναπαραγωγική ικανότητα των γυναικών. Οξικός μόλυβδος (επίσης γνωστός ως ζάχαρη μολύβδου) χρησιμοποιούταν στη Ρωμαϊκή Αυτοκρατορία ως γλυκαντικό κρασιού, και ορισμένοι θεωρούν ότι αυτό είναι η αιτία της παράνοιας που έπληξε πολλούς από τους Ρωμαίους αυτοκράτορες.

Η μόλυνση του εδάφους είναι από μόλυβδο είναι ένα ευρέως διαδεδομένο ζήτημα, δεδομένου ότι ο μόλυβδος περιέχεται σε φυσικά αποθέματα και μπορεί να εισέλθει στο έδαφος μέσω διαρροών μολυβδούχας βενζίνη από υπόγειες δεξαμενές αποθήκευσης ή μέσω βιομηχανικών λυμάτων.

Μόλυβδος που εκπέμπεται στην ατμόσφαιρα μπορεί να εισπνευσθεί, ή μπορεί να προσληφθεί αφού κατακαθίσει. Περνά γρήγορα στην κυκλοφορία του αίματος και πιστεύεται ότι έχει δυσμενείς επιπτώσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα, το καρδιαγγειακό σύστημα, τα νεφρά και το ανοσοποιητικό σύστημα.

➤ Βιοχημεία

Στο ανθρώπινο σώμα, ο μόλυβδος αναστέλλει τις πορφοχολερυθρινογόνους συνθάσες και φερροχηλατάση, αποτρέποντας την δημιουργία πορφοχολερυθρινογόνου

και την ενσωμάτωση του σιδήρου στη πρωτοπορφυρίνη IX, το τελικό στάδιο της σύνθεσης αίμης. Αυτό προκαλεί αναποτελεσματική σύνθεση αίμης και αναιμία σε χαμηλότερα επίπεδα, λειτουργεί ως ασβέστιο, παρεμβαίνοντας στα κανάλια ιόντων κατά τη μετάδοση νευρικών ρευμάτων. Αυτός είναι ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους επηρεάζει τη γνωστική λειτουργία. Η οξεία δηλητηρίαση από μόλυβδο θεραπεύεται με δινάτριο άλας του ασβεστίου: το χηλικό ασβέστιο του δινατρίου άλατος του αιθυλενίου-διαμίνης- τετραοξεικό οξύ (EDTA). Αυτός ο χηλικός παράγοντας έχει μεγαλύτερη συνάφεια με το μόλυβδο από ό, τι με το ασβέστιο και έτσι σχηματίζεται χηλικό του μολύβδου. Στη συνέχεια αποβάλλεται με τα ούρα, αφήνοντας πίσω ακίνδυνο ασβέστιο.

➤ Έκθεση

Η έκθεση στον μόλυβδο και χημικές ουσίες που περιέχουν μόλυβδο μπορεί να συμβεί μέσω της εισπνοής, της κατάποσης και της δερματικής επαφής. Τα μεγαλύτερα ποσοστά έκθεσης παρουσιάζονται μέσω της κατάποσης και εισπνοής. Η έκθεση στο μόλυβδο είναι ένα παγκόσμιο ζήτημα, καθώς η εξόρυξη και επεξεργασία μολύβδου είναι κοινές σε πολλές χώρες. Οι περισσότερες χώρες έχουν σταματήσει να χρησιμοποιούν βενζίνη με πρόσθετα μολύβδου.

Η έκθεση στο μόλυβδο συνήθως γίνεται μέσω της κατάποσης. Οι βαφές μολύβδου είναι η κύρια πηγή έκθεσης σε μόλυβδο για τα παιδιά. Καθώς η βαφή φθείρεται, ξεφλουδίζει, μετατρέπεται σε σκόνη και τότε εισέρχεται στο σώμα μέσω των χεριών ή μέσω μολυσμένων τροφίμων, νερού ή αλκοόλ. Ο μόλυβδος μπορεί να ληφθεί από φρούτα και λαχανικά που έχουν μολυνθεί από υψηλά επίπεδα μολύβδου στο έδαφος. Η μόλυνση του εδάφους οφείλεται κυρίως σε μολύβδινες σωληνώσεις, σκόνη μολύβδου από παλιές βαφές και υπολείμματα μολύβδου από τη βενζίνη με πρόσθετα μολύβδου.

Η εισπνοή είναι συχνότερη αιτία έκθεσης, κυρίως για εργαζόμενους σε δουλειές που αφορούν το μόλυβδο. Σχεδόν όλος ο εισπνεόμενος μόλυβδος απορροφάται από τον οργανισμό, το ποσοστό είναι 20-70% σε σχέση με την κατάποση μολύβδου. Τα παιδιά απορροφούν περισσότερο από τους ενήλικες.

Η επιδερμική έκθεση μπορεί να είναι σημαντική για τον μικρό αριθμό ανθρώπων που εργάζονται με οργανικές ενώσεις μολύβδου, αλλά έχει ελάχιστο ενδιαφέρον για το γενικό πληθυσμό. Ο ρυθμός απορρόφησης του δέρματος είναι επίσης χαμηλός για τον ανόργανο μόλυβδο.

Ο μόλυβδος παραμένει στο σώμα για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε ασβεστικούς ιστούς (δηλαδή, των δοντιών και των οστών). Ο συσσωρευμένος μόλυβδος δύναται να απελευθερωθεί στο αίμα, ειδικά σε περιόδους με υψηλές ανάγκες σε ασβέστιο (π.χ. εγκυμοσύνη, γαλουχία, οστεοπόρωση), ή με έλλειψη ασβεστίου, και είναι ιδιαίτερα επικίνδυνος για το αναπτυσσόμενο έμβρυο.

2.5.2. Κάδμιο (Cd)(λατινικά: cadmium)

➤ Ιστορική αναδρομή



Εικόνα 1.7: Το θειούχο κάδμιο αποτέλεσε τη βάση πολλών χρωμάτων καδμίου εξαιρετικής σταθερότητα

Μέταλλο που συνοδεύει τον ψευδάργυρο σε όλα τα ορυκτά του. Ανακάλυψη: F. Stromeyer (στο Goettingen της Γερμανίας 1817). Ονομασία ελληνικής προέλευσης: "καδμία", αρχαία ονομασία του ορυκτού **καλαμίνα**, $ZnCO_3$ στο οποίο βρίσκεται πάντοτε σε μικρές ποσότητες. Το κάδμιο δεν έχει δικά του ορυκτά με μόνη ίσως εξαίρεση τον σπάνιο **γρηνοκίτη**, CdS . Ωστόσο, το μέταλλο λαμβάνεται εύκολα από τα συνηθισμένα ορυκτά του ψευδαργύρου, όπως ο

σφαλερίτης, ZnS , στα οποία βρίσκεται πάντοτε σε μικρά ποσοστά (συνήθως μικρότερα του 1%).

- Παγκοσμίως παράγονται περίπου 20.000 τόνοι τον χρόνο (στοιχεία 2007), ως παραπροϊόν παραγωγής ψευδαργύρου και χαλκού. Κυριότερες παραγωγί χώρες: Ν. Κορέα, Κίνα, Ιαπωνία, Καναδάς, Καζακστάν, Μεξικό, Ρωσία.

Το κάδμιο και οι ενώσεις του χρησιμοποιούνται σε πολλές εφαρμογές βιομηχανικών προϊόντων και διαδικασιών. Επαναφορτιζόμενες μπαταρίες (μπαταρίες Ni-Cd), πραστατευτικές επικαλύψεις σιδηρών αντικειμένων (επικαδμιώσεις), εύτηκτα

κράματα, χρώματα (το θειούχο κάδμιο θεωρείται ως ένα από τα πολυτιμότερα κίτρινα χρώματα), πυρηνικοί αντιδραστήρες (οι ράβδοι ασφαλείας με τις οποίες ελέγχεται η πορεία της πυρηνικής αντίδρασης αποτελούνται από καθαρό κάδμιο, λόγω της ιδιότητάς του να απορροφά νετρόνια). Λόγω της τοξικότητάς του γίνεται προσπάθεια περιορισμού της χρήσης του ιδίου και των ενώσεών του και αντικατάστασής του, όπου είναι δυνατόν, από μη τοξικά μέταλλα με παραπλήσιες ιδιότητες (όπως π.χ. ο κασσίτερος).



Εικόνα 1.8: Χρώματα καδμίου

Τυπικές συγκεντρώσεις του καδμίου σε επιφανειακά νερά είναι από 0.01 έως 0.5 $\mu\text{g/L}$ με 0.08 $\mu\text{g/L}$ παγκόσμια μέση τιμή. Ο ανθρωπογενής παράγοντας εμπλουτισμού για τη συνολική παγκόσμια εκπομπή του Cd είναι 89% ενώ μόνο 11% προέρχεται από φυσικές πηγές.

Το κάδμιο ανήκει στις καρκινογόνες ενώσεις και είναι γνωστό ότι έχει αρνητικές

επιπτώσεις στα υδατικά οικοσυστήματα και εδάφη.

Δεν απαιτείται για τη φυσιολογική λειτουργία ενός οργανισμού, έχει μεγάλη βιοσυσσώρευση και συσσωρεύεται κυρίως σε βασικά όργανα ενός οργανισμού. Οι επιδράσεις οξείας δηλητηρίασης είναι η υψηλή πίεση αίματος, η καταστροφή του συκωτιού, η καταστροφή των ερυθρών κυττάρων, οστεοπόρωση και παραμόρφωση οστών σε συνδυασμό με την



Εικόνα 1.9: Γρηνοκίτης, Cds

παγκρεατική διάρροια. Το μέγιστο επιτρεπτό όριο για πόσιμο νερό είναι 5 $\mu\text{g/L}$.

➤ Γενικά χαρακτηριστικά του καδμίου

Αργυρόλευκο με ελαφριά γαλάζια απόχρωση και εύτηκτο μέταλλο, το οποίο μοιάζει πολύ με τον ψευδάργυρο. Σε καθαρή μορφή είναι αρκετά μαλακό και μπορεί να κοπεί με τη βοήθεια λεπίδας. Οξειδώνεται επιφανειακά στον αέρα.

- Διαλύεται εύκολα σε αραιό (1:1) νιτρικό οξύ, όπως και σε H_2SO_4 και HCl .
- Οι ενώσεις του καδμίου είναι τοξικότερες.

Παρόμοια με ψευδάργυρο, προτιμά οξειδωτική κατάσταση +2 στις περισσότερες από τις ενώσεις του και ανάλογη με τον υδράργυρο να παρουσιάζει χαμηλό σημείο τήξης σε σχέση με τα μεταβατικά μέταλλα. Το κάδμιο και τα ομοειδή του, δεν θεωρούνται μεταβατικά μέταλλα. Μέση συγκέντρωση στο στερεό φλοιό της γης είναι μεταξύ 0,1 και 0,5 μέρη ανά εκατομμύριο (ppm).

Το κάδμιο εμφανίζεται ως δευτερεύον συστατικό στα περισσότερα ψευδαργυρικά μεταλλεύματα και ως εκ τούτου είναι ένα υποπροϊόν της παραγωγής ψευδαργύρου.

Το κάδμιο είναι φυσικό συστατικό των επιφανειακών και των υπόγειων νερών. Μπορεί να υπάρχει στο νερό ως ένυδρο ιόν, ως ανόργανα σύμπλοκα όπως τα ανθρακικά άλατα, τα υδροξείδια, χλωριούχα ή θειικά άλατα, ή ως οργανικά σύμπλοκα με χουμικά οξέα, (Πίνακας 1.2). Μόλυνση του νερού από το κάδμιο μπορεί να υπάρξει από τα βιομηχανικά απόβλητα (κυρίως βιομηχανίες - διαδικασίες επεξεργασίας μετάλλων) και τα νερά των μεταλλείων, διάβρωση και αποσάθρωση εδάφους και πετρωμάτων, ατμοσφαιρική απόθεση, διαρροές στη ξηρά από μολυσμένες περιοχές (λιπάσματα φωσφορικού άλατος), διασπορά της χρήσης της λάσπης και των λιπασμάτων στη γεωργία και την καύση των φυσικών καυσίμων.

Κάδμιο, Cd		
	*	**
Εσωτερικά επιφανειακά νερα (Ολικη ουσία)	5mg/l	1mg/l
Νερά εκβολών ποταμών (Διαλυτή ουσία)	5mg/l	1mg/l
Εσωτερικά παράκτια νερά Θαλάσσια χωρικά νερά Διαλυτή ουσία)	2.5 mg/l	0.5mg/l

Πίνακας 1.2 : Οριακές τιμές ποιότητας νερών για το Κάδμιο (Cd)

*Για υδατικές περιοχές που επηρεάζονται από απορρίψεις.

**Για νερά που μετρώνται βάση του εθνικού δικτύου παρακολούθησης ποιότητας νερών

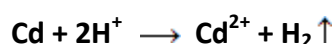
➤ **Χημικά χαρακτηριστικά**

Οξειδωτικές καταστάσεις

- Η μόνη σταθερή οξειδωτική κατάσταση του Cd σε υδατικά διαλύματα είναι η Cd(II). Τα ιόντα Cd^{2+} όπως και τα σύμπλοκα ιόντα του είναι άχρωμα, σε αντίθεση με το κυανό χρώμα των ιόντων Cu^{2+} .

Διαλυτοποίηση του καδμίου

- Το Cd διαλυτοποιείται αργά σε HCl και H_2SO_4 με έκλυση υδρογόνου:



πολύ ευκολότερα διαλύεται σε HNO_3 :



- Το Cd δεν προσβάλλεται από διαλύματα ισχυρών βάσεων.

Σταθερότητα των διαλυμάτων του

- Τα ιόντα Cd^{2+} δεν υδρολύονται εύκολα και παραμένουν διαυγή κατά την αραιώση, ωστόσο είναι απαραίτητη η οξίνιση των διαλυμάτων τους για να περιοριστεί η έστω και σε μικρό βαθμό υδρόλυσή τους.
- Σε αλκαλικά διαλύματα σχηματίζεται ζελατινώδες λευκό ίζημα $Cd(OH)_2$, αδιάλυτο σε περίσσεια ισχυρής βάσης (χαρακτηριστική διαφορά από τα ιόντα Zn^{2+}).

Σχηματισμός συμπλόκων ιόντων

Το Cd(II) σχηματίζει σύμπλοκα με την NH_3 , τα ιόντα CN^- , όπως και σειρά σχετικών σταθερών συμπλόκων με τα αλογονοϊόντα, π.χ. $[CdX]^+$, $[CdX_2]^0$, $[CdX_3]^-$, $[CdX_4]^{2-}$ (όπου X: Cl, Br, I).

Η πιο κοινή οξειδωτική κατάσταση του καδμίου είναι +2, αν και μπορούν να βρεθούν σπάνια δείγματα +1. Το κάδμιο αναφλέγεται στον αέρα σχηματίζοντας το άμορφο καφέ οξείδιο του καδμίου (CDO). Η κρυσταλλική μορφή της ίδιας ένωσης είναι σκούρο κόκκινη και αλλάζει χρώμα όταν θερμανθεί, παρόμοια με οξείδιο του ψευδαργύρου. Το υδροχλωρικό οξύ, το θειικό οξύ και το νιτρικό οξύ διαλύουν το κάδμιο σχηματίζοντας χλωριούχο κάδμιο ($CdCl_2$) θειικό κάδμιο ($CdSO_4$) ή νιτρικό κάδμιο ($Cd(NO_3)_2$). Η οξειδωτική κατάσταση +1 μπορεί να επιτευχθεί με τη διάλυση καδμίου σε

μείγμα χλωριούχου καδμίου και χλωριούχου αργιλίου, σχηματίζοντας το κατιόν $+Cd_{22}$, το οποίο είναι παρόμοιο με το κατιόν $+Hg_{22}$ του χλωριούχου υδραργύρου (I).



➤ **Ειδικά χαρακτηριστικά**

- Τα ιόντα Cd^{2+} διαχωρίζονται σχετικώς δύσκολα από τα ιόντα Cu^{2+} . Κύριες διαφορές μεταξύ τους είναι το ότι παρέχουν θειούχες ενώσεις διαφορετικού χρώματος: το CdS είναι κίτρινο έως πορτοκαλόχρωμο, ανάλογα με τις συνθήκες καθίζησης, ενώ ο CuS είναι μαύρος. Το CdS δεν διαλύεται σε διάλυμα ιόντων CN^- , σε αντίθεση με τον CuS.

➤ **Τοξικότητα και επιπτώσεις στην υγεία**

Η πιο επικίνδυνη μορφή έκθεσης σε κάδμιο, είναι η εισπνοή λεπτής σκόνης και αναθυμιάσεων, ή η κατάποση ιδιαίτερα διαλυτών ενώσεις του καδμίου. Εισπνοή αναθυμιάσεων που περιέχουν κάδμιο μπορεί να οδηγήσει αρχικά σε metal fume fever αλλά μπορεί να εξελιχθούν σε χημική πνευμονίτιδα, πνευμονικό οίδημα, και θάνατο.

Το κάδμιο αποτελεί επίσης δυνητικό κίνδυνο για το περιβάλλον. Ανθρώπινη έκθεση σε περιβαλλοντικό κάδμιο είναι κυρίως αποτέλεσμα καύσης ορυκτών καυσίμων, φωσφορικών λιπασμάτων, φυσικών πηγών, παραγωγής σιδήρου και χάλυβα, παραγωγής τσιμέντου και συναφών δραστηριοτήτων, παραγωγής μη σιδηρούχων μετάλλων, και καύσης αστικών στερεών αποβλήτων. Ωστόσο, υπήρξαν περιπτώσεις γενικής τοξικότητας, ως αποτέλεσμα της μακροπρόθεσμης έκθεσης πληθυσμών σε μολυσμένα από κάδμιο τρόφιμα και νερό. Στις δεκαετίες πριν τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο, οι εξορυκτικές εργασίες των Ιαπώνων μόλυναν τον ποταμό Jinzu με κάδμιο και ίχνη των άλλων τοξικών μετάλλων. Κατά συνέπεια, το κάδμιο συσσωρεύτηκε στις καλλιέργειες ρυζιού κατά μήκος των οχθών του ποταμού. Ορισμένα μέλη των τοπικών αγροτικών κοινοτήτων που κατανάλωσαν μολυσμένο ρύζι παρουσίασαν τη νόσο Itai- Itai και νεφρικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεϊνουρίας και γλυκοσουρίας. Θύματα αυτής της δηλητηρίασης ήταν σχεδόν αποκλειστικά μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με χαμηλά επίπεδα σιδήρου κι άλλων ιχνοστοιχείων. Παρόμοιες γενικές εκθέσεις πληθυσμών σε κάδμιο σε άλλα μέρη του κόσμου δεν έχουν ως αποτέλεσμα τα

ίδια προβλήματα στην υγεία όσο οι πληθυσμοί διατηρούν επαρκή επίπεδα σίδηρο κι άλλων ιχνοστοιχείων. Συνεπώς, ενώ το κάδμιο είναι ένα σημαντικό στοιχείο της νόσου Itai-Itai στην Ιαπωνία, οι περισσότεροι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ήταν ένας από πολλούς παράγοντες. Το κάδμιο είναι μία από τις έξι ουσιών που απαγορεύονται από τους κανονισμούς της οδηγίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις Επικίνδυνες Ουσίες (RoHS), η οποία απαγορεύει ορισμένες επικίνδυνες ουσίες στα ηλεκτρικά και ηλεκτρονικά είδη, αλλά επιτρέπει ορισμένες απαλλαγές και εξαιρέσεις από το πεδίο εφαρμογής του νόμου.

Υπήρξαν έρευνες που συνδέουν την έκθεση σε κάδμιο με τον καρκίνο του πνεύμονα και του προστάτη. Ωστόσο, εξακολουθεί να υπάρχει σημαντική διχογνωμία στην επιστημονική κοινότητα σχετικά με το καρκινογόνο δράση του καδμίου. Πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι το αρσενικό και όχι το κάδμιο μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση των ποσοστών θνησιμότητας λόγω καρκίνου του πνεύμονα. Επιπλέον, τα περισσότερα στοιχεία σχετικά με την καρκινογόνο δράση του καδμίου βασίζονται σε έρευνες που αντιμετώπισαν δυσκολίες λόγω της παρουσίας κι άλλων καρκινογόνων ουσιών.

Το κάπνισμα είναι η σημαντικότερη πηγή έκθεσης σε κάδμιο του γενικού πληθυσμού. Έχει εκτιμηθεί ότι εισπνέεται περίπου το 10% της περιεκτικότητας του τσιγάρου σε κάδμιο. Η απορρόφηση του καδμίου από τους πνεύμονες είναι πολύ πιο πλήρης από ότι από το έντερο, με ποσοστό που αγγίζει το 50% του καδμίου εισπνεόμενου μέσω του καπνού του τσιγάρου να απορροφάται.

Κατά μέσο όρο, οι καπνιστές έχουν 4-5 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου στο αίμα και 2-3 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου στα νεφρά από τους μη καπνιστές. Παρά την υψηλή περιεκτικότητα καδμίου στον καπνό του τσιγάρου, φαίνεται να υπάρχει μικρή έκθεση σε κάδμιο λόγω παθητικού καπνίσματος. Δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση στις συγκεντρώσεις καδμίου στο αίμα παιδιών που εκτίθενται σε καπνό τσιγάρου.

2.6. Βαρέα μέταλλα και επιπτώσεις στην υγεία

2.6.1. Χημικοί επιμολυντές στην τροφική αλυσίδα

Τα τελευταία χρόνια η σύγχρονη βιομηχανική ανάπτυξη οδήγησε στο σχηματισμό επικίνδυνων χημικών ουσιών που απελευθερώθηκαν στο περιβάλλον λόγω άγνοιας ή ανευθυνότητας. Οι ουσίες αυτές είναι γνωστές με τον όρο χημικοί επιμολυντές και αποτελούν αντικείμενο πολλών επιστημονικών ερευνών, αφού μέσω του εδάφους και του αέρα περνάνε στα φυτά και στα ζώα και ακολούθως στην τροφική αλυσίδα.

Οι κυριότεροι χημικοί επιμολυντές είναι τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), οι πολυχρωμιωμένες διβενζο-π-διοξίνες (PCDDs) και τα βαρέα μέταλλα.

Τα σπουδαιότερα βαρέα μέταλλα όπως ήδη έχει αναφερθεί είναι το κάδμιο (Cd), ο μόλυβδος (Pb), ο υδράργυρος (Hg), το αρσενικό (As), ο χαλκός (Cu) και το χρώμιο (Cr).

Δεδομένου ότι τα βαρέα μέταλλα δεν αποικοδομούνται, συσσωρεύονται στο έδαφος και τα νερά (γλυκά και αλμυρά), με αποτέλεσμα να περνούν στην τροφική αλυσίδα. Η τοξικότητά τους εξαρτάται από το είδος του βαρέως μετάλλου, τη συγκέντρωσή του, την συνύπαρξη του με άλλα βαρέα μέταλλα, και το είδος του μεγαοργανισμού.

Οι χημικοί επιμολυντές εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα μέσω των γεωργικών εδαφών, που ως βασικό δομικό στοιχείο των αγροσυστημάτων, είναι ο τελικός αποδέκτης των διφαινυλίων, των διοξινών και των βαρέων μετάλλων. Οι διοξίνες συσσωρεύονται στα χωράφια μετά από καύση διαφόρων ουσιών ή απευθείας από απόβλητα βιομηχανιών. Βιομηχανίες εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων, πλαστικών, χρωμάτων κ.α. παράγουν



Εικόνα 1.10: Τρόφιμα πλούσια σε νικέλιο και χρώμιο

χημικούς επιμολυντές μέσω κάποιων διεργασιών. Οι ουσίες αυτές εναποτίθενται απευθείας στα χωράφια ή μεταφέρονται σε αυτά από την ατμόσφαιρα μέσω του βρόχινου νερού ή με τη μεταφορά μολυσμένου χώματος με τον αέρα. Στο έδαφος οι χημικές ουσίες κινούνται προς τον υδροφόρο ορίζοντα, όπου βρίσκονται οι ρίζες των φυτών. Μέσω του ριζικού συστήματος τα φυτά προσλαμβάνουν νερό και θρεπτικά συστατικά από το έδαφος παίρνοντας παράλληλα και διοξίνες ή βαρέα μέταλλα. Έτσι, οι

χημικές ουσίες περνάνε σε καλλιεργούμενα φυτά, αλλά και σε ζώα που τρέφονται με μολυσμένο χορτάρι.

Με αυτό τον τρόπο οι διοξίνες και τα βαρέα μέταλλα εισέρχονται στα λαχανικά, τα φρούτα, το κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Οι χημικοί επιμολυντές μπορούν να προκαλέσουν πληθώρα προβλημάτων στην υγεία μας. Κατανάλωση τροφίμων με μεγάλες ποσότητες διοξινών μπορεί να προκαλέσει άμεσα προβλήματα, όπως κούραση, διαταραχές του νευρικού συστήματος, δερματικές παθήσεις και τοξικά φαινόμενα στο ήπαρ. Το πιο σημαντικό, όμως, πρόβλημα είναι η συνεχής και μακροχρόνια κατανάλωση τροφίμων με μέτριες ποσότητες διοξινών, διφαινυλίων και βαρέων μετάλλων. Σε αυτή την περίπτωση, επειδή οι ουσίες αυτές συσσωρεύονται σε διάφορα όργανα του οργανισμού υπάρχει μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης μεταλλάξεων, καρκινογένεσεων, προβλημάτων στο αναπαραγωγικό σύστημα και τερατογένεσεων. Αναλυτικότερα:

- **Αρσενικό:** Το ανόργανο αρσενικό συγκεντρώνεται στους μύες, τον εγκέφαλο, τον σπλήνα, τους νεφρούς, την καρδιά, τα μαλλιά και τα νύχια. Δηλητηρίαση από αρσενικό προκαλεί παράλυση του νευρικού συστήματος, κώμα και θάνατο, ενώ χρόνια έκθεση προκαλεί μυϊκή ατονία, απώλεια όρεξης, απώλεια βάρους, τριχόπτωση και καρκινογένεση.
- **Κάδμιο:** Το κάδμιο σε τοξικές συγκεντρώσεις και χρόνια έκθεση, είναι δυνατόν να προκαλέσει νεφρικές και ηπατικές βλάβες, υπογονιμότητα στους άνδρες, και καρκινογένεση.
- **Μόλυβδος:** Ο μόλυβδος προκαλεί βλάβες στο νευρικό σύστημα (και κυρίως στον παιδικό πληθυσμό σχετίζεται με προβλήματα πνευματικής καθυστέρησης), ηπατικές και νεφρικές βλάβες, ευνοεί την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων, και καρκινογένεση.
- **Υδράργυρος:** Ο υδράργυρος ανιχνεύεται κατά κύριο λόγο στα αλιεύματα που προέρχονται από ρυπασμένες περιοχές, και συγκεντρώνεται στο ήπαρ και τους νεφρούς προκαλώντας αντιστοίχως βλάβες, προσβάλλει το κεντρικό νευρικό σύστημα και προκαλεί προβλήματα που σχετίζονται με την πνευματική ανάπτυξη των παιδιών, και καρκινογένεση.

- **Χρώμιο:** Το εξασθενές χρώμιο προκαλεί καρκινογένεση, ηπατικές και νεφρικές διαταραχές, δερματίτιδες, και όταν εισέρχεται από την αναπνευστική οδό είναι δυνατόν να προκαλέσει εκτός από καρκίνο των πνευμόνων και χρόνια βρογχίτιδα.
- **Χαλκός:** Ο χαλκός είναι ένα μέταλλο το οποίο είναι απαραίτητο στον ανθρώπινο οργανισμό αφού συμμετέχει στην ανάπτυξη του αγγειακού και σκελετικού συστήματος, βοηθά στην απορρόφηση του σιδήρου, βοηθά στη λειτουργία του νευρικού συστήματος, όμως αν υπερβούμε την ημερήσια διαιτητική πρόσληψη σε χαλκό είναι δυνατόν να εμφανιστούν νεφρικές και ηπατικές διαταραχές.

Τα βαρέα μέταλλα συσσωρεύονται σε πρωτεϊνικούς ιστούς και τα οστά. Έτσι οι καταναλωτές θα πρέπει να αποφεύγουν την κατανάλωση ύδατος από ρυπασμένες περιοχές καθώς και την κατανάλωση συκωτιού και νεφρών από μεγάλης ηλικίας ζώα, και ζώα που προέρχονται από ρυπασμένες περιοχές, καθώς επίσης και τρόφιμα βολβούς (πατάτες, κρεμμύδια, καρότα), που παρήχθησαν σε επιβαρυμένες με βαρέα μέταλλα περιοχές.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι στις μέρες μας, όπου υπάρχει έξαρση βιομηχανικής ανάπτυξης, το πρόβλημα των χημικών επιμολυντών στην τροφική αλυσίδα είναι τεράστιο και απαιτεί εξεύρεση λύσεων. Η επίλυση του προβλήματος απαιτεί αφενός την κινητοποίηση του κρατικού μηχανισμού με την συχνή διεξαγωγή ελέγχων σε βιομηχανίες και αφετέρου τη συνειδητοποίηση των βιομηχανιών, οι οποίες πρέπει να εφαρμόζουν συστήματα επωφελούς για το περιβάλλον επεξεργασίας των αποβλήτων τους και να ελαττώσουν τη χρήση ουσιών που δύναται να παράγουν διοξίνες ή βαρέα μέταλλα. Επίσης, ο κρατικός μηχανισμός πρέπει να απαγορεύει την καλλιέργεια εδαφών και τη βοσκή ζώων κοντά σε βιομηχανικές περιοχές, ενώ επιβάλλεται να καταρτιστεί πρόγραμμα ενημέρωσης των καταναλωτών για το συγκεκριμένο πρόβλημα, ώστε να είναι προσεκτικοί και υποψιασμένοι.

2.6.2. Υδάτινα συστήματα και επιπτώσεις στον οργανισμό

Τα μέταλλα βρίσκονται υπό μορφή αλάτων ή αιωρούμενων σωματιδίων στα υδάτινα συστήματα και με το χρόνο συγκεντρώνονται σχηματίζοντας ιζήματα σε ποτάμια, λίμνες και παράκτιες περιοχές (Πίνακας 1.3).

Διάφορες διεργασίες όπως οι ατμοσφαιρικές κατακρημνίσεις, οι γεωθερμικές διεργασίες, οι έκπλυση επιφανειακών εδαφών, η διάβρωση εδαφών και η διάσπαση ορυκτών έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων και των μεταλλοειδών στο νερό. Σημαντικές συγκεντρώσεις μετάλλων έχουν ανιχνευτεί σε θαλάσσια, ποτάμια και λιμναία ιζήματα.

Ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις τα περισσότερα μέταλλα έχουν τοξική δράση.

Τα βαρέα μέταλλα, παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα βιοσυσσώρευσης, φαινόμενο κατά το οποίο οι ρύποι αυτοί έχουν την ιδιότητα να συσσωρεύονται αυξητικά σε διάφορους ιστούς των οργανισμών της τροφικής αλυσίδας. Η ποσότητα του χημικού ρύπου μπορεί να προσλαμβάνεται από τους οργανισμούς, είτε απευθείας από το περιβάλλον (βιοσυγκέντρωση), είτε από την τροφή (διαιτητική συσσώρευση).

Οι κυριότερες δράσεις τους είναι νεφροτοξικές (Pb, Hg, As, Cd), νευροτοξικές (ιδιαίτερα των οργανικών ενώσεων Hg, Pb, Sn) και καρκινογόνες (As, Cr, Ni). Η καρκινογόνος δράση των μετάλλων έχει μελετηθεί με μεγάλο αριθμό τοξικολογικών ερευνών και έχει βρεθεί ότι ο μηχανισμός της άμεσης προσθήκης σε κυτταρικό DNA (που προκαλεί μεταλλάξεις) είναι δευτερεύουσας σημασίας, σε σχέση με τη δράση μέσω οξειδωτικών βλαβών στο DNA που προκαλούνται από την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΜΟΝΑΔΑ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΔΙΑΜΕΣΟΣ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	ΜΕΓΙΣΤΟ
Cr - Χρώμιο	μg/l	<0.01	0.38	0.792	2.47	43.0
Cu - Χαλκός	μg/l	0.08	0.88	1.23	1.31	14.6
Fe - Σίδηρος	μg/l	<1.0	67.0	268	531	4820
Mn - Μαγγάνιο	μg/l	<0.05	15.9	56.7	155	3010
Mo - Μολυβδαίν.	μg/l	<0.002	0.22	0.495	1.02	16.0
Ni - Νικέλιο	μg/l	0.03	1.91	2.43	2.49	24.6
Pb - Μόλυβδος	μg/l	<0.005	0.093	0.224	0.588	10.6
V - Βανάδιο	μg/l	<0.05	0.46	0.829	1.46	19.5
Zn - Ψευδάργυρος	μg/l	<0.09	2.68	6.01	16.7	310

Πίνακας 1.3: Η μέση τιμή της συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων σε νερά της Ευρώπης καθώς και οι ελάχιστες και διάμεσες τιμές

2.6.3. Επαγγελματική έκθεση: Επιπτώσεις στη νοσηρότητα και στη θνησιμότητα

Τα βαρέα μέταλλα είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα στη βιομηχανία (Πίνακας 1.2)

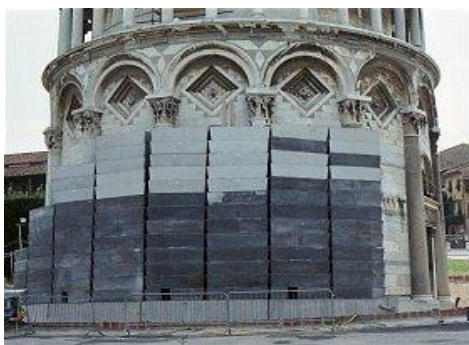


Εικόνα 1.11: Επαναφορτιζόμενες μπαταρίες νικελίου & καδμίου

και σχετίζονται με σοβαρή περιβαλλοντική ρύπανση, αλλά και με προβλήματα στην υγεία των εργαζομένων στη βιομηχανία. Η έκθεση του εργαζόμενου είναι θεωρητικά μεγαλύτερη εφ' όσον βρίσκεται στην πηγή εκπομπής των τοξικών ρύπων, οι οποίοι πριν αποβληθούν στο περιβάλλον έχουν έλθει σε επαφή με τους εργαζόμενους μέσω ποικίλων οδών εισόδου, με διάφορους βαθμούς επιβάρυνσης.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στην επίδραση των βαρέων μετάλλων στην υγεία του ανθρώπου και στην επιβάρυνση των εργαζομένων σε συγκεκριμένους κλάδους Επαγγελματικής απασχόλησης με επιστημονικές μελέτες που αναλύουν την επίδραση των βαρέων μετάλλων στη νοσηρότητα και στη θνησιμότητα του εργαζόμενου πληθυσμού σε βιομηχανικές μονάδες.

Σύμφωνα με τα δημοσιευμένα στοιχεία της διεθνούς βιβλιογραφίας, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της θνησιμότητας από συγκεκριμένες ομάδες νοσημάτων και των επαγγελμάτων της βιομηχανίας, στα οποία οι εργαζόμενοι έρχονται σε άμεση επαφή με συγκεκριμένους βλαπτικούς παράγοντες. Επίσης, γίνονται αναφορές σε χρόνιες βλάβες



Εικόνα 1.12: Αντιστήριξη του κεκλιμένου Πύργου της Πίζας με τοποθέτηση μεγάλων μπλοκ μολύβδου στη βάση του

της υγείας και σε οξέα συμβάντα. Τέτοιοι παράγοντες είναι τα βαρέα μέταλλα, όπως μόλυβδος, αρσενικό, νικέλιο, χαλκός, μαγγάνιο, βηρύλλιο, κάδμιο, αλουμίνιο, αλλά και το χρώμιο. Οι κυριότερες από αυτές τις ομάδες είναι οι καρκίνοι (κυρίως του αναπνευστικού και του πεπτικού συστήματος, αλλά και του εγκεφάλου), σοβαρές αιματολογικές διαταραχές και έκπτωση του ανοσοποιητικού συστήματος, νοσήματα του αναπνευστικού και νευρολογικές

διαταραχές. Οι εν λόγω ουσίες είναι μη βιοδιασπώμενες, δηλαδή δεν διασπώνται και δεν

αποβάλλονται από τον οργανισμό, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται και να βρίσκονται τελικά σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Μέσω των βιογεωχημικών κύκλων και της ανθρώπινης παρέμβασης, τα βαρέα μέταλλα ανακατανέμονται στα διάφορα περιβαλλοντικά διαμερίσματα. Η βιομηχανική, η τεχνολογική και η γεωργική δραστηριότητα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες ρύπανσης από μέταλλα με την απόρριψη βιομηχανικών αποβλήτων, τις μεταλλευτικές εκμεταλλεύσεις, τον εμπλουτισμό και την παραγωγή με ταλλικών αντικειμένων, καθώς και τη χρήση λιπασμάτων.

Η επαγγελματική έκθεση σε βαρέα μέταλλα των εργαζομένων στις βιομηχανίες σχετίζεται με αύξηση της θνησιμότητας από καρκίνους, κυρίως μέσω οξειδωτικών βλαβών στο γενετικό υλικό, νοσήματα του αναπνευστικού, αιματολογικές και νευρολογικές διαταραχές, καθώς και σπανιότερα, δερματολογικές εκδηλώσεις και συστηματικά νοσήματα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Βαρέα Μέταλλα

Στην παρούσα εργασία τα δύο βαρέα μέταλλα που μελετήθηκαν είναι τα εξής: μόλυβδος (Pb) και κάδμιο (Cd).

3.2. Βιολογικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικοί βιοαισθητήρες BERA 5^η γενιάς από τρεις κυτταρικές σειρές:

- i) Πρωτοπλάστες, δηλαδή φυτικά κύτταρα χωρίς κυτταρικό τοίχωμα, από φύλλα καπνού (*Nicotiana tabacum*) ποικιλίας Samsun. Συγκεκριμένα, έγινε προπλάσμιση 0,5 g από φύλλα καπνού σε 20 ml διαλύματος CPW (βλέπε πίνακα 3.1) συμπληρωμένο με 0,7 M μαννιτόλη για μία ώρα και στη συνέχεια επώαστηκαν για 20 ώρες σε 20 ml του ίδιου διαλύματος στο οποίο είχαν προστεθεί 3 mg πεκτινάσης και 2 mg σελλουλάσης.

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

Πίνακας 3.1: CPW

- ii) Κύτταρα N2a (καρκινικά κύτταρα νευροβλαστώματος) και
- iii) Κύτταρα VERO (νεφρική κύτταρα πράσινου πιθήκου-ινοβλάστες)

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

3.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός

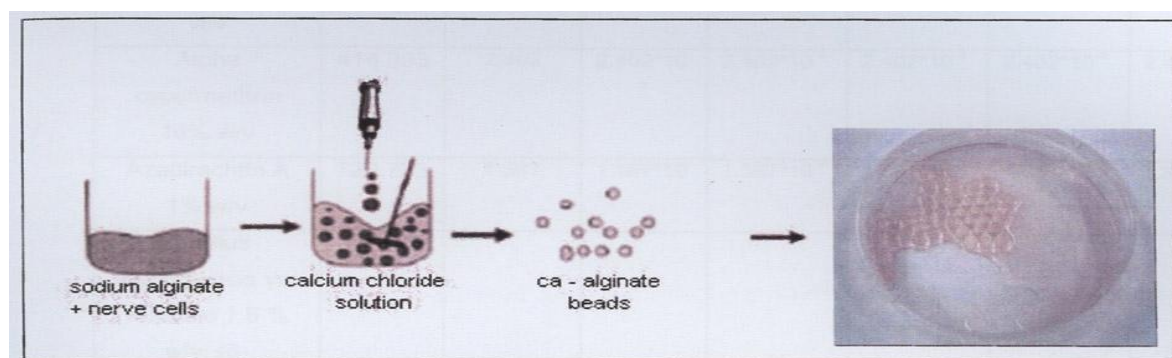
Για το διαχωρισμό στερεών-υγρών καθώς και για τη συλλογή κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η φυγόκεντρος Heraeus Instruments Biofuge 28RS. Τα pH των διαφόρων διαλυμάτων ρυθμίστηκαν σε πεχάμετρο CONSORT C830. Οι μετρήσεις με την τροποποιημένη μέθοδο BERA 5ης γενιάς έγιναν σε σταθερή θερμοκρασία 37°C, με την χρήση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

3.4. Κατασκευή κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5ης γενιάς

3.4.1 Βιοαισθητήρες με τη μορφή σφαιριδίων

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

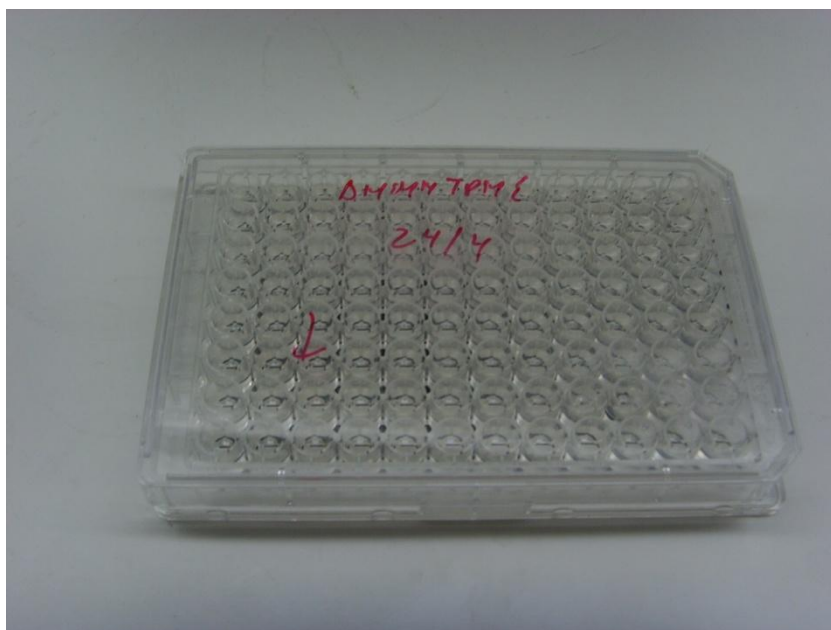
μορφή σφαιριδίου. Η ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1 ml κυττάρων με την επιθυμητή συγκέντρωση σε 2 ml 4% αλγινικού νατρίου, το οποίο βρισκόταν υπό ανάδευση. Στην συνέχεια, με την βοήθεια σύριγγας προστέθηκαν σταγόνες του μίγματος σε διάλυμα 0.8 M CaCl_2 , με αποτέλεσμα την άμεση ακινητοποίηση των κυττάρων σε αλγινικό ασβέστιο, σε σφαιρικό σχήμα. Τα 35, περίπου, σχηματισθέντα σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου, τα οποία εμπεριείχαν ακινητοποιημένα κύτταρα, τοποθετήθηκαν μέσα σε τρυβλία Petri με 5 ml θρεπτικό υλικό DMEM, το οποίο φιλτράρεται με ηθμό, κλείστηκαν με Parafilm® και τοποθετήθηκαν σε συνθήκες δωματίου 25 °C, όπου με εβδομαδιαία ανανέωση του θρεπτικού υλικού, τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν έως και τέσσερις μήνες (Σχήμα 3.1). Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή των κυτταρικών βιοαισθητήρων είχαν αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο.



Σχήμα 3.1: Παρασκευή κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5ης γενιάς σε σφαιρίδια. (Μπλούχος 2009)

3.4.2 Βιοαισθητήρες σε πλακίδιο τύπου ELISA

Το πλακίδιο ELISA αποτελείται από 8 σειρές με 12 «πηγαδάκια» η κάθε μία (συνολικά 96 «πηγαδάκια»), επομένως και 96 κυτταρικούς αισθητήρες στο πλακίδιο. Ακολουθείται η ίδια μέθοδος, όπως περιγράφηκε παραπάνω, για τη μέτρηση της πυκνότητας των κυττάρων. Τα κύτταρα ακινητοποιούνται με την προσθήκη αγαρόζης (agarose) 1.2% στο κυτταρικό διάλυμα (σε αναλογία 1:5) στο ένα ηλεκτρόδιο της βάσης του πλακιδίου συνολικής ποσότητας 50 μl και στο υπόλοιπο μέρος προστέθηκαν 100 ml θρεπτικού υλικού DMEM ή CPW με μαννιτόλη (για τα φυτικά κύτταρα), και τοποθετήθηκαν στον ειδικά διαμορφωμένο θάλαμο αποθήκευσης (Σχήμα 3.2).

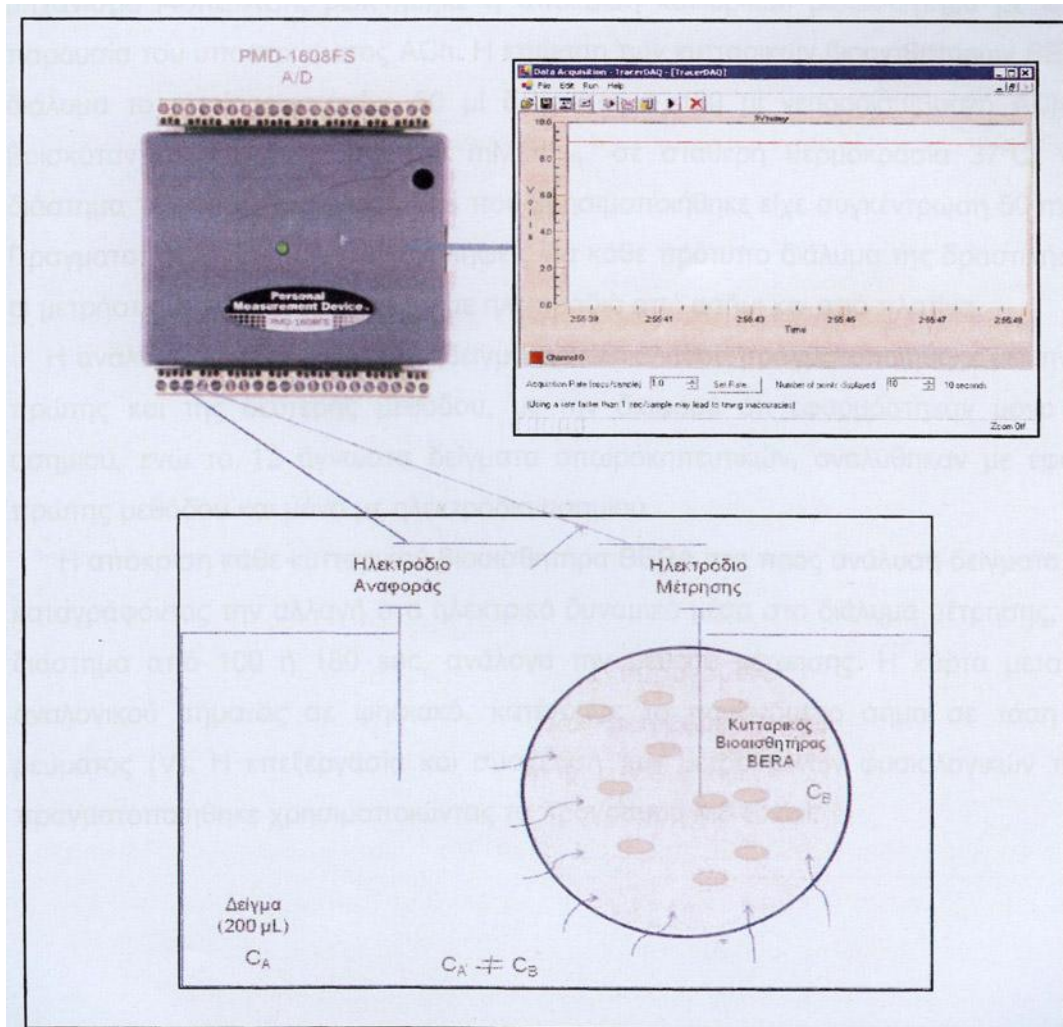


Σχήμα 3.2: Παρασκευή κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5ης γενιάς σε πλακίδιο ELISA

3.5. Διάταξη κυτταρικού βιοαισθητήρα

3.5.1. Βιοαισθητήρας με τη μορφή σφαιριδίου

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της απόκρισης των κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA στα προς ανάλυση δείγματα, απαρτιζόταν από το διάλυμα μέσα στο οποίο γινόταν η επώαση των κυτταρικών βιοαισθητήρων και από την συσκευή καταγραφής δεδομένων, τύπου PMD-1608FS A/D, η οποία ήταν συνδεδεμένη σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και περιελάμβανε κάρτα μετατροπής του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (Σχήμα 3.3). Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν δυο ηλεκτρόδια (αναφοράς και μέτρησης) διαμέτρου 0,2mm και επενδυμένα με μια στρώση χλωριούχου αργύρου (AgCl). Η σύνδεση των ηλεκτροδίων με την συσκευή καταγραφής, έγινε δια μέσου ομοαξονικών καλωδίων προς απαλοιφή ηλεκτροστατικών φορτίων. Το λογισμικό που ήταν υπεύθυνο για την καταγραφή του σήματος και την επεξεργασία των δεδομένων είναι το InstaCal (Measurement Computing, TracerDAQ).



Σχήμα 3.3: Διάταξη συστήματος κυτταρικού βιοαισθητήρα BERA (σφαιρίδιο)

3.5.2. Βιοαισθητήρας σε πλακίδιο τύπου ELISA

Το πλακίδιο με τους κυτταρικούς αισθητήρες και τα υπό ανάλυση δείγματα, τοποθετείται στη συσκευή (Σχήμα 3.4) που συνδέεται με τον μετατροπέα σήματος 3QLABs που με τη σειρά του συνδέεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Για την καταγραφή του σήματος στην οθόνη του υπολογιστή και την επεξεργασία των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε το ίδιο λογισμικό InstaCal.



Σχήμα 3.4: Σύνδεση του βιοαισθητήρα BERA τύπου πλακιδίου ELISA με την ειδική βάση μέτρησης

3.6. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων βαρέων μετάλλων

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

3.7. Μέθοδοι ανάλυσης δειγμάτων

3.7.1. Βιοαισθητήρας με τη μορφή σφαιριδίου

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

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

3.7.2. Βιοαισθητήρας σε πλακίδιο τύπου ELISA

Το πλακίδιο ELISA τοποθετείται στη συσκευή BERA όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.5.2 και σε κάθε «πηγαδάκι» στο ένα ηλεκτρόδιο είναι ακινητοποιημένα τα κύτταρα και στο άλλο εγχύθηκαν 100 μl δείγματος υπό ανάλυση και μετράται η απόκριση τους για 100 sec. Κάθε φορά παίρνεται μέτρηση για κάθε μία στήλη (αποτελούμενη από 8 πηγαδάκια και 12 στήλες συνολικά) και στην οθόνη εμφανίζονται 8 διαφορετικά διαγράμματα για κάθε μία συγκέντρωση από τις 5 του προτύπου διαλύματος βαρέως μετάλλου. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις της μεθόδου (δύο πλακίδια για κάθε συγκέντρωση βαρέως μετάλλου) και για κάθε τύπο κυτταρικής σειράς (3 είδη κυττάρων).

Σε κάθε μέτρηση (και για τα δύο είδη κυτταρικού αισθητήρα) υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών του ηλεκτρικού δυναμικού, ο οποίος και αποτέλεσε την τελική τιμή του ηλεκτρικού δυναμικού (V) του βιοαισθητήρα για κάθε δείγμα. Η επεξεργασία και συσχέτιση των μετρούμενων φυσιολογικών παραμέτρων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MS Excel.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Απόκριση κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA στα προς ανάλυση δείγματα

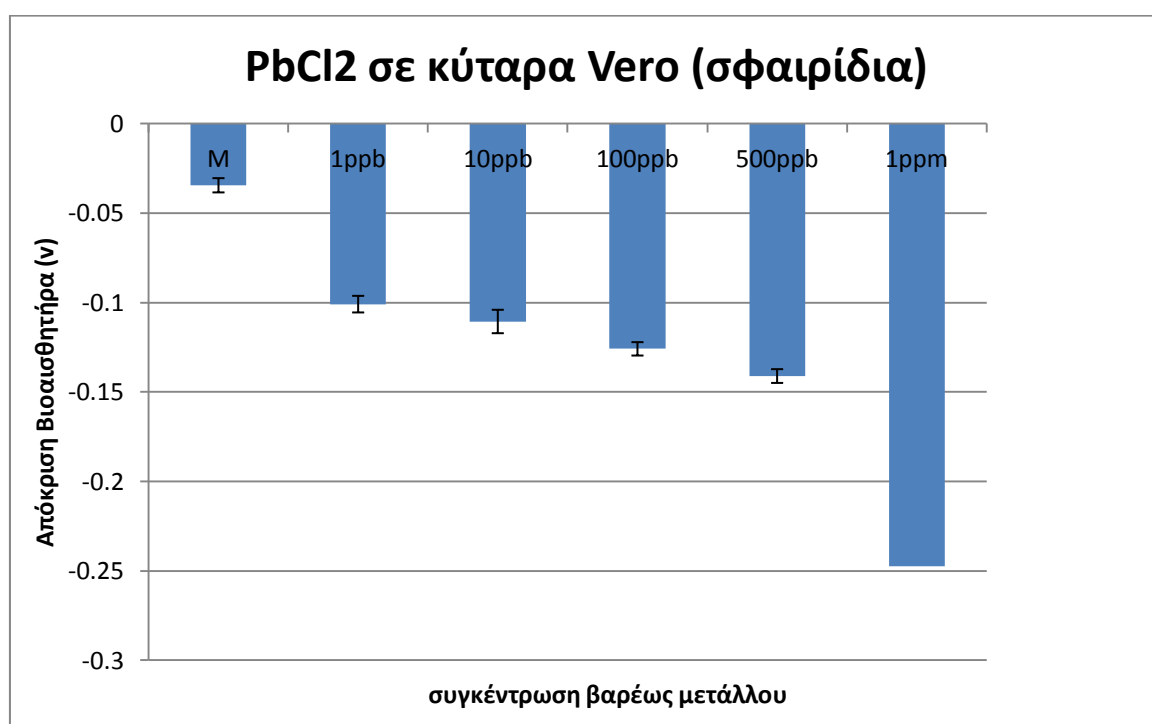
Στη συνέχεια, παρατίθενται τα διαγράμματα, όπως αυτά προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων και αφορούν την απόκριση των κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5ης γενιάς, συναρτήσει των συγκεντρώσεων των δύο βαρέων μετάλλων. Η απόκριση αυτή εκφράζεται ως η μεταβολή στο διαμεμβρανικό δυναμικό των ακινητοποιημένων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

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

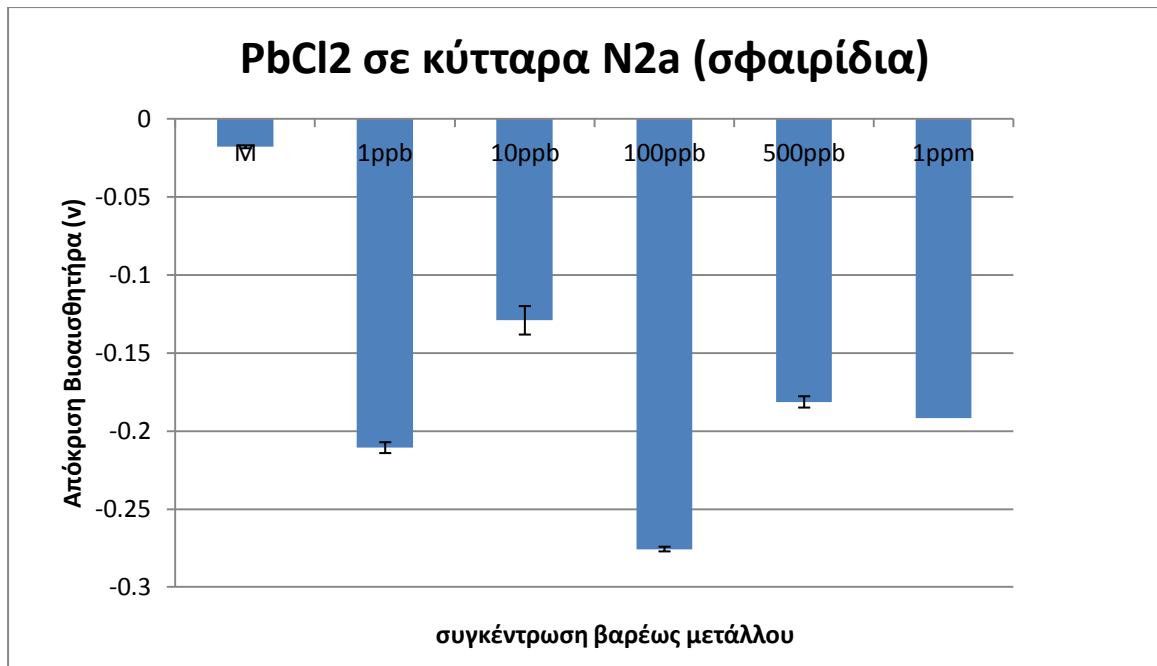
- Απόκριση κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς στο μόλυβδο.

Παρατηρώντας τα διαγράμματα 1, 2 και 3 βλέπουμε ότι υπάρχει διαφοροποίηση στην απόκριση του αισθητήρα μεταξύ και των τριών κυτταρικών σειρών για τη μηδενική συγκέντρωση (μάρτυρας M) του μολύβδου. Επιπλέον, κάθε κυτταρική σειρά αντιδρά διαφορετικά στις πέντε συγκεντρώσεις του βαρέος μετάλλου με ελάχιστο σφάλμα.

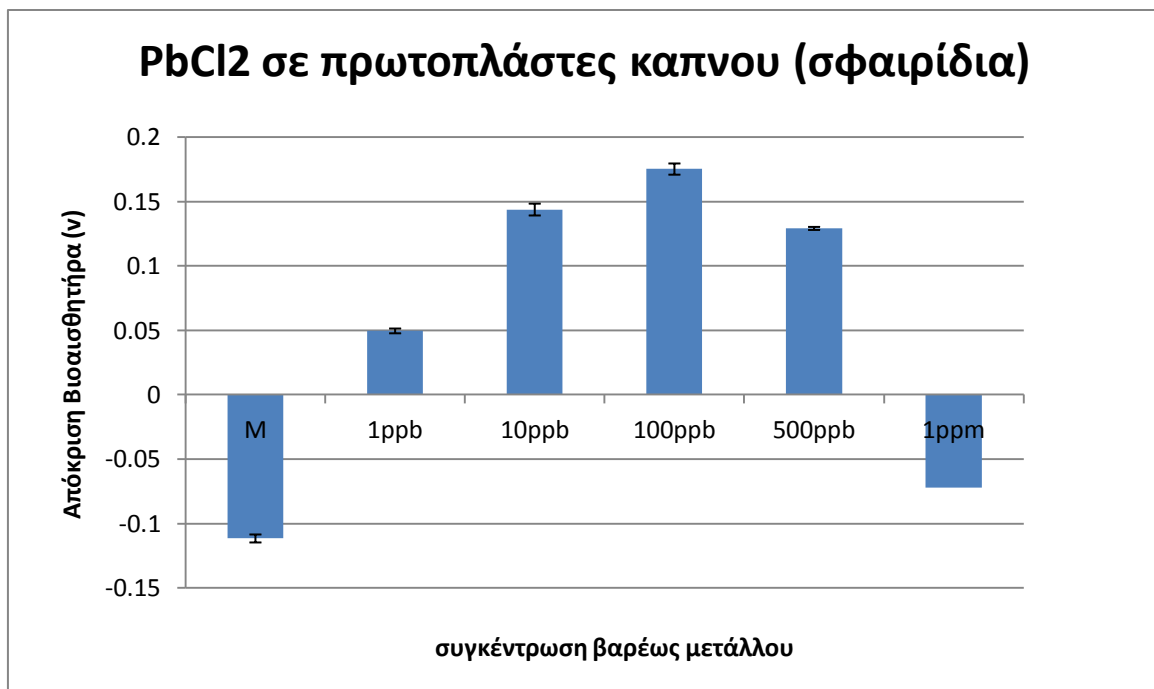
Παρατηρείται επίσης ότι στην κυτταρική σειρά Vero (κυρίως) και στους πρωτοπλάστες καπνού (δευτερευόντως, μέχρι τη συγκέντρωση των 100 ppb) η απόκριση του αισθητήρα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του βαρέος μετάλλου εμφανίζει μια γραμμικότητα σε σχέση με τα κύτταρα N2a. Οι τιμές απόκρισης του αισθητήρα είναι από -0,05 mV έως 0,15 mV. Και στις τρεις περιπτώσεις υπήρχε σαφής διαχωρισμός της απόκρισης στην παρουσία μολύβδου από τον μάρτυρα.



Διάγραμμα 1. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ns} γενιάς με κύτταρα Vero σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του μολύβδου



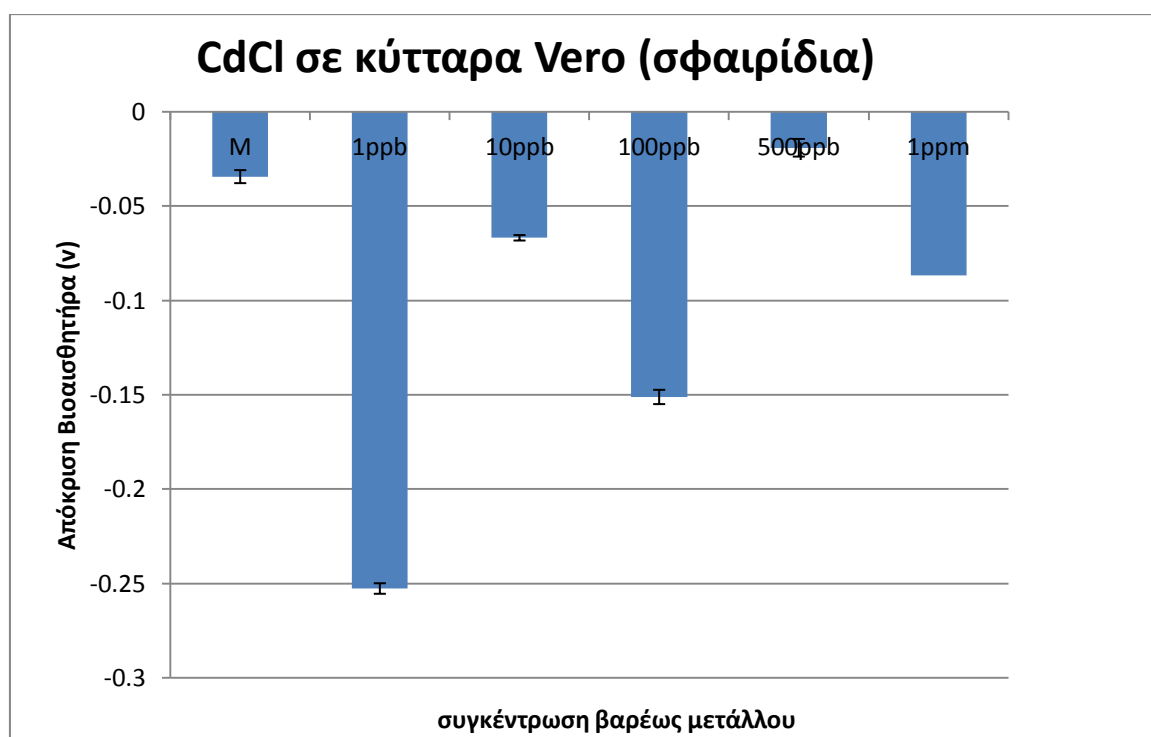
Διάγραμμα 2. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ns} γενιάς με κύτταρα N2a σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του μολύβδου



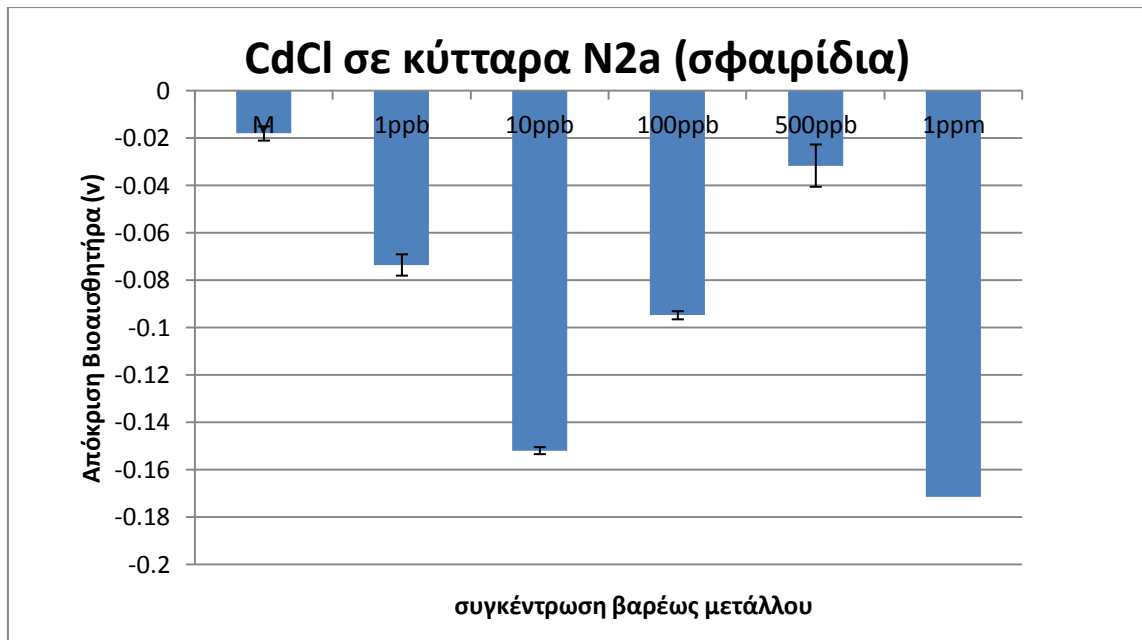
Διάγραμμα 3. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ns} γενιάς με πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του μολύβδου

• Απόκριση κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς στο Κάδμιο

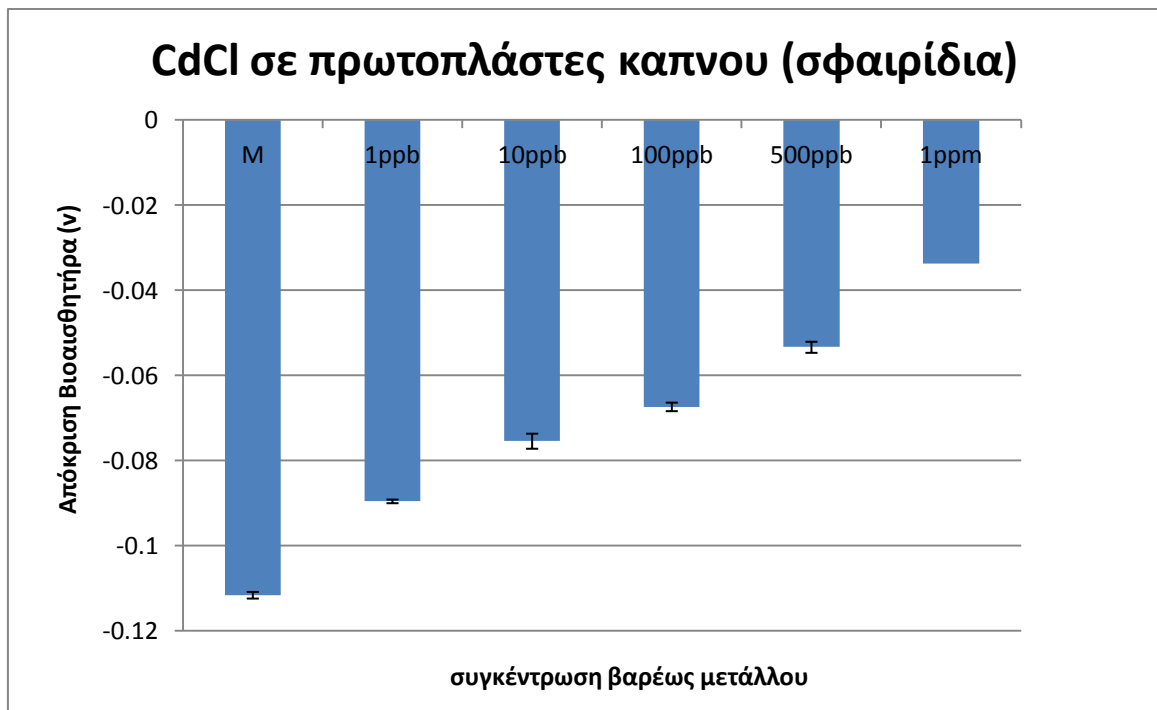
Η επίδραση του καδμίου προκάλεσε αρνητικές αποκρίσεις του βιοαισθητήρα στις επιμέρους συγκεντρώσεις (Διαγράμματα 4, 5 και 6). Και εδώ παρατηρούμε ότι υπάρχει διαφοροποίηση στην απόκριση του αισθητήρα μεταξύ και των τριών κυτταρικών σειρών για τη μηδενική συγκέντρωση (μάρτυρας M). Όπως και στην περίπτωση του μολύβδου, οι αποκρίσεις των πρωτοπλαστών καπνού (κυρίως) και των κυττάρων Vero (δευτερευόντως) ήταν περισσότερο γραμμικές από ότι αυτή του N2a. Οι τιμές απόκρισης του αισθητήρα είναι από -0,02 mV έως -0,25 mV. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των ζωϊκών κυττάρων, η απόκριση στη συγκέντρωση 500 ppb διέφερε οριακά (N2a) ή και καθόλου (Vero) από τον μάρτυρα.



Διάγραμμα 4. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα Vero σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του καδμίου



Διάγραμμα 5. Απόκριση βιοισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα N2a σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του καδμίου

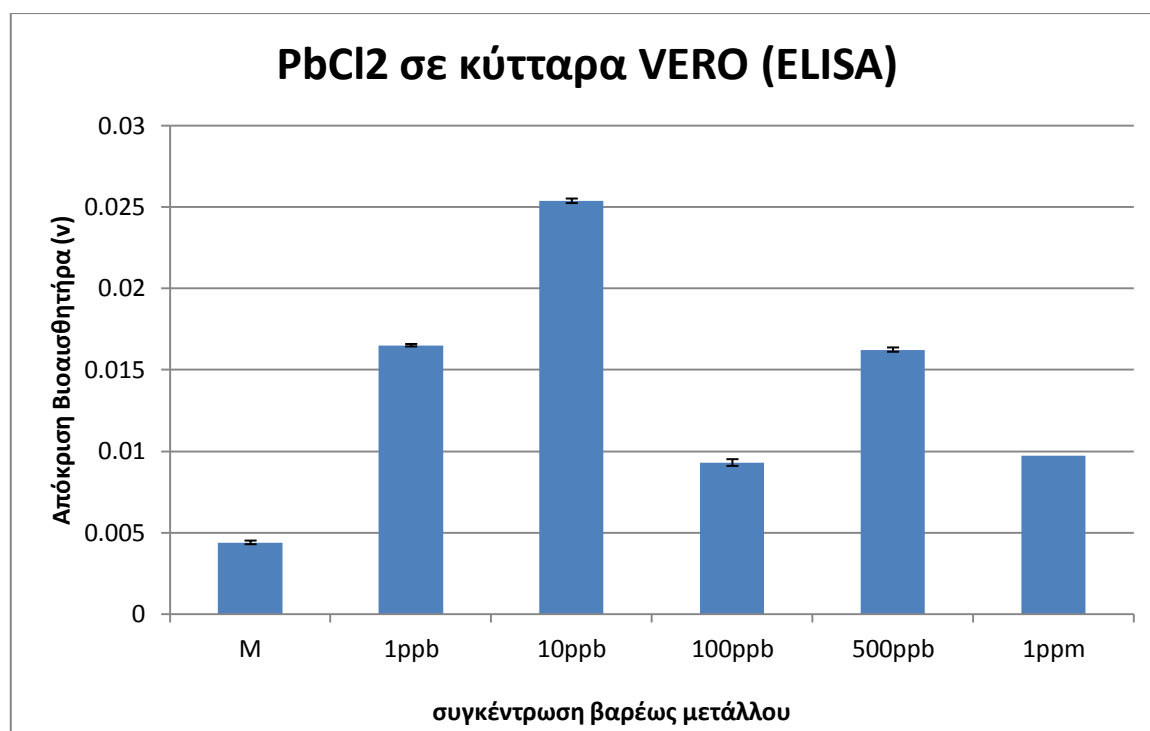


Διάγραμμα 6. Απόκριση βιοισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του καδμίου

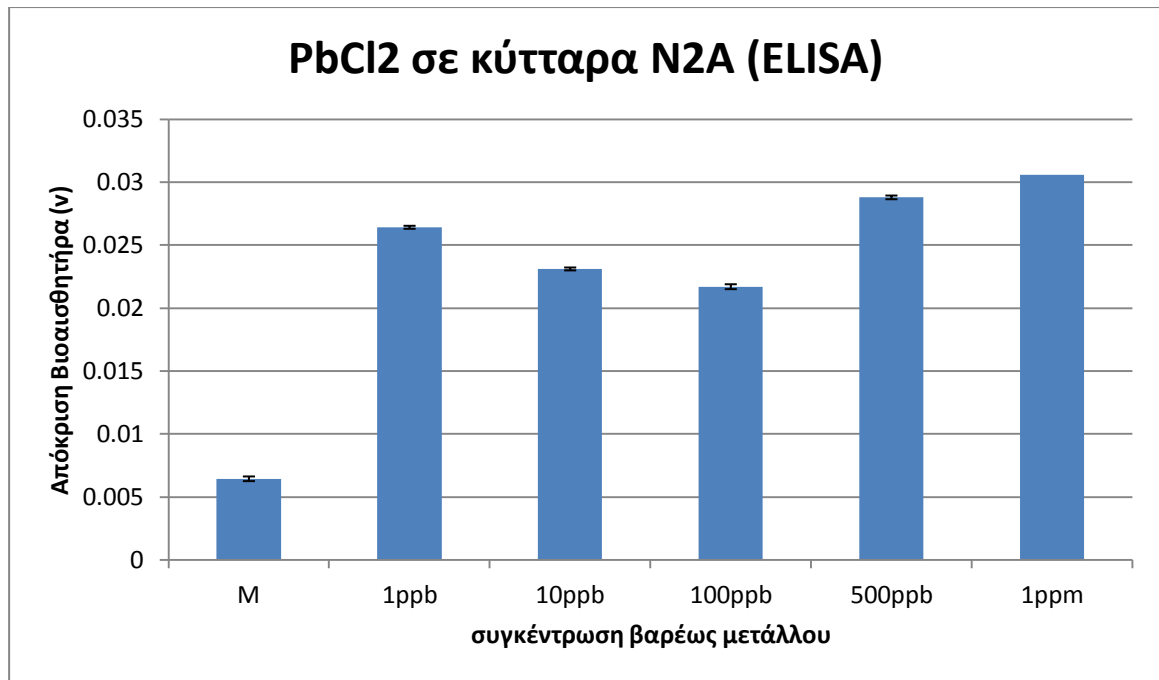
4.2.1. Αποτελέσματα απόκρισης κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς σε πλακίδιο ELISA (κύτταρα N2a, VERO και πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού)

- Απόκριση κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς μόλυβδο

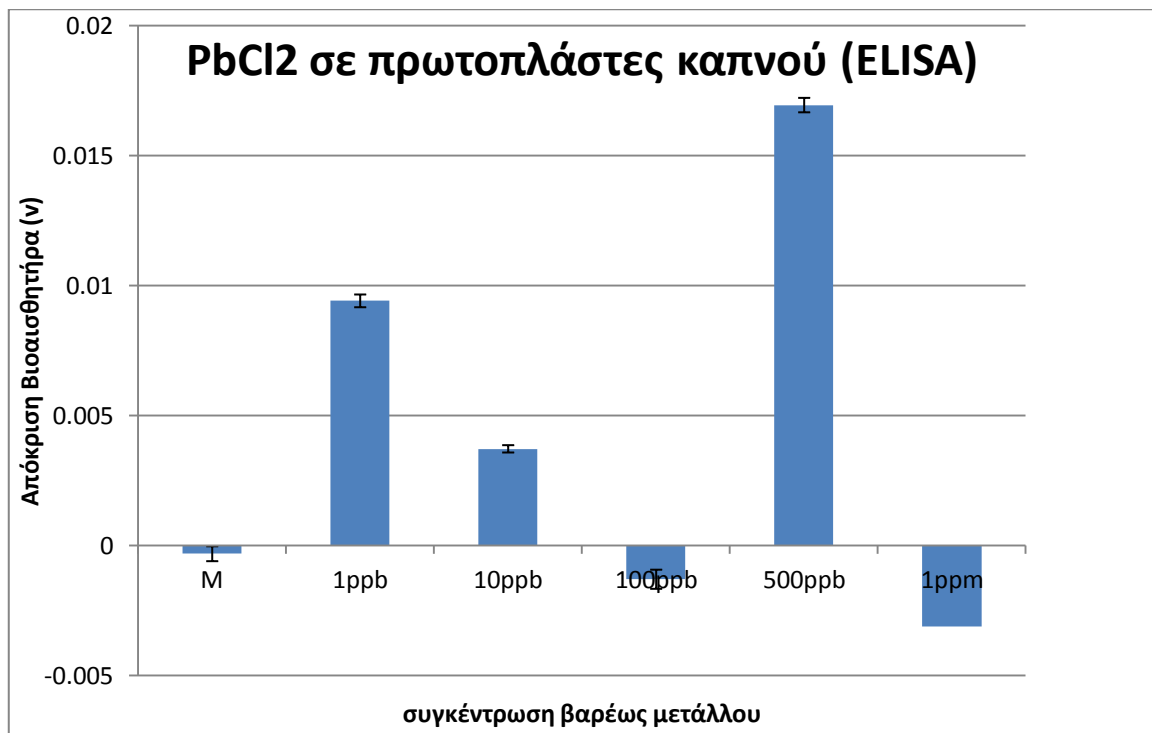
Στα διαγράμματα 7 και 8 παρατηρούνται θετικές τιμές αποκρίσεων. Οι τιμές απόκρισης του αισθητήρα είναι από -0,005mV έως 0.03mV. Παρατηρούμε ότι υπάρχει διαφοροποίηση στην απόκριση του αισθητήρα μεταξύ και των τριών κυτταρικών σειρών για τη μηδενική συγκέντρωση (μάρτυρας M). Επιπλέον, κάθε κυτταρική σειρά αντιδρά διαφορετικά στις πέντε συγκεντρώσεις του βαρέως μετάλλου με ελάχιστο σφάλμα. Μόνο στην κυτταρική σειρά N2a (διάγραμμα 8) διακρίνεται μία γραμμικότητα στην απόκριση του βιοαισθητήρα στην περιοχή συγκεντρώσεων 100 ppb – 1ppm του βαρέος μετάλλου. Και στις δύο ζωικές κυτταρικές σειρές διαπιστώνεται σαφής διαφοροποίηση από την απόκριση του μάρτυρα. Αντίθετα, στην περίπτωση των πρωτοπλαστών καπνού, η παρατηρηθείσα απόκριση είναι λιγότερο διακριτή και ερμηνεύσιμη.



Διάγραμμα 7. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα Vero σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του μόλυβδου



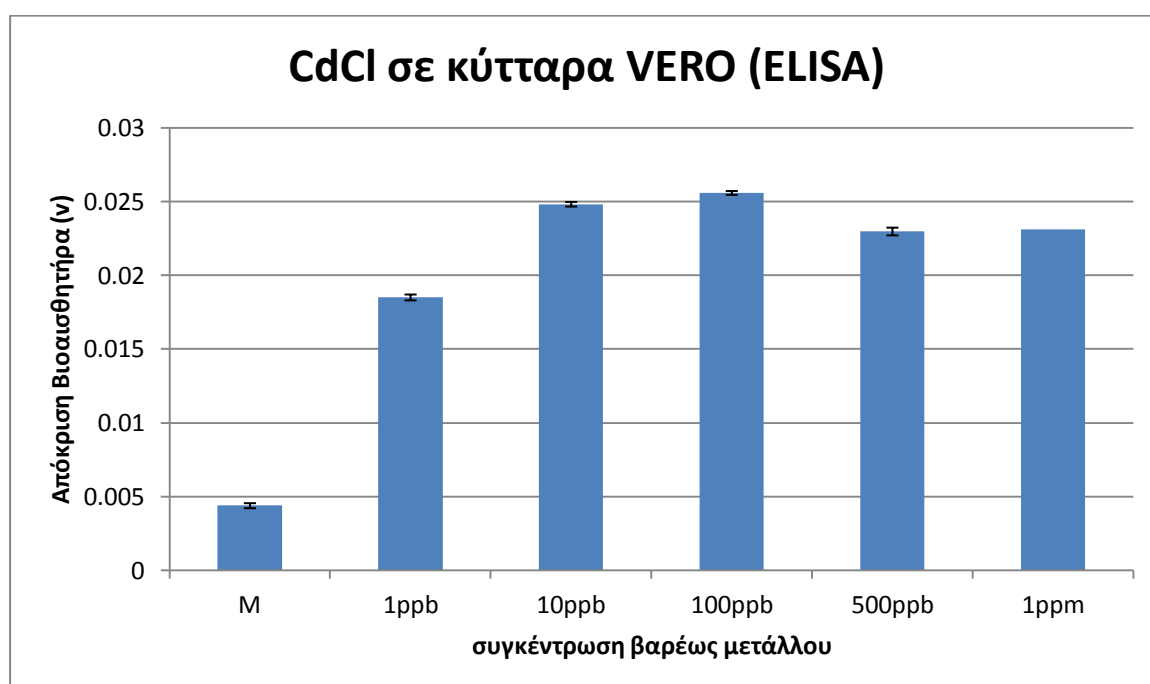
Διάγραμμα 8. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα N2a σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του μολύβδου



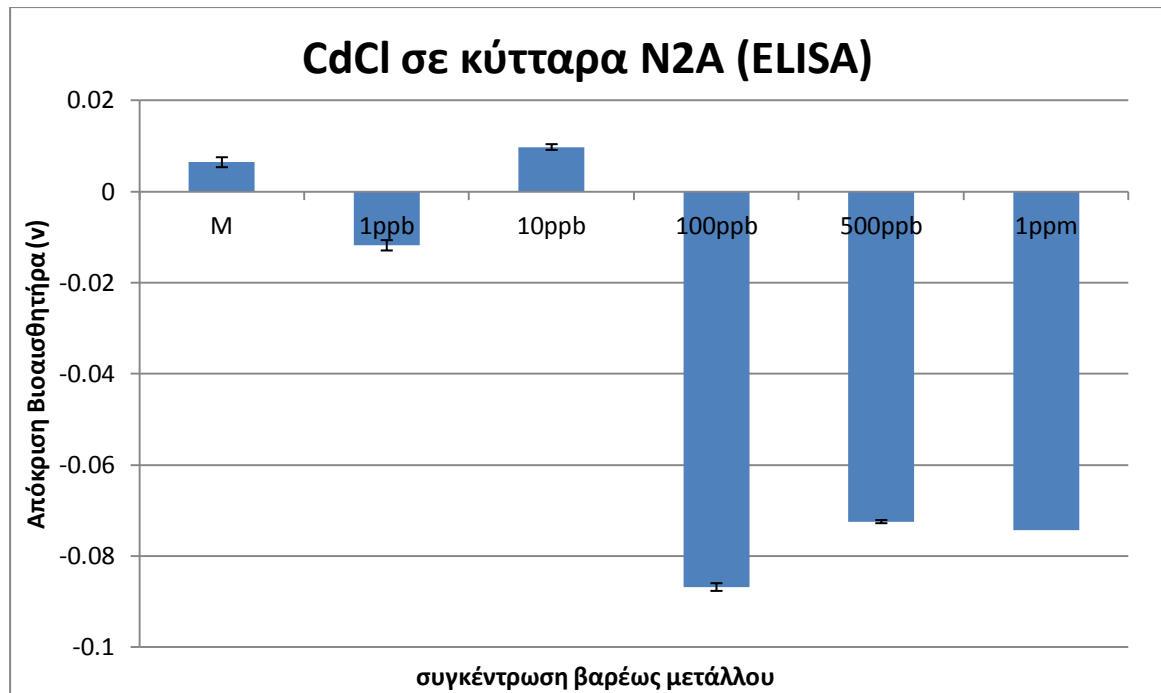
Διάγραμμα 9. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με πρωτοπλάστες από φύλλα καπνού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του μολύβδου

- Απόκριση κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA 5^{ης} γενιάς στο κάδμιο

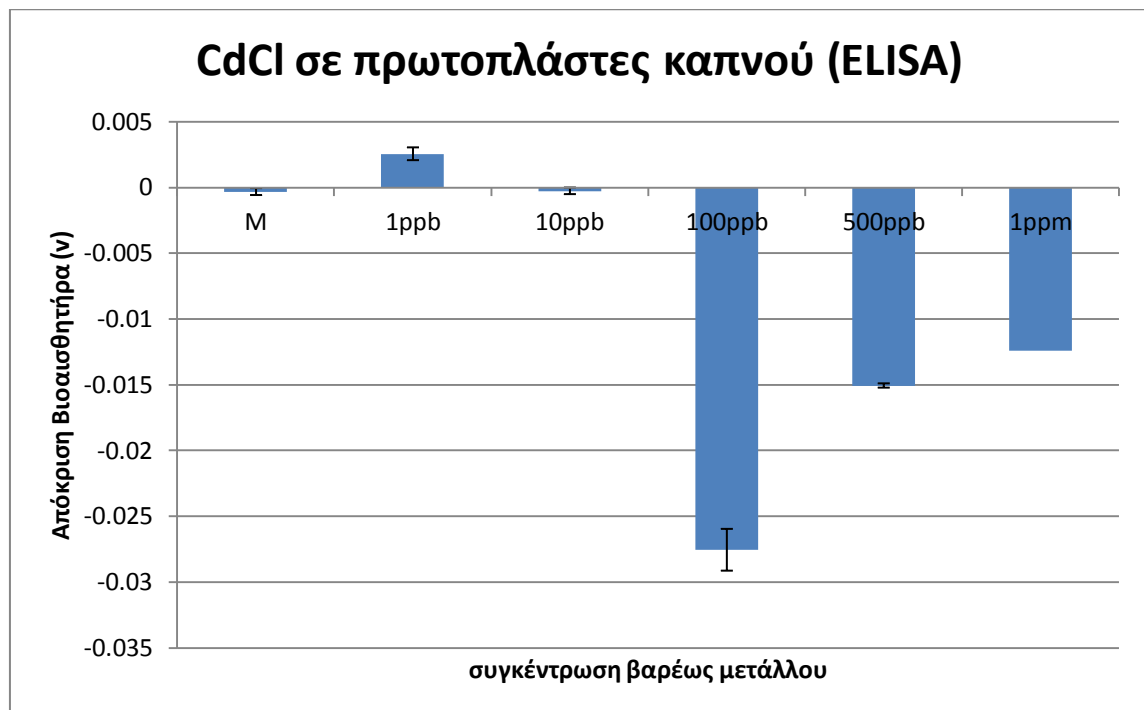
Στα διαγράμματα 10, 11 και 12 και των τριών κυτταρικών σειρών παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της απόκρισης μεταξύ του μάρτυρα και των συγκεντρώσεων του. Επιπλέον, κάθε κυτταρική σειρά αντιδρά διαφορετικά στις πέντε συγκεντρώσεις του βαρέως μετάλλου με ελάχιστο σφάλμα. Οι τιμές απόκρισης του αισθητήρα είναι από -0,025mV έως 0.025mV. Πιο αναλυτικά στο διάγραμμα 10 (κύτταρα Vero) παρατηρήθηκαν θετικές τιμές με σχετική γραμμικότητα αλλά μεγάλη διαφορά από την απόκριση του μάρτυρα. Παράλληλα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του διαγράμματος 11 έχουμε αρνητικές τιμές για τις πρότυπες συγκεντρώσεις εκτός των 10ppb και του μάρτυρα. Τέλος, με τη χρήση πρωτοπλαστών (διάγραμμα 12) έχουμε αρνητικές τιμές στις αποκρίσεις με εξαίρεση το 1 ppb.



Διάγραμμα 10. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα Vero σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του καδμίου



Διάγραμμα 11. Απόκριση βιοαισθητήρα BERA 5^{ης} γενιάς με κύτταρα N2a σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του καδμίου



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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Σκοπός - Συμπεράσματα

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

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

την κατηγοριοποίηση της, είναι επίσης επιθυμητή και η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των τοξικών ουσιών που εξετάζονται, κάτι που αποδεικνύεται δύσκολο, καθώς πολλές τοξικές ουσίες προκαλούν παρόμοιες μεταβολές στο παραγόμενο σήμα.

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

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

Τα κύτταρα VERO αποτελούν κύτταρα προερχόμενα από νεφρικά κύτταρα του αφρικάνικου πράσινου πιθήκου *Cercopithecus aethiops* που συνιστώνται για τον εντοπισμό της κυτταροτοξικότητας *in vitro*. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο BERA 5^{ης} γενιάς και για τις δύο μορφές (σφαιρίδια και πλακίδια ELISA), τα αποτελέσματα που προέκυψαν επιτρέπουν την εκτίμηση ότι η έκθεση κυττάρων N2a τόσο στο μόλυβδο όσο και στο κάδμιο, (διαγράμματα 1, 4, 7 και 10), παρουσίασε διαφορά στις αποκρίσεις των αισθητήρων μεταξύ προτύπων συγκεντρώσεων και μάρτυρα, αλλά και αρκετά σαφείς διαφοροποιήσεις για όλες τις επιμέρους συγκεντρώσεις.

Τα νευρικά κύτταρα νευροβλαστώματος (N2a) είναι ηλεκτρικά ενεργά και έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές μορφολογικές και βιοχημικές μελέτες (Borkholder 1998). Εκφράζουν τις κύριες οικογένειες τασο-ελεγχόμενων καναλιών, (Na^+ , Ca^{2+} και K^+), που αποκρίνονται σε μεγάλη ποικιλία παρεμποδιστών ιοντικών καναλιών. Χρησιμοποιώντας, παρομοίως όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τη μέθοδο BERA, για το μόλυβδο και το κάδμιο, (διαγράμματα 2, 5, 7 και 11), έχουμε κι εδώ διαφορά στις αποκρίσεις των αισθητήρων μεταξύ προτύπων συγκεντρώσεων και μάρτυρα, αλλά και αρκετά σαφείς διαφοροποιήσεις για σχεδόν όλες τις επιμέρους συγκεντρώσεις.

Οι πρωτοπλάστες της μελέτης αυτής, είναι φυτικά κύτταρα στα οποία έγινε λύση του κυτταρικού τοιχώματος ώστε να υπάρχει άμεση πρόσβαση στην κυτταρική μεμβράνη και προέρχονται από φύλλα καπνού *Nicotiana tabacum* (ποικιλίας Samsun). Σε αυτή την περίπτωση δεν έχουμε πάντα διαφορά μεταξύ όλων των προτύπων συγκεντρώσεων και του μάρτυρα και επίσης παίρνουμε τιμές απόκρισης του αισθητήρα και αρνητικές και θετικές.

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι αποκρίσεις των διαφορετικών ειδών κυττάρων και αισθητήρα στα δύο μέταλλα.

ΤΥΠΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	ΤΥΠΟΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ	Pb	Cd
VERO	ΣΦΑΙΡΙΔΙΟ	ΠΟΣΟΤΙΚΗ	ΗΜΙΠΟΣΟΤΙΚΗ
	ΠΛΑΚΙΔΙΟ	ΠΟΙΟΤΙΚΗ	ΠΟΙΟΤΙΚΗ
N2A	ΣΦΑΙΡΙΔΙΟ	ΠΟΙΟΤΙΚΗ	ΠΟΙΟΤΙΚΗ
	ΠΛΑΚΙΔΙΟ	ΠΟΙΟΤΙΚΗ	ΜΗ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΗ
ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΕΣ ΚΑΠΝΟΥ	ΣΦΑΙΡΙΔΙΟ	ΠΟΙΟΤΙΚΗ	ΠΟΣΟΤΙΚΗ
	ΠΛΑΚΙΔΙΟ	ΜΗ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΗ	ΜΗ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΗ

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

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

κυτταροπλασματικού ασβεστίου μπορεί να σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ακινητοποιημένων κυττάρων μόνο όταν τα κύτταρα είναι ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια.

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

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

1. Η υψηλή ταχύτητα ανάλυσης (3 min έναντι μίας ημέρας)
2. Το χαμηλό κόστος ανάλυσης (30-60 έναντι 100-220)
3. Η δυναμικότητα της μεθόδου (χιλιάδες αναλύσεις/ημέρα έναντι δεκάδων/ημέρα)

Το κυριότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι οι κυτταρικοί αισθητήρες αντιμετωπίζουν το πρόβλημα του ακριβούς προσδιορισμού της φύσης των εξεταζόμενων ουσιών.

Τα τελευταία 25 χρόνια γίνεται αναφορά στην χρήση ολόκληρων κυττάρων ως αισθητήρια στοιχεία αναλυτικών συστημάτων. Οι ερευνητικές δραστηριότητες στο πεδίο των κυτταρικών βιοαισθητήρων έχουν σημειώσει ραγδαία εξέλιξη. Παρόλα αυτά πολύ λίγες διατάξεις κυτταρικών βιοαισθητήρων έχουν χρησιμοποιηθεί στο εμπόριο. Τα βακτηριακά κύτταρα αποτελούν πολύ διαδεδομένο βιολογικό υλικό ανίχνευσης των κυτταρικών βιοαισθητήρων. Βελτιώσεις στις συνθήκες αποθήκευσης των ζωικών κυττάρων, αναμένεται να ενισχύσει την εξαγωγή των κυτταρικών βιοαισθητήρων στο εμπόριο για την χρήση τους σε φαρμακευτικούς και ιατρικούς ελέγχους, υψηλής πιστότητας. Αυτό μπορεί να προκύψει από τα βελτιωμένα υποστρώματα ακινητοποίησης ή από την ανάπτυξη καινοτόμων συστημάτων που θα απαρτίζονται από μικροαισθητηριακές διατάξεις, ικανές να μετρήσουν φυσικοχημικές παραμέτρους των

καλλιεργούμενων κυττάρων. Επίσης, η ανάπτυξη μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών, με εξειδίκευση σε επιθυμητές ουσίες στόχους, έχει δειχθεί ότι μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία βιοαισθητήρων με μηδενικά λανθασμένα αρνητικά ή λανθασμένα θετικά αποτελέσματα.

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

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Alocilja E. C., Radke S. M** (2003). Market analysis of biosensors for food safety.
- **Argiriou A. A** (2004). Semiconductor sensors, thermal sensors, mechanical, magnetic, radiant sensors and chemical sensors
- **Bedair S. S., Fedder G. K** Microcantilever Gas Chemical Sensors with Multi-modal Capability
- **Bedioui F** (1999). Foreword. *Analisis* **27**: 555-557
- **Bickerstaff G. F** (1997). Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press, Totowa, NJ
- **Borkholder D. A** (1998). Cell based biosensors using microelectrodes. pp. 1-129
- **Chaplin M** (2004). Immunosensors. London South Bank University
- **Daunert S., Barrett G., Feliciano J. S., Shetty R. S., Shrestha S., Smith-Spencer W** (2000). Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chem. Rev.* **100**: 2705-2738
- **DeBusschere B. D** (2002). Portable Cell-Based Biosensors
- **Eggins B. R** (2002). Chemical sensors and biosensors. Medical and Biological Applications, Wiley-VCH: London. 2002.
- **Flampouri E, Mavrikou S, Kintzios S, Miliadis G, Aplada-Sarli P** (2010) Development and Validation of a Cellular Biosensor Detecting Pesticide Residues in Tomatoes. *Talanta* **80**: 1799-1804
- **Flaskos J., McLean W. G., Fowler M. J., Hargeaves A. J** (1998). Tricrecyl phosphate inhibits the formation of axon-like processes and disrupts neurofilaments in cultured mouse N2a and rat PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **242**: 101-104
- **Fraden J** (2004). Third Edition of Handbook of Modern Sensors: physics, designs, and applications, Chapter 1
- **Frossyniotis D., Anthopoulos Y., Perdikaris A., Yialouris C. P** (2006). A multisensor fusion system for the detection of plant viruses by combining artificial neural networks. *Lectures Comp. Sci.* **4132**: 401-409

- **Frossyniotis D., Anthopoulos Y., Kintzios S., Moschopoulou G., Yialouris C. P** (2008). Artificial Neural Network Selection for the Detection of Plant Viruses. *World Journal of Agricultural Sciences* **4**: 114-120
- **Gilchrist K. H** (2003). Characterization and validation of cell-based biosensors. pp. 1-134
- **Guilbalt G. C., Hock B., Schmidt R** (1992). *Biosensors Bioelectronics* **7**: 411-419
- **Hulanicki A., Glab S., Ingman F** (1991). Chemical Sensors – Definitions and classifications. *International Union of Pure and Applied Chemistry* **63**: 1247-1250
- **Keusgen M** (2002). Biosensors: new approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften* **89**: 433-444
- **Kintzios S** Biosensors in food safety control: an update. Mini-Review
- **Kintzios S., Pistola E., Panagiotopoulos P., Bomsel M., Alexandropoulos N., Bem F., Ekonomou G., Biselis J., Levin R** (2001). Bioelectric Recognition Assay (BERA). *Biosensors and Bioelectronics* **16**: 325-336
- **Kintzios S., Pistola E., Konstas J., Bem F., Matakidis Th., Alexandropoulos N., Biselis I., Levin R** (2001). The application of the bioelectric recognition assay for the detection of human and plant viruses: definition of operational parameters. *Biosensors and Bioelectronics* **16**: 467-480
- **Kintzios S., Bem F., Mangana O., Nomikou K., Markoulatos P., Alexandropoulos N., Fasseas C., Arakelyan V., Petrou A.-L., Soukouli K., Moschopoulou G., Yialouris C., Simonian A** (2004). Study on the mechanism of Bioelectric Recognition Assay: evidence for immobilized cell membrane interactions with viral fragments. *Biosensors and Bioelectronics* **20**: 906-915
- **Kintzios S., Marinopoulou I., Moschopoulou G., Mangana O., Nomikou K., Endo K., Papanastasiou I., Simonian A** (2006). Development of a novel, multi-analyte biosensor system for assaying cell division: Identification of cell proliferation/death precursor events. *Biosensors and Bioelectronics* **21**: 1365-1373
- **Kintzios S** (2006). Next Generation Cell Sensor For Virus Identification-Field Based Assays. *Biodetection Technologies. 3rd Edition Proceedings* **1**: 7-32
- **Kintzios S** (2007). Cell-Based Biosensors in Clinical Chemistry. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **7**: 1019-1026

- **Lambrechts M., Sansen W. M. C** (1992). An introduction to microelectrochemical sensors. *Biosensors: Microelectrochemical Devices*
- **Makinwa K** (2008). *Electronic Instrumentation Laboratory / DIMES*, Delft University of Technology. *Sensors for wireless sensor networks*
- **Martinoia S., Massobrio G., Lorenzelli L** (2005). Modeling ISFET microsensor and ISFET – based Microsystems: A review. *Seroscand Actuators B: Chemical* **105**: 14-27
- **Mavrikou, S, Flampouri, E, Moschopoulou, G, Mangana, O, Michaelides, A, Kintzios, S** (2008) Assessment of organophosphate and carbamate pesticide residues in cigarette tobacco with a novel cell biosensor. *Sensors* **8**: 2818-2832
- **Mehvar M., Abdi M** (2004). Recent developments, characteristics and potential applications of electrochemical biosensors. *Analytical sciences* **20**: 1113-1126
- **Middelhoek S., Noorlag D. J. W** (1981). Signal conversion in solid-state transducers. *Sensors and Actuators* **2**: 211-228
- **Moschopoulou G., Kintzios S** (2006). Application of “membrane-engineering” to bioelectric recognition cell sensors for the ultra-sensitive detection of superoxide radical: A novel biosensor principle. *Analytica Chimica Acta* **573-574**: 90-96
- **Moschopoulou G., Papanastasiou I., Makri O., Lambrou N., Economou G., Soukoulis K., Kintzios S** (2007). Cellular redox-status is associated with regulation of frond division in *Spirodela polyrrhiza*. *Plant Cell Rep.* **26**: 2063-2069
- **Moschopoulou G., Vitsa K., Bem F., Vassilakos N., Perdikaris A., Blouhos P., Yialouris C., Frosyniotis D., Anthopoulos I., Mangana O., Nomikou K., Rodeva V., Kostova D., Grozeva S., Michaelides A., Simonian A., Kintzios S** (2008). Engineering of the membrane of fibroblast cells with virus-specific antibodies: A novel biosensor tool for virus detection. *Biosensors and Bioelectronics* **24**: 1033-1036
- **Owicki J. C., Parce J. W** (1991). Biosensors based on the energy metabolism of living cells: The physical chemistry and cell biology of extracellular acidification. *Biosens. Bioelectron.* **7**: 255-272
- **Pantoja R., Nagaraj J. M., Starace D. M., Melosh N. A., Blunck R., Bezanilla F., Iteath J. R** (2004). Silicon chip-based patch-clamp electrodes integrated with PDMS microfluidics. *Biosens. Bioelectron.* **20**: 509-517

- **Rainina E., Efremenco E., Varfolomeyev S., Simonian A. L., Wild J** (1996). The development of a new biosensor based on recombinant *E. coli* for the direct detection of organophosphorus neurotoxins. *Biosens. Bioelectron.* **11**: 991-1000
- **Ramakrishna S., Lala N. L., Garudadhvaj H., Ramaseshan R., Ganesh V. K** *Polymer Nanofibers for Biosensor Applications* **15**: 377-392
- **Robbens J., Maras M., Laureyn W., Blust R., De Coen W** (2005). Whole cell biosensors for (eco) toxicity screening: alternatives for the future. *NSTI-Nanotech* **1**: 497-500
- **Rogers K. R., Gerlach C. L** (1996). A Status Report on Biosensors for Ecological and Human Exposure Assessment. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 486-491
- **Souza S. F** (2001). Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **16**: 337-353
- **Stenger D. A., Gross G. W., Keefer E. W., Schaffer K. M., Andreadis J. D., Ma W., Pancrazio J. J** (2001). Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors. *Trends in Biotechnology* **19**
- **Taylor R. F., Schultz J. S** (1996). Introduction to chemical and biological sensors. *Handbook of Chemical and Biological Sensors*
- **Thevenot D. R., Toth K., Durst R., Wilson G. S** (1999). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* **71**: 2333
- **Varelas, V., Sanvicens N, Marco MP, Kintzios S** (2010) Development of a cellular biosensor for the detection of 2, 4, 6- trichloroanisole (TCA). *Talanta* **84**: 936-940
- **Xi-Liang Luo, Jing-Juan Xu, Wei Zhao, Hong-Yuan Chen** (2004). A novel glucose ENFET based on the special reactivity of MnO₂ nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* **19**: 1225-1300
- **Zieziulewicz T. J., Unfricht D. W., Hadjout N., Lynes M. A., Lawrence D. A** (2003). Shrinking the Biologic world – Nanobiotechnologies for toxicology. *Technological sciences* **74**: 235-244
- **Ζιώγας Β., Μαρκόγλου Α** (2007). Γεωργική Φαρμακολογία, Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. Εκτυπωτική Αττικής. Αθήνα
- **Κλώνης Ι** (1997). Ενζυμική Βιοτεχνολογία. Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης

- **Μαρινοπούλου Ι** (2005). Ανάπτυξη κυτταρικού βιοαισθητήρα για τη μέτρηση του υπεροξειδίου του οξυγόνου και μελέτη της κυτταροδιαίρεσης και φυσιολογικών παραμέτρων συσχετιζόμενων με αυτήν. Μεταπτυχιακή μελέτη ΓΠΑ
- **Μαρμαράς Β., Λαμπροπούλου-Μαρμαρά Μ** (2005). Βιολογία Κυττάρου. 5η Έκδοση. Τυρογαμα. Πάτρα
- **Πιστολά Ε** (2003). Μηχανισμοί της Βιοηλεκτρικής Μεθόδου Αναγνώρισης (BERA) και εφαρμογές (με έμφαση στην Ιολογία). Μεταπτυχιακή μελέτη ΓΠΑ
- **Μπλούχος Π** (2009). Ανάπτυξη κυτταρικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων χρησιμοποιούμενων στην καταπολέμιση εχθρών των εσπεριδοειδών. Μεταπτυχιακή μελέτη ΓΠΑ
- **Φεκ 197/Α/11-11-87** Πράξη Υ.Σ 144 της 02/11/1987
- <http://academic.scranton.edu/faculty/CANNM1/biochemistry/biochemistrymodule.html>
- http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm
- <http://www.alanwood.net/pesticides/>
- <http://www.gregalo.com/neuralnets.html>
- <http://www.mednet.gr>
- <http://www.ecodo-net.gr>
- <http://www.chem.uoa.gr>
- <http://www.jaist.ac.jp>
- <http://www.lsbu.ac.uk>