

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΣΤΟΥΣ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΚΑΙ
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΙΡΕΣΗΣ ΚΑΙ
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΓΕΩΡΓΙΑ ΜΟΣΧΟΠΟΥΛΟΥ**

ΑΘΗΝΑ 2013

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗΣ
ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΣΤΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ
ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ
ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΙΡΕΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΓΕΩΡΓΙΑ ΜΟΣΧΟΠΟΥΛΟΥ**

ΑΘΗΝΑ 2013

Η αποδοχή για την εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύθεσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (ΓΣΕΣ 1^η/28-09-2006). Ο ορισμός της τριμελούς επιτροπής και η ανάθεση του θέματος έγιναν με αποφάσεις των ΓΣΕΣ (5^η/14-12-2006 και 8^η/19-12-2006, αντίστοιχα), ενώ η τροποποίηση του θέματος εγκρίθηκε κατά τη 19^η/01-06-2011 ΓΣΕΣ.

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή εγκρίθηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ (6^η/17-01-2013).

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- Σπυρίδων Κίντζιος, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)
- Ιωάννης Κλώνης, Καθηγητής ΓΠΑ
- Κωνσταντίνος Φασσέας, Καθηγητής ΓΠΑ
- Γεώργιος Αϊβαλάκις, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ
- Νικόλαος Λάμπρου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ
- Ελένη Ντούνη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ
- Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει δημοσιευθεί ως εξής:

Πρωτότυπες Επιστημονικές Δημοσιεύσεις:

- Moschopoulou G, Papanastasiou I, Makri O, Lambrou N, Economou G, Soukouli K, Kintzios SE (2007) Cellular redox-status is associated with regulation of frond division in *Spirodela polyrrhiza*. *Plant Cell Reports*, **26** (12): 2063-9.
- Moschopoulou, G.; Valero, T.; Kintzios, S. (2011) Molecular Identification through Membrane Engineering as a Revolutionary Concept for the Construction of Cell Sensors with Customized Target Recognition Properties: the Example of Superoxide Detection. *Procedia Engineering*, **25**: 1541-1544.
- Moschopoulou, G., Valero, T., Kintzios, S. (2012) Superoxide determination using membrane-engineered cells: An example of a novel concept for the construction of cell sensors with customized target recognition properties. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, **175**: 78-84.
- Valero, T.; Moschopoulou, G.; Mayor-Lopez, L.; Kintzios, S. (2012) Moderate superoxide production is an early promoter of mitochondrial biogenesis in differentiating N2a neuroblastoma cells. *Neurochemistry International*, **61** (8): 1333-1343.

Ανακοινώσεις σε Συνέδρια:

- Μοσχοπούλου Γ., Μαγγανά Ο., Νομικού Κ., Κίντζιος Σ. (2006) Εφαρμογή της «μεμβρανικής μηχανικής» στους βιοαισθητήρες BERA για την ανίχνευση πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων $O_2^{\bullet -}$: Ένα καινοτόμο βιοαισθητηριακό σύστημα. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες. Ελληνική Εταιρεία Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες. Καρδαμύλη, 28 Σεπτεμβρίου – 1 Οκτωβρίου 2006.
- Moschopoulou G., Kintzios S. (2008) Advances in oxygen superoxide determination through molecular identification through membrane engineering:

development of cell sensors with 1 pm detection limit. *International Conference on Oxidative Stress In Skin Biology and Medicine. Andros, Greece, September 11-14, 2008.*

- Moschopoulou G., Valero T., Kintzios S. (2011) Molecular Identification through Membrane Engineering as a revolutionary concept for the construction of cell sensors with customized target recognition properties: the example of superoxide detection. *EuroSensors XXV. Athens, Greece, September 4-7, 2011.*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την άμεση και διαρκή επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σπυρίδωνα Κίντζιου.

Θερμές ευχαριστίες αρμόζουν σε όλους τους πιο κάτω:

Καθηγητή κ. Σπυρίδωνα Κίντζιο, ο οποίος με την ανάθεση της μελέτης αυτής, την αμέριστη βοήθειά του, το συνεχές ενδιαφέρον και επίβλεψή του σε όλα τα στάδια της μελέτης, βοήθησε τα μέγιστα στην εξέλιξη και την πραγματοποίηση αυτής.

Καθηγητή κ. Ιωάννη Κλώνη και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νικόλαο Λάμπρου για τη συμμετοχή τους και συνεχή επίβλεψη της μελέτης ως μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Φασσέα, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Αϊβαλάκι, και Επίκουρους Καθηγητές κα. Ελένη Ντούνη και κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη, για την συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή, δίνοντας μου τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Στους κ. Δημήτρη Κοντογιάννη και κα Σοφία Γραμμενούδη του Ινστιτούτου Αλέξανδρος Φλέμινγκ, για την παραχώρηση του οργάνου FACSCalibur II και για τον απαιτούμενο χώρο και χρόνο που μου έδωσαν, ούτως ώστε να πραγματοποιηθεί μέρος του πειράματός.

Στους υποψήφιους διδάκτορες Σοφία Μαυρίκου, Πέτρο Μπλούχο, Ευαγγελία Φλαμπούρη και Teresa Valero για την βοήθεια και τις συμβουλές τους.

Στις κα Όλγα Μαγγανά και κα Κυριακή Νομικού του Υπουργείου Γεωργίας, Κέντρο Ελέγχου Λοιμόξεων, Εργαστήριο ιών, για τη βοήθεια τους κατά την αρχική φάση της διδακτορικής διατριβής.

Στον κ. Γεώργιο Γιαννακό, Διευθυντή Α` Παθολογικής Κλινικής ΝΙΜΙΤΣ, για την ανάλυση δειγμάτων αίματος.

Τα προγράμματα EMBIO της Κυπριακής Δημοκρατίας και CellCheck, Marie Curie της Ευρωπαϊκής Ένωσης, για την χρηματοδότηση μέρους των πειραμάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου καθώς και τους φίλους μου, Έλληνες και Ισπανούς, που μου ήταν εκεί όταν τους χρειάστηκα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	13
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	15
SUMMARY	17
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	19
Ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS)	21
Μεταβολικές παρενέργειες ενεργών μορφών οξυγόνου	22
Εξουδετέρωση των ROS από βιοχημικούς και μη μηχανισμούς	25
ROS και κυτταρική διαίρεση	27
Βιοαισθητήρας για τη μέτρηση σουπεροξειδίου (O ₂ ⁻)	28
Κυτταρικοί βιοαισθητήρες	31
Βιοαισθητήρες βασισμένοι σε κύτταρα θηλαστικών	32
Ηλεκτροφυσιολογικές μέθοδοι μέτρησης – Εφαρμογές	37
B1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	49
B2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	51
Γ1. ΠΡΩΤΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ: ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ	55
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	57
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	59
2.1 Αισθητήριο κυτταρικό υλικό	59
2.2 Καλλιέργεια και Απομόνωση κυττάρων	59
2.3 Ηλεκτροεισαγωγή της SOD στις κυτταρικές μεμβράνες	59
2.4 Ηλεκτροεισαγωγή διαφορετικών συγκεντρώσεων SOD στις κυτταρικές μεμβράνες	61
2.5 Εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών κατά την ηλεκτροεισαγωγή	61
2.6 Παρασκευή κυτταρικού βιοαισθητήρα BERA 6 ^{ης} γενιάς	61
2.7 Πρότυπα Διαλύματα	62
2.8 Διάταξη βιοαισθητήρα και καταγραφή μέτρησης	62
2.9 Παρεμπόδιση SOD και φθορισμομετρική μέτρηση μεμβρανικού δυναμικού και ενδοκυτταρικού ασβεστίου	64
2.10 Παρεμπόδιση των SERCA αντλιών ασβεστίου του ενδοπλασματικού δικτύου	66
2.11 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	67
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	69

3.1 Μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού και της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικού ασβεστίου μετά την παρεμπόδιση της SOD	69
3.2 Μεταβολή της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικού ασβεστίου μετά την παρεμπόδιση των SERCA αντλιών	71
3.3 Απόκριση του κυτταρικού αισθητήρα BERA 6 ^{nc} γενιάς με διαφορετικές συγκεντρώσεις ηλεκτροεισαγώμενης SOD	72
3.4 Η απόκριση του αισθητήρα BERA 6 ^{nc} γενιάς εξαρτάται από τη συγκέντρωση των κυττάρων αλλά και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου	73
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	75
Γ2. ΔΕΥΤΕΡΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ IN VITRO ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΙΡΕΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	79
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	81
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	85
2.1 Φυτικό υλικό	85
2.2 Βιοχημικές Αναλύσεις	86
2.2.1 Μέτρηση αριθμού φυτών και νωπού βάρους	86
2.2.2 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός ελευθέρων ριζών (ROS)	86
2.2.3 Μέτρηση O ₂ ⁻ με κυτταρικό βιοαισθητήρα BERA 6ης γενιάς	87
2.2.4 Απομόνωση μιτοχονδρίων και προσδιορισμός μεμβρανικού δυναμικού μιτοχονδρίων	87
2.2.5 Προσδιορισμός κυτταροπλασματικού κυτοχρώματος C	89
2.2.6 Δραστικότητα Κασπάσης-3	90
2.2.7 Μέτρηση σχετικής ενεργότητας SOD	91
2.3 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	93
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	95
3.1 Ρυθμός ανάπτυξης <i>S. polyrrhiza</i>	95
3.2 Συγκέντρωση ελευθέρων ριζών κατά την κυτταροδιαίρεση του <i>S. polyrrhiza</i>	96
3.3 Συγκέντρωση O ₂ ⁻ κατά την κυτταροδιαίρεση του <i>S. polyrrhiza</i> με τον βιοαισθητήρα BERA 6 ^{nc} γενιάς	97
3.4 Μιτοχονδριακό μεμβρανικό δυναμικό κατά την κυτταροδιαίρεση του <i>S. polyrrhiza</i>	97
3.5 Συγκέντρωση κυτοχρώματος C κατά την κυτταροδιαίρεση του <i>S. polyrrhiza</i>	98
3.6 Δραστικότητα Κασπάσης-3 κατά την κυτταροδιαίρεση του <i>S. polyrrhiza</i>	99
3.7 Σχετική ενεργότητα SOD κατά την κυτταροδιαίρεση του <i>S. polyrrhiza</i>	99
3.8 Συσχέτιση των μετρούμενων παραμέτρων κατά την κυτταροδιαίρεση του <i>S. polyrrhiza</i>	100
4. ΣΥΖΥΤΗΣΗ	103
Γ3. ΤΡΙΤΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ IN VITRO ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΖΩΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	107
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	109
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	111
2.1 Σήμανση διαφοροποιημένων N2α κυττάρων	111
2.2 Κυτταρομετρία ροής	112
2.3 Μέτρηση O ₂ ⁻ με κυτταρικό βιοαισθητήρα BERA 6 ^{nc} γενιάς	113
2.4 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	113
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	115
3.1 Διαφοροποίηση N2α κυττάρων με Φορσκολίνη και db-cAMP	115

3.2 Μέτρηση επιπέδων ελεύθερων ριζών με κυτταρομετρία ροής στα διαφοροποιημένα κύτταρα	115
3.3 Μέτρηση επιπέδων μιτοχονδριακού O_2^- με κυτταρομετρία ροής στα διαφοροποιημένα κύτταρα	117
3.4 Μέτρηση επιπέδων O_2^- με βιοαισθητήρα BERA 6 ^{ns} γενιάς	118
3.5 Συσχέτιση των μετρούμενων παραμέτρων κατά την κυτταροδιαίρεση των κυττάρων N2a	119
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	121
<i>Γ4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ</i>	125
<i>Δ. ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</i>	133
<i>Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</i>	139

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

db-cAMP:	Κυκλική μονοφωσφορική διβουτυρυλαδενοσίνη (Dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphate)
AMC:	7-άμινο-4-μεθύλιο-κουμαρίνη (7-amino-4-methyl Coumarin)
BERA:	Βιοηλεκτρική Μέθοδος Αναγνώρισης (Bioelectric Recognition Assay)
CANARY:	Κυτταρική ανάλυση και κοινοποίηση των κινδύνων αντιγόνου και των αποδόσεων (Cellular Analysis and Notification of Antigen Risks and Yields)
CHAPS:	Ρυθμιστικό διάλυμα CHAPS 3[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-propanesulfonic acid
CICR:	Ασβέστιο που προκαλείται από απελευθέρωση ασβεστίου (Calcium-induced calcium release)
Cyt C:	Κυτόχρωμα C (Cytochrome C)
DiSC3(5):	3,3 Ιωδιούχος διπροπυλο-θειαδικαρβοκυανίνη (3.3 dipropylthiadicyanone iodide)
DMEM:	Θρεπτικό μέσο κυτταροκαλιέργειας ζωικών κυττάρων (Dulbecco's Medium)
DMSO:	Διμέθυλο σουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide)
DTT :	Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol)
EDTA:	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediaminetetraacetic acid)
ESR:	Μέθοδος λήψης φάσματος συντονισμού του spin των ηλεκτρονίων (Electron Spin Resonance)
Fluo-3:	Φθορισμομετρικός δείκτης ασβεστίου
H₂DCFDA:	2,7 Διοξική διχλωρό-διυδροφλουορεσκεΐνη (2,7 dichlorodihydrofluorescein diacetate)
HEPES:	Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
MeOH:	Μεθανόλη
MIME:	Μοριακή Αναγνώριση μέσω Μεμβρανικής Μηχανικής (Molecular identification through Membrane Engineering)

MTT:	Βρωμιούχο Διμεθυλ-θιαζολ-διφαινουτετραζόλιο (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NBT:	Μπλε του νιτρο-τετραζολίου (Nitro blue tetrazolium)
NGF:	Παράγοντας αύξησης νεύρων (Nerve Growth Factor)
PB:	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffer)
PBS:	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων με χλωριούχο νάτριο (Phosphate Buffer Saline)
PIPES:	Πιπεραζίνη (piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid))
SERCA:	Ca ⁺² -ATPase σαρκο/ενδοπλασματικού δικτύου (Sarco/endoplasmic reticulum Ca ⁺² -ATPase)
SOD:	Δισμουτάση του O ₂ ⁻ (Superoxide Dismutase)
TG:	Θαψιγαργίνη (Thapsigargin)
Tris:	Τρις(υδροξυμεθυλ-)αμινομεθάνιο (tris(hydroxymethyl)aminomethane)
XOD:	Οξειδάση της ξανθίνης (Xanthine Oxidase)
[Ca²⁺]_{cyt}:	Συγκέντρωση ενδοκυτταρικού ασβεστίου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεμβρανική μηχανική είναι μια γενική, καινοτόμος μεθοδολογία για την αύξηση της ευαισθησίας των κυτταρικών βιοαισθητήρων έναντι των μορίων-στόχων, ηλεκτροεισάγοντας τον ειδικό υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια. Σημείο εκκίνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη, σε προηγούμενη μελέτη, ενός ευαίσθητου αισθητήρα για την ανίχνευση σουπεροξειδίου (O_2^-) βασισμένου σε ακινητοποιημένα κύτταρα, τα οποία τροποποιήθηκαν μεμβρανικά με το ένζυμο δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD). Στην παρούσα μελέτη, τεκμηριώνεται ότι η αντίδραση του O_2^- με την SOD προκαλεί αλλαγές στο μεμβρανικό δυναμικό των μεμβρανικώς τροποποιημένων κυττάρων Vero, όπως επιβεβαιώνεται από τις ηλεκτροφυσιολογικές και φθορισμομετρικές μετρήσεις. Αυτές οι αλλαγές συσχετίστηκαν με αλλαγές της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, όπως φαίνεται μετά την εκλεκτική παρεμπόδιση του ενδοκυτταρικού μονοπατιού ασβεστίου. Επιπλέον, εφαρμόζοντας εκλεκτικούς παρεμποδιστές, αποδεικνύεται ότι τα ηλεκτροεισαχθέντα μόρια της SOD διατηρούν τις καταλυτικές τους ιδιότητες. Ερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της ηλεκτροεισαχθείσας SOD. Τέλος, αυξήθηκε η ευαισθησία του αισθητήρα κατά 100 φορές, με όριο ανίχνευσης 1 pM O_2^- , σαν συνέπεια της μεταβολής της συγκέντρωσης των ακινητοποιημένων κυττάρων στον αισθητήρα.

Μελετήθηκε η πιθανή σχέση ανάμεσα στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS) και της κυτταρικής διαίρεσης κατά την *in vitro* επταήμερη καλλιέργεια του υδρόβιου φυτού *Spirodela polyrrhiza*. Πιο συγκεκριμένα, καταγράφηκε η συγκέντρωση του σουπεροξειδίου χρησιμοποιώντας τον εξελιγμένο βιοαισθητήρα. Μια σημαντική μείωση των ROS αλλά και της συγκέντρωσης του O_2^- , παρατηρήθηκε κατά τις δύο πρώτες ημέρες της καλλιέργειας, ενώ η *S. polyrrhiza* βρίσκονταν κοντά στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Επιπλέον, αποπτωτικοί δείκτες όπως είναι η συγκέντρωση του κυτοπλασματικού κυτοχρώματος C, η αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και η δραστικότητα της κασπάσης-3 φθίνουν κατά τη περίοδο καλλιέργειας τουλάχιστον πριν την ωρίμανση των φυλλιδίων. Θεωρείται

ότι η διαίρεση των φυλλιδίων του *S. polyrrhiza* μπορεί να δραστηριοποιήθηκε από παρατηρούμενη μείωση των ελευθέρων ριζικών και τη σχετική αποφυγή των κυτταρικών αποπτωτικών μονοπατιών των καλλιεργούμενων φυτών.

Επίσης οι ROS έχει φανεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση. Στην παρούσα μελέτη, τα κύτταρα νευροβλαστώματος διαφοροποιήθηκαν με φορσκολίνη και κυκλική μονοφωσφορική διβουτυρυλαδενοσίνη (db-cAMP) . Η διαφοροποίηση εκφράστηκε σαν ανάπτυξη των νευριτών χρησιμοποιώντας τη χρωστική coomassie brilliant blue μετά από 48 ώρες επώασης των ουσιών διαφοροποίησης. Η διαφοροποίηση συνοδεύτηκε με αύξηση των ROS και του μιτοχονδριακού O_2^- , και τα δύο ανιχνεύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Παράλληλα έγινε καταγραφή της συγκέντρωσης O_2^- με τον βιοαισθητήρα για την αξιολόγηση του συγκρίνοντάς τον με μια κλασική μέθοδο όπως είναι η κυτταρομετρία ροής. Όπως παρατηρήθηκε, υπήρξε μεγάλη συσχέτιση των αποτελεσμάτων.

Επιπροσθέτως, ο βιοαισθητήρας δοκιμάστηκε στην κλινική ιατρική, με σκοπό την καταγραφή των επιπέδων O_2^- σε ασθενείς σε μεταχειριστική κατάσταση. Έχει συχνά προταθεί ότι το οξειδωτικό στρες είναι πιθανός εμπλεκόμενος παράγοντας του μετεγχειριστικού στρες. Τα αποτελέσματα, αν και πρώιμα, λόγω του μικρού ακόμα μεγέθους δείγματος, κατέδειξαν ότι τα επίπεδα του O_2^- ήταν πιο αυξημένα στους ασθενείς με δυσμενή μετεγχειριστική εξέλιξη.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα των ανεξαρτήτων επιμέρους πειραματικών ενοτήτων της παρούσας διατριβής (1) αποσαφήνισαν τις βαθύτερες πτυχές του μηχανισμού λειτουργίας της μοριακής αναγνώρισης μέσω μεμβρανικής μηχανικής και (2) επιβεβαίωσαν την αποτελεσματικότητα και τις σημαντικές προοπτικές εφαρμογής του βιοαισθητήρα σουπεροξειδίου που αναπτύχθηκε με βάση τη συγκεκριμένη τεχνολογία.

SUMMARY

Membrane-engineering is a generic novel methodology for increasing the selectivity of a cell biosensor against a target molecule, by electroinserting target-specific receptor molecules on the cell surface. The starting point of the present dissertation is the previously reported construction of an ultra-sensitive superoxide anion (O_2^-) sensor based on immobilized cells, which have been membrane-engineered with superoxide dismutase (SOD). In the present study, evidence is provided that superoxide dismutation triggered changes to the membrane potential of membrane-engineered fibroblast cells, as confirmed by electrophysiological and fluorescence assays. These changes were associated with changes in $[Ca^{2+}]_{cyt}$, as revealed by the selective inhibition of intracellular calcium ion traffic. In addition, by conducting selective inhibition assays, it is demonstrated that electroinserted SOD molecules retained their characteristic catalytic properties. The effect of the concentration of electroinserted SOD molecules on the performance of the superoxide assay was also investigated. Finally, the sensitivity of the sensor was increased by hundredfold to a detection limit of 1 pM O_2^- by changing the concentration of immobilized cells on the performance of the biosensor.

The next step was the investigation of a possible relationship between the levels of reactive oxygen species (ROS) and the stimulation of frond division of the aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (duckweed) during a 7-day experimental culture period. In particular, superoxide concentration was monitored using a state-of-the-art cell biosensor. A considerable reduction in ROS and superoxide concentration was observed during the first two days of culture, whereas duckweed cultures achieved near exponential growth rates after the second day. In addition, apoptotic markers such as the cytoplasmic concentration of cytochrome C, mitochondrial membrane depolarization and the activity of caspase-3 declined during the culture period and at least before daughter frond maturation. It is suggested that *S. polyrrhiza* frond division may have been stimulated by the observed reduction of free radicals and the associated avoidance of cell apoptotic pathways in cultured plants.

Also ROS have been shown to have an important role in cell differentiation. In the present study, N2a murine neuroblastoma cells were differentiated by treatments with forskolin or dibutyryl cyclic AMP. The differentiation was expressed as the development of neurites, observed using coomassie brilliant blue after 48h treatment. This was accompanied by an increase in the concentration of ROS and specifically mitochondrial superoxide, both detected by flow cytometry. At the same time the superoxide concentration was monitored using the novel biosensor, whereas a high correlation between the two different methods of superoxide detection (flow cytometry-biosensor) was observed.

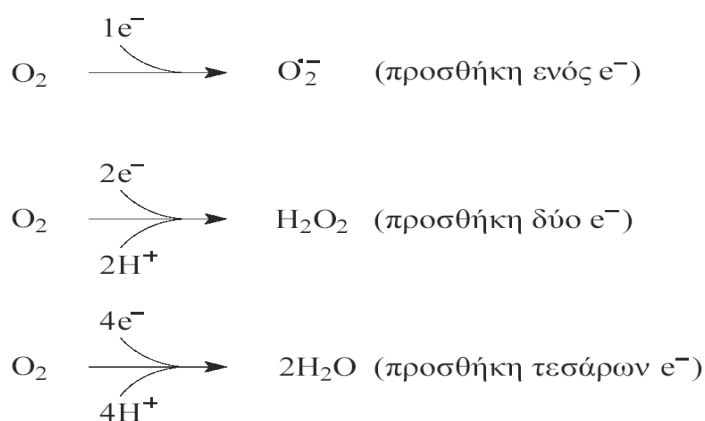
In an additional approach, the biosensor was applied to yet another complex biological system, i.e. in clinical medicine as a diagnostic method to patients in order to detect their post-operative status. It has been frequently suggested that oxidative stress is involved in post-operative stress. The results, though preliminary, due the small patient sample size, showed that the levels of O_2^- in patients with worst recovery rate were highest.

In conclusion, the results of the individual partial experimental sections of the present study (1) elucidated the deepest aspects of the working principle of the molecular identification through membrane engineering and (2) confirmed the efficiency and considerable application perspectives of the superoxide biosensor based on this technology.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS)

Ο ρόλος του μοριακού οξυγόνου ως τελικού αποδέκτη των ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων της αναπνευστικής λειτουργίας των αερόβιων οργανισμών, είναι συνυφασμένος με τον αναπόφευκτο σχηματισμό τοξικών ανηγμένων ενδιάμεσων μορφών οξυγόνου (ενεργές μορφές οξυγόνου, reactive oxygen species, ROS). Η αναγωγή του οξυγόνου προς νερό αποτελεί μία διαδικασία κατά την οποία το οξυγόνο δέχεται διαδοχικά τέσσερα ηλεκτρόνια και τέσσερα πρωτόνια. Στην περίπτωση όμως κατά την οποία το μοριακό οξυγόνο δέχεται μόνο ένα, δύο ή τρία ηλεκτρόνια, η αναγωγή είναι ατελής και σχηματίζονται ROS (Εικόνα 1).



Εικόνα 1 : Αντιπροσωπευτικές αντιδράσεις σχηματισμού ορισμένων ROS μέσω της ατελούς αναγωγής του μοριακού οξυγόνου. Η πλήρης αναγωγή με πρόσληψη τεσσάρων ηλεκτρονίων και πρωτονίων καταλήγει στο σχηματισμό του μορίου του νερού. Η διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό νέων δραστήριων ROS.

Υπολογίζεται ότι κατά την ομαλή λειτουργία του μεταβολισμού, ένα ποσοστό 1-5% του ολικού οξυγόνου το οποίο παίρνει μέρος σε βιοχημικές αντιδράσεις, παρεκκλίνει της ομαλής πορείας και μετατρέπεται σε ενδιάμεσες μορφές ROS. Στις μορφές αυτές (ή χημικά είδη) περιλαμβάνονται ιόντα, ελεύθερες ρίζες και μόρια μέσω των οποίων μπορούν να παραχθούν περισσότερο δραστήριες μορφές, όπως

ορισμένες ρίζες. Ως ελεύθερες ρίζες θεωρούνται τα χημικά είδη με ανεξάρτητη υπόσταση, τα οποία περιέχουν περιττό αριθμό ηλεκτρονίων σθένους και επομένως διαθέτουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε κάποιο τροχιακό. Οι ελεύθερες ρίζες προκύπτουν από την *ομολυτική διάσπαση* ομοιοπολικών δεσμών, όταν δηλαδή η διάσπαση είναι συμμετρική και κάθε τμήμα του μορίου που προκύπτει παίρνει από ένα ηλεκτρόνιο. Αντίθετα, κατά την *ετερολυτική διάσπαση* δεσμών το μόριο διασπάται μη συμμετρικά, με αποτέλεσμα και τα δύο δεσμικά ηλεκτρόνια να παραμένουν στο ίδιο τμήμα, οπότε στην περίπτωση αυτή προκύπτουν ιόντα. Κατά την ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού στο μόριο του νερού παράγονται μία ελεύθερη ρίζα υδρογόνου (H^\bullet) και μία ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου (OH^\bullet). Αντίθετα, κατά την ετερολυτική διάσπαση του ίδιου μορίου προκύπτουν κατιόν υδρογόνου (H^+) και ανιόν υδροξυλίου (OH^-). Επίσης κατά την ομολυτική διάσπαση του H_2O_2 παράγονται δύο ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (OH^\bullet), ενώ κατά την ετερολυτική δύο πρωτόνια (H^+ και ένα ανιόν υπεροξειδίου (O_2^{-2}) (Καραμπουρνιώτης 2003).

Μεταβολικές παρενέργειες ενεργών μορφών οξυγόνου

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, και ιδιαίτερα η ρίζα υδροξυλίου, είναι βραχύβιες και εξαιρετικά δραστικές και προκαλούν αλλοιώσεις στη δομή λιπιδίων, νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών. Τους πλέον ευαίσθητους στόχους αποτελούν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και οι σουλφυδρυλικές ομάδες των πρωτεϊνών. Ο σχηματισμός οξειδωμένων μορφών λιπιδίων παρουσία των ROS προκαλεί μια σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων που έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών. Από την άλλη πλευρά, η οξείδωση των σουλφυδρυλομάδων των ενζύμων έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίησή τους ή την παρεμπόδιση της δραστηριότητάς τους. Εκτός αυτών η ανεξέλεγκτη δράση των ROS επιφέρει το σχηματισμό ενδιάμεσων τοξικών προϊόντων τα οποία διαταράσσουν την ομαλή λειτουργία ή προκαλούν αλλοιώσεις στα μόρια των νουκλεϊκών οξέων (Scandalios 2005).

Σύμφωνα με τα παραπάνω οι ROS αποτελούν και έναν μεταλλαξιογόνο παράγοντα. Θα πρέπει να τονιστεί ότι ο σχηματισμός ROS δεν συνιστά έναν *a priori*

παράγοντα καταπόνησης των κυττάρων. Ορισμένες ROS, όπως το υπεροξειδίο και η ρίζα υπεροξειδίου θεωρούνται απαραίτητες για την ολοκλήρωση της λιγνινοποίησης, ενώ παίζουν και το ρόλο ενδιάμεσου σήματος για την ενεργοποίηση των μηχανισμών της επαγόμενης άμυνας έναντι παθογόνων. Εκτός αυτού υπάρχει η ενδιαφέρουσα άποψη ότι η μεταλλαξιγόνο δράση την οποία έχουν οι ROS, κάτω από ορισμένες συνθήκες, μπορεί να δρα ως ένας βασικός κινητήριος εξελικτικός μηχανισμός μέσω του οποίου προωθείται η επιλογή των ειδών (Kintzios et al. 2003).

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου σχηματίζονται (Πίνακας 1) :

α. Σε μια σειρά οξειδοαναγωγικές ενζυμικές αντιδράσεις, όπως π.χ. κατά τη λειτουργία της φωτοαναπνοής (στο στάδιο μετατροπής του γλυκολικού οξέος προς γλυοξυλικό), κατά την αποδόμηση των πουρινών από την οξειδάση της ξανθίνης, και κατά την απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων από το NAD(P)H στο οξυγόνο μέσω του ένζυμου οξειδάση του NAD(P)H.

β. Σε αντιδράσεις κατά τις οποίες το μοριακό οξυγόνο ανάγεται ατελώς. Για παράδειγμα, η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου από τη φερρεδοξίνη στην αναγωγική πλευρά του φωτοσυστήματος I έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπεροξειδικής ρίζας. Η αντίδραση αυτή παρατηρείται σε όλους τους χλωροπλάστες σε συνθήκες άπλετου φωτισμού, ωστόσο η ταχύτητά της αυξάνεται σε συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας NADP⁺, όπως σε χαμηλά επίπεδα CO₂.

γ. Κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω των ενδιάμεσων φορέων στην αναπνευστική και φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων και των χλωροπλάστων αντίστοιχα. Ειδικά στους χλωροπλάστες ο σχηματισμός ROS ευνοείται και από τη δημιουργία μικροπεριβάλλοντος πλούσιου σε οξυγόνο στις θέσεις φωτόλυσης του νερού στο φωτοσύστημα II. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι οι χλωροπλάστες είναι πλούσιοι σε χρωστικές και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (κυρίως λινολεϊκό και λινολενικό), καθιστά τα οργανίδια αυτά εξαιρετικά ευαίσθητους στόχους οξειδωτικών ζημιών.

δ. Εκτός αυτών, το ενεργειακό περιεχόμενο των φωτονίων της υπεριώδους περιοχής του φάσματος επαρκεί ώστε να προκαλέσει τη φωτοχημική ομολυτική διάσπαση του H₂O₂ προς δύο ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου ή να διεγείρει το μόριο του οξυγόνου (Καραμπουρνιώτης 2003).

Είδος ενεργού μορφής οξυγόνου	Συμβολισμός	Κύριες αιτίες σχηματισμού
Οξυγόνο στην πρώτη κατάσταση διέγερσης απλότητας (Singlet oxygen)	$^1\text{O}_2$	UV ακτινοβολία, φωτοπαρεμπόδιση, μεταφορά ηλεκτρονίων στην πλευρά του φωτοσυστήματος II
Ρίζα υπεροξειδίου	O_2^-	Λειτουργία αναπνευστικής αλυσίδας ροής ηλεκτρονίων, αναγωγή μοριακού οξυγόνου κατά τη λειτουργία του φωτοσυστήματος I, λειτουργία φωτοαναπνοής, εφαρμογή ζιζανιοκτόνων, άμυνα έναντι παθογόνων. σχηματίζεται επίσης από την αντίδραση του O_3 με OH^\bullet στους αποπλασματικούς χώρους.
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	H_2O_2	Φωτοαναπνοή, εξουδετέρωση υπεροξειδικού ανιόντος, άμυνα έναντι παθογόνων, τραυματισμοί
Ρίζα υδροξυλίου	OH^\bullet	Διάσπαση O_3 στους αποπλασματικούς χώρους, άμυνα έναντι παθογόνων, αντίδραση Fenton
Ρίζα υπερευδροξυλίου	$\text{O}_2\text{H}^\bullet$	Προϊόν της αντίδρασης του O_3 με OH^\bullet στους αποπλασματικούς χώρους

Πίνακας 1: Αιτίες σχηματισμού των σημαντικότερων ενεργών μορφών οξυγόνου στα φυτικά κύτταρα. (Καραμπουρνιώτης 2003)

Εξουδετέρωση των ROS από βιοχημικούς και μη μηχανισμούς

Τα κύτταρα διαθέτουν, για την άμυνά τους έναντι των ROS, αντιοξειδωτικό σύστημα που περιλαμβάνει **αντιοξειδωτικά ένζυμα** και **αντιοξειδωτικές ουσίες**.

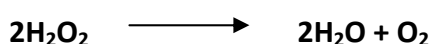
Τα σημαντικότερα **αντιοξειδωτικά ένζυμα** είναι:

- **Δισμουτάση του $O_2^{\bullet -}$ (SOD) (EC 1.15.1.1)** : Ένζυμο κλειδί του αντιοξειδωτικού μηχανισμού έναντι του σχηματισμού των ROS. Καταλύει την μετατροπή των $O_2^{\bullet -}$ σε H_2O_2 και μοριακό οξυγόνο, σύμφωνα με την αντίδραση:



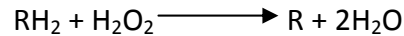
Η SOD εμφανίζεται σε δυο μορφές στο ζωϊκό ευκαρυωτικό κύτταρο, την **κυτταροπλασματική** και τη **μιτοχονδριακή**. Το κυτταροπλασματικό ένζυμο αποτελείται από δυο όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες καθεμία από τις οποίες έχει μοριακή μάζα 31 KDa. Κάθε ενζυμική υπομονάδα φέρει από ένα άτομο ψευδαργύρου και χαλκού, τα οποία συμμετέχουν στην κατάλυση. Το μιτοχονδριακό ένζυμο έχει μοριακή μάζα 75 KDa και φέρει δύο άτομα μαγγανίου. Παρόμοια, στα φωτοσυνθετικά κύτταρα το ένζυμο απαντάται σε τρεις μορφές ανάλογα με το μεταλλικό παράγοντα που περιέχει: Cu/ZnSOD που εντοπίζεται κυρίως στο στρώμα των χλωροπλαστών και στο κυτταρόπλασμα, MnSOD στα μιτοχόνδρια και FeSOD στο στρώμα των χλωροπλαστών σε ορισμένα είδη (Parker et al. 1987; Grace 1990).

- **Καταλάση (Cat) (EC 1.11.1.6)** : Το ένζυμο αυτό εξουδετερώνει το H_2O_2 , το τοξικό προϊόν της αντίδρασης της SOD, σε νερό και μοριακό οξυγόνο σύμφωνα με την αντίδραση:



Η καταλάση βρίσκεται στα υπεροξυσώματα και τα γλυοξυσώματα σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες καθεμία από τις οποίες έχει μοριακή μάζα 60-65 KDa (Kiselev et al. 1967). Η καταλάση διασπά το H_2O_2 πάρα πολύ γρήγορα και σε αντίθεση με τις υπεροξειδάσες

(POXs), που χρειάζονται ένα δότη ηλεκτρονίων (π.χ. ασκορβικό οξύ), δεν κάνει κατανάλωση αντίστοιχων ουσιών. Συνεπώς, η καταλάση εξοικονομεί σημαντική ενέργεια για το κύτταρο (Scandalios 2005). Βέβαια, σε χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 (<1 μM) η καταλάση λειτουργεί σαν POX χρησιμοποιώντας ένα δότη ηλεκτρονίων (π.χ. αιθανόλη, ασκορβικό οξύ) που μπορεί να οξειδωθεί σύμφωνα με την αντίδραση:



Εκτός από την SOD και την Cat υπάρχουν ακόμη τα εξής αντιοξειδωτικά ένζυμα: η υπεροξειδάση ασκορβικού (APX), η υπεροξειδάση γλουταθείου (GPX), η ρεδοκτάση δεϋδροασκορβικού (RDHA), η ρεδοκτάση γλουταθείου (GR), η τρανσφεράση γλουταθείου (GST) κ.α, τα οποία συμμετέχουν και αυτά στον έλεγχο της συγκέντρωσης των ROS (Song et al. 1995; Potters et al. 2002; Rouhier and Jacquot 2005).

Οι σημαντικότερες **αντιοξειδωτικές ουσίες** οι οποίες παίρνουν μέρος στην εξουδετέρωση των ROS είναι το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η ανηγμένη μορφή του γλουταθείου (GSH), η α -τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και τα καροτενοειδή (Potters et al. 2002; Ricciarelli et al. 2002; Welsch et al. 2003; Scandalios 2005). Ανάλογο ρόλο παίζουν σε ορισμένες περιπτώσεις οι πολυαμίνες, τα φλαβονοειδή και ορισμένοι συμβατοί οσμολύτες. Οι συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών ουσιών εμφανίζονται υψηλότερες σε φωτοσυνθετικά κύτταρα και μεριστωματικούς ιστούς. Στα φωτοσυνθετικά κύτταρα οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών ουσιών παρατηρούνται στους χλωροπλάστες.

Στα πλαστίδια ο κύκλος ασκορβικού-γλουταθείου αποτελεί τη σημαντικότερη βιοχημική οδό εξουδετέρωσης των ROS. Ο κύκλος αυτός λειτουργεί σε συνεργασία με τον κύκλο των ξανθοφυλλών με στόχο την προστασία των φωτοσυστημάτων από την υπερβολική παροχή ενέργειας (Potters et al. 2002).

ROS και κυτταρική διαίρεση

Είναι γνωστό ότι διάφορες μεταβολικές διαταραχές, οι οποίες συχνά συνοδεύονται με την εκδήλωση ασθένειας, συσχετίζονται με την παρουσία διαφόρων ελευθέρων ριζών. Διάφορα είδη καταπονήσεων μπορούν συχνά να προκαλέσουν φθορές των κυττάρων έτσι ώστε αυτά να οδηγηθούν στο θάνατο. Το φαινόμενο του κυτταρικού θανάτου έχει αναλυθεί σε βάθος κυρίως όσον αφορά κύτταρα και ιστούς καλλιεργούμενους *in vitro*. Διακρίνουμε τρεις διεργασίες εκφύλισης του κυτταρικού μηχανισμού, οι οποίες συνήθως συνδέονται στενά με τη δράση (θετική ή αρνητική) ελευθέρων ριζών παραγόμενων εξωκυτταρικά ή ενδοκυτταρικά. Οι διεργασίες αυτές είναι η γήρανση, η απόπτωση (ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) και η νέκρωση (Bowen and Lockshin 1981).

Πειράματα σχετικά με διάφορα ζωικά καρκινικά κύτταρα κατέδειξαν ότι η απόπτωση συνδέεται άμεσα με την επαγωγή γόνων οι οποίοι τροποποιούν την αναγωγική ισορροπία του κυττάρου και επομένως την παραγωγή ελευθέρων ριζών, ιδιαίτερα όταν αυτές προκαλούν βλάβες σε μιτοχονδριακά ένζυμα (Polyak et al. 1997). Χαρακτηριστική σε αυτή την περίπτωση είναι η δράση του γόνου p53 ο οποίος υπό φυσιολογικές συνθήκες παρεμποδίζει την εξέλιξη των καρκινικών κυττάρων. Ορισμένοι ερευνητές, όπως ο Burdon (1993, 1995) και οι Pennell και Lamb (1997), παρατήρησαν ότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν ένα είδος «μορίων – σημάτων» μεταξύ κυττάρων (τουλάχιστον μεταξύ κυττάρων καλλιεργούμενων *in vitro*). Οι Yang et al. (1996) έδειξαν επίσης ότι η ανάπτυξη ανθρώπινων λεμφοβλαστικών λευκαϊμικών κυττάρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό, ενώ οι Li et al. (1997) ανέφεραν τις μιτωτικές ιδιότητες του O[•] σε κύτταρα λείων μυών. Οι Xin et al. (2003), έδειξαν ότι η ανεπάρκεια του μιτοχονδριακού συμπλέγματος IV σε γηρασμένα ενδοθηλιακά κύτταρα συνδεόταν με αυξημένη οξειδωτική καταπόνηση αυτών. Σε φυτικούς οργανισμούς αποπτωτικά φαινόμενα έχουν παρατηρηθεί μετά την προσβολή από παθογόνα όπως ιοί (Mittler and Lam 1997) ή καταπόνηση από χαμηλές θερμοκρασίες (Koukalova et al. 1997), πάντα υπό την αυξημένη επίδραση ελευθέρων ριζών (Godiard et al. 1994). Γόνιοι – επαγωγοί της απόπτωσης έχουν

εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη, όπως στο *Arabidopsis thaliana*, οι οποίοι εμφανίζουν υψηλό βαθμό ομολογίας με ζωικά γονίδια με παρόμοια λειτουργία (Gallois et al. 1997).

Βιοαισθητήρας για τη μέτρηση σουπεροξειδίου (O_2^-)

Το O_2^- , που είναι μια από τις πιο δραστικές ενεργές μορφές του οξυγόνου, εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες, όπως στην καρκινογένεση, στη γήρανση, στον κυτταρικό θάνατο, στις φλεγμονές και στην καταστροφή του DNA (Scandalios 2005). Μεταξύ των ενεργών μορφών οξυγόνου, το O_2^- έχει προσελκύσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον και η παρακολούθησή του έχει μεγάλη σημασία για το καρδιαγγειακό σύστημα αλλά και για άλλα συστήματα. Η μέτρηση επομένως της συγκεντρώσεως του στα βιολογικά συστήματα αποτελεί μια πρόκληση. Το O_2^- , παράγεται ως ένα ανηγμένο προϊόν του μοριακού οξυγόνου, είτε μέσω διαδικασιών αυτοοξειδωσης ή μέσω ενζύμων, που συμμετέχουν κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού. Οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις του O_2^- είναι της τάξεως 10^{-10} M (Cadenas and Davies 2000), επομένως ένας υπερευαίσθητος ποσοτικός ανιχνευτής με εξειδίκευση σε nanomole, είναι απαραίτητος για τη μέτρησή του.

Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι μέτρησης για τον προσδιορισμό του O_2^- στα βιολογικά συστήματα, όπως η μέθοδος συντονισμού του spin των ηλεκτρονίων (ESR), η χημειοφωταύγεια, η φασματοφωτομετρία, η φθορισμομετρία, τα χρωματομετρικά ή ενζυμικά τεστ. Σχεδόν όλες αυτές οι αναλύσεις, έχουν δεχθεί κριτική για πολλούς λόγους (Barbacanne et al. 2000; Tang et al. 2002; Yao et al. 2002). Η μέθοδος ESR παρόλο που δίνει άμεση μέτρηση για το O_2^- , έχει περιορισμένη εφαρμογή λόγω της χαμηλής ευαισθησίας που παρουσιάζει, του κόστους του ESR φασματόμετρου, του ειδικού επιστημονικού προσωπικού που απαιτεί, αλλά κυρίως για τη μικρή εκλεκτικότητα που έχει όσον αφορά την παρουσία και άλλων ελευθέρων ριζών (Tarpey and Fridovich 2001). Οι περισσότερες επίσης αναλύσεις για τον προσδιορισμό του O_2^- είναι ποιοτικές και όχι ποσοτικές, επειδή το O_2^- έχει μικρό χρόνο ημιζωής και υψηλή αντιδραστικότητα. Επιπλέον, σε αυτές τις μεθόδους, συνήθως γίνεται έμμεσος προσδιορισμός του. Τα τελικά

προϊόντα των αντιδράσεων μεταξύ O_2^- και ανιχνευτών προσδιορίζονται και έτσι η επιλογή των ανιχνευτών αυτών αλλά και η δραστικότητά τους είναι πολλή σημαντική. Ακόμη, αυτές οι μέθοδοι επηρεάζονται από την περιορισμένη διαύγεια των δειγμάτων και έτσι δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε *in vivo* μετρήσεις. Θα πρέπει επίσης να τονιστεί, ότι οι αναλύσεις για τον προσδιορισμό του O_2^- , απαιτούν συλλογή δείγματος και επομένως είναι σχεδόν αδύνατον να γίνει παρακολούθηση των αλλαγών στη συγκέντρωση του O_2^- σε πραγματικό χρόνο (Endo et al. 2002).

Για να λυθούν τα προβλήματα των προηγούμενων μεθόδων αναπτύχθηκαν οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι μέτρησης. Οι πρόσφατες απόπειρες για τη μέτρηση ελεύθερων ριζών έχουν επικεντρωθεί σε αυτές ακριβώς τις ηλεκτροχημικές μεθόδους, οι οποίες δίνουν τη δυνατότητα άμεσου, σε πραγματικό χρόνο προσδιορισμού ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα, με ελάχιστο θόρυβο του δείγματος υπό έλεγχο. Σχετικά πρόσφατα μάλιστα έχει αναπτυχθεί μια σειρά από ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες για τη μέτρηση του O_2^- (McNeil and Manning 2002).

Υπάρχουν **δύο κύριοι τύποι** ηλεκτροχημικών σουπεροξειδικών αισθητήρων. Ο **πρώτος τύπος** βασίζεται στην αναγωγή του κυτοχρώματος C (cyt C) από το O_2^- (McNeil et al. 1989; Gobi and Mizutani 2001; Ge and Lisdat 2002). Η επανοξειδωση του κυτοχρώματος C στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου επάγει ένα ηλεκτρικό ρεύμα ανάλογο με τη συγκέντρωση του O_2^- . Προκειμένου να επιτευχθεί ηλεκτροχημική επικοινωνία μεταξύ της οξειδωμένης πρωτεΐνης και του ηλεκτροδίου, χρησιμοποιήθηκαν σχηματισμοί με μεταφορείς ηλεκτρονίων-mediator και χωρίς μεταφορείς ηλεκτρονίων. Ωστόσο, το cyt C είναι ένα ένζυμο μη εξειδικευμένο για το O_2^- . Τα εκχυλίσματα των ιστών περιέχουν ενώσεις όπως το ασκορβικό οξύ και το γλουταθείο, οι οποίες μπορούν να ανάγουν το cyt C, όπως και κυτταρικές ρεδοκτάσες, οι οποίες καταλύουν την αναγωγή του κυτοχρώματος C. Ακόμη, ένζυμα όπως η οξειδάση της ξανθίνης (XOD), είναι ικανά να ανάγουν κινίνες ή ενεργές χρωστικές που μπορεί να είναι παρούσες στον ιστό, με αποτέλεσμα οι ανηγμένες μορφές τους να προκαλούν άμεση αναγωγή του cyt C. Επιπλέον το ανηγμένο cyt C, μπορεί να επανοξειδωθεί από κυτοχρωμικές οξειδάσες, POXs και οξειδωτικά που περιλαμβάνουν το H_2O_2 και το $ONOO^-$ (Gobi and Mizutani 2000; Tarpey and Fridovich 2001). Πρέπει επίσης να αναφερθεί, ότι οι βιοαισθητήρες που

βασίζονται στο κυτόχρωμα C, χρησιμοποιούνται περισσότερο για ποιοτικό προσδιορισμό του O_2^- .

Ο **δεύτερος τύπος** βιοαισθητήρα, βασίζεται στην εξειδικευμένη δέσμευση του O_2^- από το ένζυμο δισμουτάση του O_2^- (SOD) (Campanella et al. 2000; Ohsaka et al. 2002; Ge et al. 2003). Η SOD όπως έχει αναφερθεί, δεσμεύει το O_2^- και δίνει O_2 και H_2O_2 με υψηλή δραστηριότητα και μεγάλη εξειδίκευση. Οι περισσότεροι από τους αισθητήρες αυτούς, βασίζονται στην ανίχνευση του H_2O_2 που παράγεται από την SOD, όπου απαιτείται εφαρμογή υψηλού δυναμικού (>0,5V συναρτήσει αναφορικού ηλεκτροδίου Ag/AgCl) για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το φυσικό συμπάροντα του ενζύμου στο ηλεκτρόδιο. Οι συνυπάρχουσες όμως ηλεκτροενεργές ουσίες και το ενδογενές H_2O_2 , έχουν περιορίσει την πρακτική εφαρμογή των βιοαισθητήρων αυτών στα βιολογικά συστήματα. Η επιλεκτικότητα του ηλεκτροδίου μπορεί να βελτιωθεί με τη χρήση μεμβράνης Teflon, (πολυτετραφθοροεθυλένιου) αλλά η ευαισθησία και το εύρος απόκρισης μειώθηκε (Song et al. 1995). Επίσης, ο βιοαισθητήρας δυο καναλιών, που είναι ικανός να ανιχνεύει ταυτόχρονα O_2^- και H_2O_2 , έχει χρησιμοποιηθεί, αλλά είναι δύσκολο να διαχωριστεί η αμπερομετρική απόκριση των δυο ανεξάρτητων ηλεκτροδίων (Lvovich and Scheeline 1997).

Η ευαισθησία του βιοαισθητήρα αυξάνεται χρησιμοποιώντας κύτταρα, ως αισθητήριο βιολογικό υλικό, εξαιτίας της υψηλής κυτταρικής βιοκαταλυτικής ενεργότητας. Έχει τεκμηριωθεί ότι η έκθεση των κυττάρων σε O_2^- , έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή στη σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης, μια διαδικασία που είναι συχνά συνυφασμένη με τις αλλαγές στην απέκκριση μεταβολικών προϊόντων, όπως πρωτονίων (Μαρινοπούλου 2005; Kintzios et al. 2006). Επίσης, οι κυτταρικές αλλαγές που συμβαίνουν από την παραγωγή του O_2^- , λόγω επαγωγικών συνθηκών στρες, μπορούν να αναλυθούν από έναν μικροφυσιομετρητή, που είναι ικανός να μετρά είτε το pH και τον εξωγενή ρυθμό οξίνισης κοντά στην επιφάνεια της μεμβράνης (Owicki and Parce 1992) ή το ηλεκτρικό δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης (Hediger et al. 2001).

Κυτταρικοί βιοαισθητήρες

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; Kintzios 2008). 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; D'Souza 2001). Ταυτόχρονα, επειδή τα ένζυμα βρίσκονται στο φυσικό τους περιβάλλον, οι αντιστοιχοί βιοαισθητήρες είναι πιθανό να έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής.

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 τη δραστηριότητά 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 (Stenger et al. 2001; Gilchrist et al. 2005). 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.

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 et al. 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.λπ.

Βιοαισθητήρες βασισμένοι σε κύτταρα θηλαστικών

Η εισαγωγή των ζωικών κυττάρων σε βιοαισθητήρες έγινε από τους Giaever and Keese (1993) οι οποίοι χρησιμοποίησαν ένα σύστημα μέτρησης ηλεκτρικής κυτταρικής εμπέδησης (ECIS) για την ανίχνευση τους αλλαγών στην κυτταρική μορφολογία. Σύμφωνα με άλλους κυτταρικούς βιοαισθητήρες, τα ζωικά κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως σε τοξικολογικές/περιβαλλοντικές αναλύσεις, ένα πεδίο εφαρμογής παρόμοιο του ελέγχου τροφίμων. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν μερικές διαφορετικές τεχνολογίες βασισμένες σε ζωικά κύτταρα που χρησιμοποιούνται στην ασφάλεια τροφίμων. Στον πίνακα 2 φαίνονται συγκεντρωτικά οι πρόσφατες εξελίξεις σε αυτόν το τομέα, οι οποίες είναι κατηγοριοποιημένες με βάση είτε την κυτταρική σειρά είτε την τεχνολογία που εφαρμόστηκε για τη μέτρηση (Kintzios 2013).

Κυτταρικό Υλικό	Τεχνολογία	Στόχος	Όριο Ανίχνευσης	Ποσοτικός Προσ/μός	Βιβλιογραφική Αναφορά
Καρδιακά Κύτταρα	Ηλεκτροφυσιολογία	Πυρεθροϊδή	Δεν έχει καθοριστεί	Όχι	(Natarajan et al. 2006)
- Vero ινοβλάστες νεφρικών κυττάρων - N2a Νευροβλάστωμα	Ηλεκτροφυσιολογία (BERA)	Οργανοφωσφορικά & Καρβαμιδικά	ppp	Ναι	(Flampouri et al. 2010) (Mavrikou et al. 2008)
-Βλεμφοκύτταρα -Red-2E9	Φωτομετρικά	Διάφορα παθογόνα τροφίμων & οι τοξίνες τους	10 ³ CFU/mL (Listeria) 10-40 ng (τοξίνη)	Ναι	(Banerjee and Bhunia 2009)
Κύτταρα ηπατώματος	Βιοφωταύγεια	Πολυαλογονωμένοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs)	fmol	Όχι	(Sanderson et al. 1996) (Murk et al. 1996)

Πίνακας 2: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα ζωικών κυττάρων που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές με βιοαισθητήρες στην ασφάλεια τροφίμων.

Αν και υπάρχουν μόνο μερικά εμπορικά βιοαισθητηριακά συστήματα βασισμένα σε ζωικά κύτταρα, αυτό έχει αναφερθεί πρόσφατα στη βιβλιογραφία, το 8% των τεχνολογιών βασίζεται σε κύτταρα από το 2000 (πηγές έρευνας: Science Direct, PubMed, Scopus). Από την άλλη μεριά, γενικά οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες φαίνονται να είναι ελκυστικοί σαν αντικείμενα προστασίας πνευματικής ιδιοκτησίας όσον αφορά την ανίχνευση φυτοφαρμάκων και άλλων χημικών υπολειμμάτων, ενώ επίσης μόνο αμελητέα δεν μπορεί να θεωρηθεί η πνευματικά κατοχυρωμένη εφαρμογή τους στη μικροβιολογία τροφίμων. Στην πραγματικότητα, όπως τεκμηριώνεται από τον πίνακα 3, οι αρχές λειτουργίας βασισμένες σε κύτταρα έχουν συνεισφέρει στην πλειονότητα των πατεντών για βιοαισθητηριακά συστήματα καταγραφής υπολειμμάτων (Kintzios 2013).

Τύπος Βιοαισθητήρα	Πεδίο Εφαρμογής	
	Φυτοφάρμακα/ Χημικά Υπολείμματα	Παθογόνα Τροφίμων
Όλοι οι τύποι	710	282
Κυτταρικοί	575	31

Πίνακας 3: Ταξινόμηση Διεθνών, Αμερικανικών και Ευρωπαϊκών πατεντών στην ασφάλεια τροφίμων (2000-2012)

Επί προσθέτως, 8% των Ευρωπαϊκών χρηματοδοτούμενων προγραμμάτων για την ασφάλεια τροφίμων από το 2000, επικεντρώθηκαν στα ζωικά κύτταρα σαν στοιχείο βιοαναγνώρισης, καθώς και το ένα τέταρτο των χρηματοδοτούμενων προγραμμάτων βασιζόνται σε κυτταρικούς βιοαισθητήρες (πηγή έρευνας: <http://cordis.europe.eu>). Ένα πρόσφατο παράδειγμα είναι το πρόγραμμα FOODSCAN (www.foodscan.net), το οποίο εμπλέκει εταιρίες από αρκετές Ευρωπαϊκές χώρες (με γενικό επιστημονικό συντονισμό από το ΓΠΑ). Το πρόγραμμα βασίζεται μόνο σε κυτταρικούς βιοαισθητήρες ζωικών κυττάρων τεχνολογίας BERA (η οποία αποτελεί και τη βασική μέθοδο πάνω στην οποία βασίστηκε η παρούσα διδακτορική διατριβή) και θα θέσει νέα πρότυπα για την εκτίμηση φυτοφαρμάκων και επικινδυνότητα τροφίμων στην Ευρώπη.

Επομένως, υπάρχει μια ξεκάθαρη και αρκετά μεγάλη τάση για τη χρησιμοποίηση ζωικών κυττάρων σαν αισθητήριο μέσο στις νέες αναλυτικές τεχνολογίες.

Λαβάνοντας υπόψη όλες τις πτυχές του θέματος, τα ζωικά κύτταρα έχουν επίσης ελκύσει την προσοχή των ειδικών στους βιοαισθητήρες όχι τουλάχιστον λόγω του γεγονότος ότι η χρήση τους παρουσιάζει μία σημαντική πρόκληση, αυτή της ελαττωμένης ζωτικότητας (τουλάχιστον όταν τα κύτταρα μετακινούνται από τις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας) και την επακόλουθη περιορισμένη δυνατότητα διατήρησης. Επίσης, αν και τα κύτταρα αποκρίνονται σε συγκεκριμένους αναλύτες με έναν φυσιολογικά συναφή τρόπο, το πρότυπο της απόκρισης δεν είναι πάντα αναπαραγωγίμο ως προς το σήμα προέλευσης. Με άλλα λόγια, το μέγεθος της απόκρισης μπορεί να κυμαίνεται στο βαθμό ότι η έλλειψη επαναληψιμότητας θα εμποδίσει την πρακτική εφαρμογή των κυτταρικών βιοαισθητήρων. Αυτό μπορεί να έχει ιδιαίτερα σημαντικές επιπτώσεις στην περίπτωση των ζωικών κυττάρων: σε σύγκριση με τα βακτηριακά κύτταρα, το μεγαλύτερο μέγεθός τους υπαγορεύει τη μειωμένη πυκνότητα αποθήκευσης τους σε ένα βιοαισθητηριακό στοιχείο (π.χ. ένα αναλώσιμο φυσίγγιο ακινητοποιημένων κυττάρων σε επαφή με μία συσκευή μέτρησης) (Kintzios 2013). Αυτό μπορεί να έχει σαν συνέπεια την αύξηση του στατιστικού σφάλματος της απόκρισης σε ένα μοναδιαίο δείγμα.

Οι Natarajan et al. (2006) ανέπτυξαν μία υψηλής απόδοσης μέθοδο για την ανίχνευση πυρεθροειδών χρησιμοποιώντας σύστημα πολλαπλών ηλεκτροδίων για

εξωκυτταρικές μετρήσεις από καρδιακά μυϊκά κύτταρα καλλιεργούμενα πάνω σε συστοιχίες μικρο-ηλεκτροδίων (MEA). Αυθόρμητη δραστηριότητα των κυττάρων παρήγαγε εξωκυτταρικός ένα δυναμικό εύρους από 100 μV μέχρι 1200 μV με συχνότητα 0.5–4 Hz. Όλα τα πυρεθροειδή που δοκιμάστηκαν: *a-cypermethrin*, *tetramethrin* και *tefluthrin*, προκάλεσαν παρόμοιες αλλαγές στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των καρδιακών μυϊκών κυττάρων, δηλαδή μειωμένη συχνότητα και ένταση παλμών.

Οι Banerjee and Bhunia (2009) χρησιμοποίησαν ακινητοποιημένα λεμφοκύτταρα Ped-2E9 για την ανίχνευση *Listeria monocytogenes*, εντεροτοξικού *Bacillus*, *Vibrio*, *Micrococcus* και *Serratia*, και τοξίνες, όπως hemolysin από *Staphylococcus aureus*, φωσφολιπάση C από *Clostridium perfringens*, cytolysin από την θαλάσσια ανεμώνη *Stoichactis helianthus*, listeriolysin από *L. monocytogenes*, και εντεροτοξίνη από *Bacillus*. Τα όρια ανίχνευσης για τις τοξίνες ήταν 10–40 ng σε 2 ώρες, ενώ για το μοντέλο του βακτηριακού παθογόνου, *L. monocytogenes*, 10^3 – 10^4 CFU/mL σε 4–6 ώρες, ακόμα και με την παρουσία μείγματος μεγαλύτερης συγκέντρωσης μη παθογόνων ειδών του ίδιου γένους ή μικροχλωρίδας με κοινό υπόβαθρο. Γραμμικότητα αναφέρθηκε στα 10^3 – 10^8 CFU/mL.

Κύτταρα ηπατώματος, τα οποία εκφράζουν φυσικά τον αρωματικό υδρογονανθρακικό υποδοχέα (AhR), μετασηματίστηκαν εισάγοντας ένα πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της διοξίνης και το γονίδιο αναφοράς luc που κωδικοποιεί την λουσιφεράση. Ο βιοαισθητήρας είχε σαν όριο ανίχνευσης τα 5×10^{-12} mol/L 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Επίσης υπήρξε απόκριση και σε άλλα χημικά μόρια παρόμοια με τη διοξίνη ακόμα και αν τα όρια ανίχνευσης ήταν υψηλότερα και σε μείγματα διαφορετικών ενώσεων. (Murk et al. 1996; Michelini et al. 2006).

Ηλεκτροφυσιολογικές μέθοδοι μέτρησης – Εφαρμογές

Ηλεκτρικά ενεργά κύτταρα ή ιστοί, μπορούν να διασυνδεθούν με μικροηλεκτρόδια 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 (Pantaja 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 ηλεκρολυτικό

διάλυμα. Με το σύστημα αυτό, όταν η άκρη της πιπέτας 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 μικρο-βιοαισθητήρες με τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων ή ISEs (Ion selective electrons) και οι βιοαισθητήρες επαγόμενου πεδίου ή FETs (Field effect transistors). Στα ISEs καταγράφεται το δυναμικό που αναπτύσσεται στην επιφάνεια μιας μεμβράνης (στερεής ή υγρής) συναρτήσει ενός συστήματος αναφοράς (ημιστοιχείο με γνωστό και σταθερό δυναμικό). Συνήθως στην επιφάνεια της μεμβράνης /διαλύματος λαμβάνει χώρα μια ισορροπία ανταλλαγής ή ιοντοανταλλαγής. 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 επιφάνειά 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 μικροβιοαισθητήρα τύπου ENFET (Enzyme field effect transistor). Η μεταβολή της συγκέντρωσης ιόντων (π.χ. πρωτονίων) στην επιφάνεια του ENFET, λόγω της ενζυμικής αντιδράσεως, επηρεάζει το αναπτυσσόμενο δυναμικό, φαινόμενο το οποίο τελικώς μετράται (Luo et al. 2004). Τέτοιες διατάξεις εμφανίζουν αξιοπιστία και ανθεκτικότητα, ταχεία απόκριση λόγω της λεπτής επιφάνειας ανιχνεύσεως (μεμβράνης) και ευκολία μαζικής παραγωγής (Κλώνης 1997).

Σε μια σειρά από δημοσιεύσεις, ο Wolf και οι συνεργάτες του αναφέρθηκαν στην ανάπτυξη μίας αυτόματης πλατφόρμας ανάλυσης υψηλής αποδοτικότητας με βιοϋβριδικούς αισθητήρες για τη καταγραφή μεταβολικών παραμέτρων ζωντανών κυττάρων (Wolf et al. 1998; Wiest et al. 2006; Lob et al. 2007; Wolf et al. 2011). Η βάση της πλατφόρμας είναι ένα τροποποιημένο πιάτο καλλιέργειας κυττάρων 24 πηγαδιών, κάθε πηγαδάκι εξοπλισμένο με οπτικοχημικούς αισθητήρες για την διαλυόμενη συγκέντρωση οξυγόνου και τη τιμή pH. Υπάρχει επίσης η επιλογή της διάταξης πλέγματος πολλαπλών ηλεκτροδίων (interdigitated electrodes structures-IDES) για την μέτρηση βιοηλεκτρικής εμπέδησης η οποία προκαλείται από προσκολλημένα κύτταρα. Οι οπτικοχημικοί αισθητήρες χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό κυτταρικής κατανάλωσης οξυγόνου και εξωκυτταρικής οξίνισης με την πάροδο του χρόνου. Οι πιο απλές προσεγγίσεις στην τεχνολογία των κυτταρικών βιοαισθητήρων χρησιμοποιούν σαν κορμό τις βιοδοκιμές (Kintzios 2013). Για παράδειγμα, πολλοί κυτταρικοί αισθητήρες για εκτίμηση τοξικότητας με απλή καταμέτρηση είτε αριθμού συνολικών κυττάρων ή αριθμού ζωντανών κυττάρων μετά την εφαρμογή ενός τοξικού παράγοντα. Άλλοι αισθητήρες μετράνε ζωτικότητα κυττάρων μέσω έμμεσων μετρήσεων της αναπνευστικής δραστηριότητας. Σε μια πρόσφατη ανασκόπηση, οι Eltzon and Marks (2011) περιγράφουν συνοπτικά τη μέτρηση της κυτταρικής κινητικότητας σαν τρόπο για τον καθορισμό της τοξικότητας περιβαλλοντικών δειγμάτων. Η κυτταρική κινητικότητα μπορεί να συσχετιστεί με αλλαγές πολλών φυσιολογικών λειτουργιών, π.χ. κυτταρική διαίρεση και ανάπτυξη, νέκρωση, νευρομεταβιβαστές (Somers et al. 2004), απόπτωση (Bortner and Cidlowski 2004), και κυτταρική διόγκωση (αλλαγή όγκου) (Grover and Woldringh 2001). Αλλαγές στην κυτταρική κινητικότητα έχουν

μελετηθεί με διάφορες μεθόδους, όπως είναι η φθορισμομετρία (Sato et al. 1996), οπτική η ηλεκτρονική μικροσκοπία (Grover and Woldringh 2001), ατομικής δύναμης (Schneider et al. 2000), ηλεκτροφυσιολογία (Marks et al. 2007) μικροσκοπία και συντονισμό μικροδακτυλίου (MR) (Wang et al. 2009). Τα περισσότερα από τα διαθέσιμα εμπορικά συστήματα βασίζονται με παρόμοιες αρχές λειτουργίας, μετρήσεις κίνησης και/ή ζωτικότητας. Μερικά από αυτά τα προϊόντα αναφέρονται στο πίνακα 4 (Kintzios 2013).

Εταιρεία	Όνομα Προϊόντος	Μετρούμενη Παράμετρος	Αρχή Λειτουργίας	Βιβλιογραφική Αναφορά
Bionas	2500 Analyzing System	- Κατανάλωση οξυγόνου - Εξωκυτταρικό pH - Αριθμός κυττάρων	- Ηλεκτρόδια τύπου Clark - Ιοντοεκλεκτικά ηλεκτρόδια μέτρησης πεδίου (Ion-sensitive field effect Transistors ISFETs) - Εμπέδηση	(Ceriotti et al. 2007) (Bohrn et al. 2011) (Kubisch et al. 2012)
- ACEA Biosciences & Roche	xCELLigence E-Plate (a version of xCELLigence) RT-CES	Αριθμός κυττάρων	Εμπέδηση	(Huang and Xing 2006) (Xi et al. 2008)
Molecular Devices	Cytosensor Microphysiometer* *Η παραγωγή της συσκευής έχει διακοπεί	Εξωκυτταρικό pH	Οπτική ποτενσιομετρία καθορισμένη από το φως (Light-addressable optical potentiometry - LAPs)	(Owicki and Parce 1992) (Poghossian et al. 2009)
Applied BioPhysics	Σύστημα Μέτρησης Ηλεκτρικής Κυτταρικής Εμπέδησης (ECIS)	- Αριθμός κυττάρων - Κυτταρική πρόσφυση	Εμπέδηση	(Wegener et al. 2000) (Curtis et al. 2009; Curtis et al. 2009)
EMBIO Diagnostics	FoodAlert	Μεμβρανικό κυτταρικό δυναμικό	Βιοηλεκτρική Μέθοδος Αναγνώρισης (BERA)	(Gramberg et al. 2012) (Mavrikou et al. 2008; Flampouri et al. 2010; Varelas et al. 2010)

Πίνακας 4: Συστήματα εμπορικών κυτταρικών βιοαισθητήρων βασισμένων σε ζωϊκά κύτταρα.

Τα συστήματα εμπέδησης απαιτούν ένα χρόνο απόκρισης εύρους ωρών (τέσσερις ή περισσότερες), το οποίο είναι πιο γρήγορο από τις παραδοσιακές βιοδοκιμές σε καλλιέργεια κυττάρων. Αυτό δεν έχει να κάνει με την ταχύτητα της φασματομετρία εμπέδησης αλλά με το χρόνο που απαιτείται για την αλληλεπίδραση του τοξικού παράγοντα με το κυτταρικό σύστημα έτσι ώστε να δώσουν μετρήσιμα αποτελέσματα. Αυτός είναι ένας από τους λόγους που οι κατασκευαστές δίνουν έμφαση ότι τα προϊόντα τους είναι σχεδιασμένα για ερευνητική χρήση μόνο και όχι για διαγνωστική εφαρμογή. Ευτυχώς, έχουν αναφερθεί βελτιώσεις προς αυτή την κατεύθυνση.

Οι Curtis *et al.* (2009) χρησιμοποίησαν ένα βιοαισθητήρα εμπέδησης προκειμένου να αξιολογήσουν την απόκριση δέκα ζωικών κυτταρικών σειρών (οι περισσότερες από αυτές, όπως Vero, Caco2 και Hep-G2 χρησιμοποιούνται συνήθως στις κυτταρικές βιοδοκιμές) έναντι του καρβαμιδικού φυτοφαρμάκου aldicarb και του γενικού απολυμαντικού πενταχλωροφαινικού νατρίου. Τα δεδομένα συλλέγονταν επί μία ώρα και αξιολογήθηκαν μέσα σε 15 λεπτά. Με αυτόν τον τρόπο η διάρκεια της δοκιμής μειώθηκε δραστικά. Επίσης, οι διαφορετικές κυτταρικές σειρές συγκρίθηκαν για άλλες ιδιότητες, όπως η ικανότητα να κάνουν σταθερή μονοστοιβάδα, η υψηλή τους εμπέδηση (> 1000 Ω) και ευκολία προσκόλλησης. Τέσσερις κυτταρικές σειρές σχημάτισαν σταθερές μονοστοιβάδες πάνω στα ECIS ηλεκτρόδια, και επιλέχθηκαν για πειράματα σάρωσης. Η ευαισθησία τους στο aldicarb και το sodium pentachlorophenate ποίκιλε σημαντικά, με τις σειρές Vero και HUVEC να δείχνουν μια μεγαλύτερη ευαισθησία στην χαμηλότερη αποτελεσματική συγκέντρωση λίγο πάνω από 1 mM και 0,38 mM αντιστοίχως για τους δύο τοξικούς παράγοντες. Οι άλλες δύο κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν επίσης για σάρωση άλλων φυτοφαρμάκων όπως το metamidophos και paraquat. Οι κυτταρικές μονοστοιβάδες μπορούν να αποθηκευτούν για 37 ημέρες στα ECIS συστοιχίες ηλεκτροδίων με ελάχιστη αλλαγή της εμπέδησης. Επομένως, δείχτηκε μια ικανοποιητική δυνατότητα διατήρησης (για έναν κυτταρικό αισθητήρα βασισμένο σε κύτταρα θηλαστικών), η οποία μπορεί να βελτιωθεί χρησιμοποιώντας ένα ενσωματωμένο σύστημα ροής σε μικροκανάλια.

Πολύ πρόσφατα, οι Brennan *et al.* (2012) κατάφεραν να βελτιώσουν τόσο την ταχύτητα της δοκιμής όσο και την δυνατότητα διατήρησης του κυτταρικού

στιχείου βιοαναγνώρισης χρησιμοποιώντας επιθηλιακά κύτταρα από βράγχια πέστροφας (RTgill-W1) σε συνδυασμό με ECIS. Πρέπει να αναφερθεί ότι τα κύτταρα RTgill-W1 είναι ποικιλοθερμικά και όχι ζωικής προέλευσης, άρα η ικανότητά τους να διατηρούνται ζωντανά χωρίς ανανέωση υλικού 6°C για 78 εβδομάδες.

Η δυσκολία της διατήρησης της κυτταρικής ζωτικότητας και αποστειρωμένων συνθηκών χωρίς μία επιτόπια εγκατάσταση καλλιέργειας κυττάρων είναι ο κύριος περιορισμός στη χρήση των κυτταρικών βιοαισθητήρων με ζωικά κύτταρα σε δοκιμές στον αγρό.

Ένας άλλος κυτταρικός βιοαισθητήρας χρησιμοποιεί την ανασυνδεμένη φθορίζουσα κυτταρική σειρά ωοθηκών κινέζικου χάμστερ για την καταγραφή διάφορων τοξικών παραγόντων, ειδικά των EDCs, σε ποικίλα υδατικά περιβάλλοντα (Kim et al. 2002).

Θα μπορούσαμε να παρατηρήσουμε ότι οι βιοαισθητήρες εμπέδησης και τα ζωικά κύτταρα φτιάχτηκαν το ένα για το άλλο, μιας και τα ζωικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε υποστρώματα χωρίς περαιτέρω ακινητοποίηση, επιτρέποντας έτσι τη χρήση ηλεκτροδίων μέτρησης εμπέδησης (Kintzios 2013). Ωστόσο η ιδιότητα αυτή έχει και το κόστος της, καθώς έχει εκτρέψει σημαντικό μέρος της ανάπτυξης της οργανολογίας στην κατευθυνση του σχεδιασμού συσκευών εμπεδομέτρησης σε βάρος άλλων τεχνικών μέτρησης.

Την τελευταία δεκαπενταετία αναπτύχθηκε ένα σύστημα μέτρησης της μεταβολής του ηλεκτρικού δυναμικού (ή άλλων ηλεκτρικών ιδιοτήτων) (Kintzios et al. 2001) όχι ενός μεμονωμένου τμήματος της κυτταρικής μεμβράνης ή ενός μόνο κυττάρου, αλλά σε επίπεδο ιστού. Η μέθοδος **Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (BERA)** είναι μια μέθοδος ανίχνευσης ιών και άλλων βιοενεργών ουσιών, η οποία βασίζεται στη μέτρηση μεταβολών των ηλεκτρικών ιδιοτήτων ομάδας κυττάρων κατάλληλα ακινητοποιημένων εντός πήγματος, έτσι ώστε να διατηρούνται οι φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες κατά την αλληλεπίδραση με τους υπό ανίχνευση ιούς. Είναι εφικτή η ανίχνευση ανθρώπινων και φυτικών ιών με τρόπο εξειδικευμένο, γρήγορο (1-2 min), αξιοσημείωτα αναπαραγωγίμο και οικονομικό. Η ευαισθησία της ανίχνευσης με BERA (0,001-0,1ng) είναι ανάλογη με προηγούμενες ανοσολογικές, κυτταρολογικές και μοριακές τεχνικές.

Έως σήμερα έχουν αναπτυχθεί έξι γενιές κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA. Επιγραμματικά, στην 1^η γενιά ο βιοαισθητήρας περιείχε ακινητοποιημένα κύτταρα σε 0,8% αγαρόζη και είχε τη μορφή σωλήνα 15 mL (Kintzios et al. 2001). Η 2^η γενιά είχε, επίσης, τη μορφή σωλήνα και τα κύτταρα ήταν ακινητοποιημένα σε αγαρόζη, με τη διαφορά ότι είχε πολύ μικρότερο όγκο (1 mL), οπότε απαιτείτο μικρότερη ποσότητα υλικών (Kintzios et al. 2004). Η 3^η και 4^η γενιά κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA είχαν τη μορφή επίπεδης στοιβάδας και στη μεν 3^η γενιά τα κύτταρα ήταν ακινητοποιημένα σε «φλούδα» αλγινικού ασβεστίου, στη 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 τη μελέτη της κυτταροδιαίρεσης (Kintzios et al. 2006) και της 4^{ης} γενιάς για τη μελέτη επικοινωνίας των κυττάρων και αλληλεπίδρασης με διάφορες ουσίες. Τέλος, οι βιοαισθητήρες BERA 5^{ης} και 6^{ης} γενιάς είχαν τη μορφή σφαιριδίων, ακινητοποιημένα κύτταρα σε αλγινικό ασβέστιο (Moschoroulou and Kintzios 2006). Η διαφορά μεταξύ αυτών των δύο γενεών είναι ότι στους βιοαισθητήρες 6^{ης} γενιάς τα ακινητοποιημένα κύτταρα είναι μεμβρανικώς τροποποιημένα (MIME) χρησιμοποιώντας τη τεχνική της μεμβρανικής μηχανικής μέσω της ηλεκτροεισαγωγής μορίων στις κυτταρικές μεμβράνες, με σκοπό την εκλεκτικότητα του συστήματος. Αξίζει εδώ να αναλυθεί λίγο διεξοδικότερα η συγκεκριμένη τεχνολογία και η συνεισφορά της στην εξέλιξη των κυτταρικών αισθητήρων.

Ένα χαρακτηριστικό που κάνει τους κυτταρικούς βιοαισθητήρες ελκυστικούς σαν ένα κλινικό αναλυτικό εργαλείο είναι η ευαισθησία τους, που σε κάποιες περιπτώσεις αγγίζει το επίπεδο ενός μόνο μορίου-στόχου.. Αυτή η θεωρητική υπόθεση είναι βασισμένη στην περίπλοκη αλληλεπίδραση η οποία έχει προκύψει ως αποτέλεσμα της συνεξέλιξης των κυττάρων με διάφορα μόρια στο περιβάλλον τους, σε βαθμό που επιτρέπει στα κύτταρα να ανταποκρίνονται στα μόρια και οργανισμούς με ακριβείς και αναπαραγόμενους τρόπους. Όμως, αυτή η ικανότητα εξισορροπείται από ένα εξελικτικό «κόστος» (εν είδει συμβιβασμού) γιατί τα κύτταρα μπορούν να αντιδράσουν με τον ίδιο χονδρικά τρόπο ενάντια σε ένα εκπληκτικό μεγάλο αριθμό διαφορετικών μορίων, οπότε οι κυτταρικοί αισθητήρες παρουσιάζουν φτωχή εκλεκτικότητα. Αυτό είναι ένα πολύ κοινό πρόβλημα σε τοξικολογικές μεθόδους, όπου οι αισθητήρες επιτυχώς ανιχνεύουν την παρουσία

ενός τοξικού παράγοντα αλλά γενικά αποτυγχάνουν να καθορίσουν την ακριβή φύση του τοξικού αναλύτη (Kaiser and Palabrica 1991; vanderLelie et al. 1997; Riska et al. 1999).

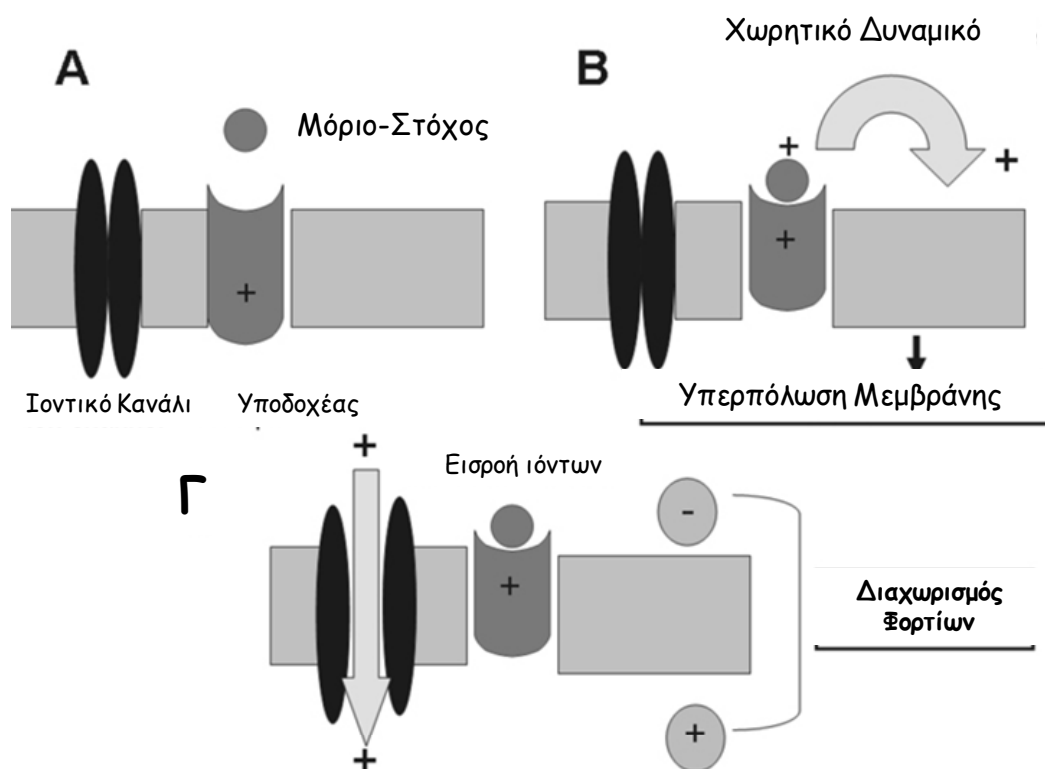
Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι κυτταρικής τροποποίησης, με σκοπό την αύξηση της εκλεκτικότητας των κυττάρων, με σχετική επιτυχία. Οι μέθοδοι κυτταρικής τροποποίησης είναι βασισμένες στην κυτταρική αναρρόφηση ξένου DNA κυρίως από Β ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και κατά συνέπεια οδηγούν στην έκφραση μεμβρανικών προσφωμένων υποδοχέων (Falsey et al. 2001; Ziauddin and Sabatini 2001; Andrews J.S. 2004; Delehanty et al. 2004). Μία γνωστή εφαρμογή είναι το σύστημα CANARY αναπτυγμένο από το εργαστήριο Lincoln Lab του MIT. Το CANARY έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του *Yersinia pestis* και άλλων παθογόνων (Rider et al. 2003). Όμως, η εφαρμογή της κυτταρικής τροποποίησης είναι περιορισμένη λόγω της έλλειψης σταθερότητας και των συχνών μη επιθυμητών αλλαγών του κυτταρικού φαινοτύπου.

Μια εναλλακτική προσέγγιση της κυτταρικής τροποποίησης είναι η τελευταίως ανεπτυγμένη τεχνολογικά μέθοδος της μεμβρανικής μηχανικής (Kintzios 2008). Είναι μια γενική μεθοδολογία τεχνικώς εισαγόμενων δεκάδων χιλιάδων υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια έτσι ώστε το κύτταρο να μπορεί να αποκριθεί εκλεκτικά στον αναλύτη μετά την αλληλεπίδραση υποδοχέα-αναλύτη. Τα μόρια του υποδοχέα μπορούν να ποικίλουν από αντισώματα ως ένζυμα και πολυσακχαρίτες. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι η σύνδεση του μορίου-στόχου με τον αντίστοιχο υποδοχέα του, η οποία προκαλεί αλλαγή στην κυτταρική μεμβρανική δομή και μπορεί να μετρηθεί με την αλλαγή του μεμβρανικού δυναμικού.

Αυτή η διαδικασία παρουσιάζεται στην εικόνα 2, παρουσιάζοντας μια περιοχή της μεμβρανικώς τροποποιημένης μεμβράνης. Στην αρχή, η κυτταρική μεμβράνη έχει ένα σταθερό δυναμικό λόγω της ροής ιόντων μέσω των παρακείμενων ιοντικών καναλιών στον τεχνικώς εισαχθέντα υποδοχέα (A). Μετά την ειδική σύνδεση του αναλύτη, ο υποδοχέας αναδιαμορφώνεται δομικά, έτσι μέρος του φορτίου του μεταφέρεται εντός της κυτταρικής μεμβράνης (B). Με αυτόν τον τρόπο, ιόντα συσσωρεύονται στη μια πλευρά της μεμβράνης (π.χ. ιόντα K^+), έτσι συμβάλλουν στο διαχωρισμό φορτίου, δημιουργώντας χωρητικό δυναμικό και την συνεπαγόμενη υπερπόλωση της μεμβράνης. Ακολούθως, το άνοιγμα των παρακείμενων ιοντικών καναλιών δημιουργεί μια ιοντική ροή η

οποία είναι μετρήσιμη σαν ρεύμα (C), οδηγώντας σε ένα νέο διαχωρισμό φορτίου κατά μήκος της μεμβράνης (στο παράδειγμα της εικόνας, μία εξωκυτταρική αύξηση αρνητικών ιόντων).

Ένας συνδυασμός BERA και τεχνολογίας μεμβρανικής μηχανικής έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ανθρώπινων ιών (Ηπατίτιδα Β), φυτικών ιών (του καπνου και του αγγουριού), μεταβολικών ασθενειών, σουπεροξειδίου, prions, του ιού αφθώδους πυρετού (foot-and-mouth disease virus -FMDV) και του ιού της γλώσσας (blue-tongue virus BTV).



Εικόνα 2: Η αρχή λειτουργίας της μοριακής αναγνώρισης μέσω της μεμβρανικής μηχανικής

Εώς σήμερα έχουν αναπτυχθεί βιοαισθητήρες 6^{ης} γενιάς για διάφορες εφαρμογές όπως είναι για ανίχνευση φυτοπαθογόνων και ζωικών ιών, φυτοφαρμάκων αλλά και μορίων που εμπλέκονται στην ασφάλεια τροφίμων (Mavrikou et al. 2008; Moschopoulou et al. 2008; Perdikaris et al. 2009; Flampouri et al. 2010; Varelas et al. 2010; Perdikaris et al. 2011).

Κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής εργασίας αναπτύχθηκε ο πρώτος βιοαισθητήρας BERA 6^{ης} γενιάς, για την μέτρηση του σουπεροξειδίου (O_2^-). Η δημιουργία του βασίστηκε σε μεμβρανικώς τροποποιημένα θηλαστικά κύτταρα, ακινητοποιημένα σε πήγμα αλγινικού ασβεστίου. Η διαδικασία της μεμβρανικής μηχανικής επιτυγχάνεται με την ηλεκτροεισαγωγή μορίων της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (SOD) στις μεμβράνες των κυττάρων Vero (ινοβλάστες). Τα ηλεκτροεισαχθέντα μόρια της SOD δρουν ως καταλυτικές μονάδες, μετατρέποντας το O_2^- σε H_2O_2 . Αυτή η μετατροπή προκαλεί αλλαγές στο μεμβρανικό δυναμικό των κυττάρων, οι οποίες ανιχνεύονται με κατάλληλα μικροηλεκτρόδια, σύμφωνα με την μέθοδο Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (BERA). Ο αισθητήρας παρουσίασε άμεση απόκριση στο O_2^- , με όριο ανίχνευσης τα 100 pM (Moschoroulou et al. 2006). Τέλος, έγινε έλεγχος της συγκέντρωσης του O_2^- , με την χρήση του βιοαισθητήρα που αναπτύξαμε, κατά την κυτταροδιαίρεση του *Arabidopsis thaliana* και έγινε συσχετισμός με βιοχημικές αναλύσεις για την μελέτη της συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών (ROS) και τις σχετικές ενεργότητες ενζύμων που εμπλέκονται στις διάφορες οξειδωτικές-αντιοξειδωτικές διαδικασίες.

B1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας είναι η βελτίωση κυτταρικού βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς για την ανίχνευση σουπεροξειδίου (O_2^-) σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (<0.1 nM) από εκείνες που ανίχνευε ο βιοαισθητήρας που αναπτύχθηκε σε προηγούμενη μελέτη (Moschoroulou and Kintzios 2006). Επίσης πέρα από την βελτίωση επιδιώχθηκε η διερεύνηση του μηχανισμού μοριακής αναγνώρισης με τη χρήση των μεμβρανικώς τροποποιημένων κυττάρων. Σε προηγούμενες μελέτες φάνηκε η εμπλοκή του ασβεστίου κατά την αλληλεπίδραση μορίου στόχου και ηλεκτροεισαγώμενου μορίου στις κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων, το αποτέλεσμα της οποίας ανίχνευε ο αισθητήρας. Έτσι διερευνήθηκε ο ρόλος του ασβεστίου παρεμποδίζοντας τις SERCA αντλίες ασβεστίου του ενδοπλασματικού δικτύου και μελετώντας τη μεταβολή του πριν και μετά την αλληλεπίδραση με το O_2^- , έτσι ώστε να εντοπιστεί αν υπάρχει εμπλοκή του ενδοπλασματικού δικτύου στην μετακίνηση ασβεστίου, καθώς και επίσης να επιβεβαιωθεί ο ρόλος του συγκεκριμένου κατιόντος στο μηχανισμό μοριακής αναγνώρισης μέσω μεταβολής του μεμβρανικού δυναμικού.

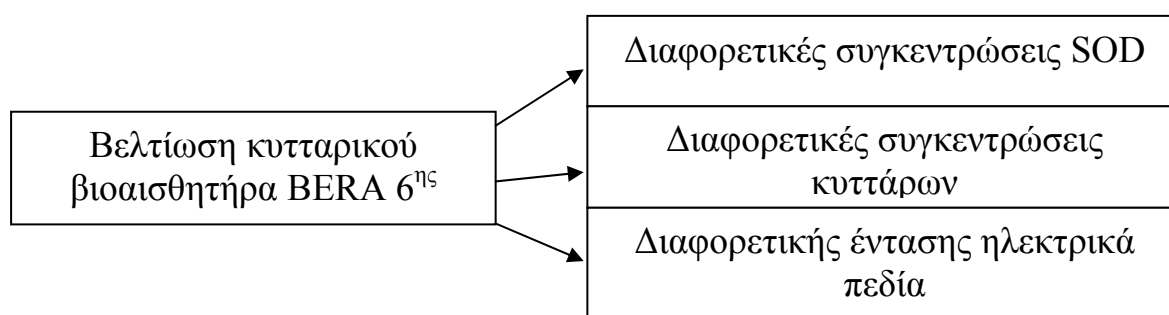
Εν συνεχεία, ο βελτιωμένος βιοαισθητήρας BERA 6^{ns} γενιάς, που αναπτύχθηκε, χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη του O_2^- κατά την διάρκεια της κυτταροδιαίρεσης του υδρόβιου φυτού *Spirodela polyrrhiza* σε συνδυασμό με διάφορες βιοχημικές αναλύσεις, προκειμένου να ερευνηθεί η πιθανή σχέση μεταξύ των επιπέδων των ελευθέρων ριζών και της κυτταρικής διαίρεσης.

Τέλος, ο βελτιωμένος βιοαισθητήρας BERA 6^{ns} γενιάς εφαρμόστηκε σε πιο πολύπλοκα συστήματα, για την ανίχνευση του O_2^- κατά την διάρκεια της *in vitro* διαφοροποίησης κυττάρων νευροβλαστώματος της κυτταρικής σειράς N2a και παράλληλα αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας μια φθορισμομετρική μέθοδο για την ανίχνευση O_2^- και ελευθέρων ριζών γενικότερα. Επιπρόσθετα έγινε και η πρώτη δοκιμή για εφαρμογή του στην κλινική ιατρική με ελπιδοφόρα αποτελέσματα.

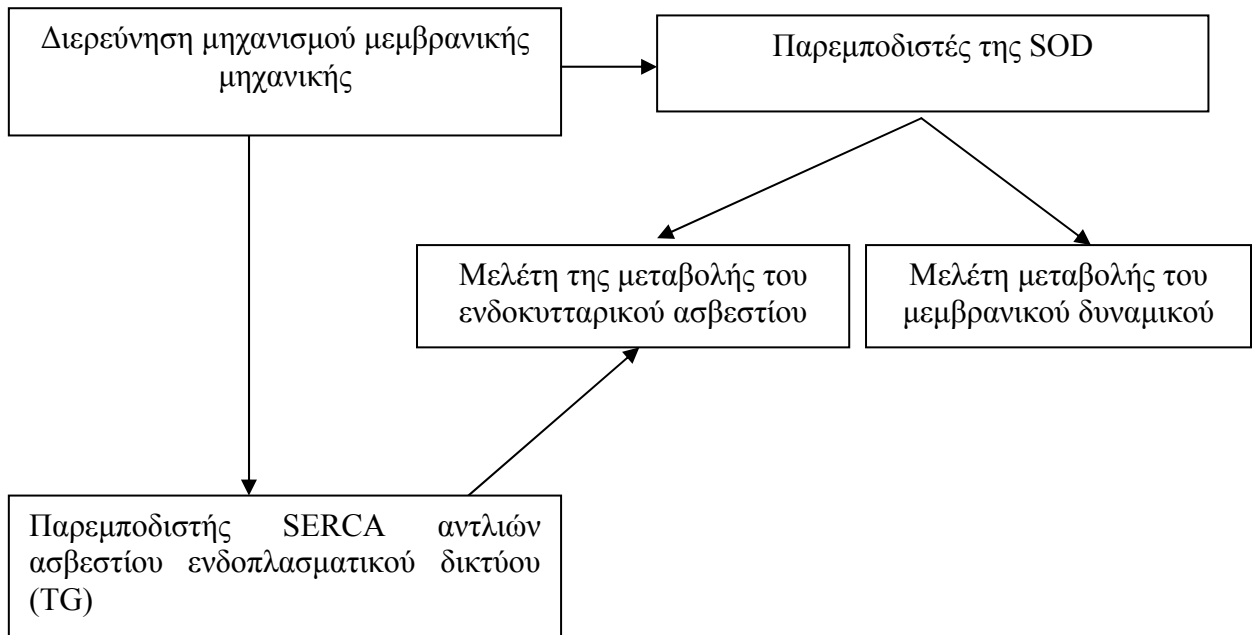
B2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Η παρούσα μελέτη αποτελείται από τέσσερις πειραματικές ενότητες. Το γενικό σχέδιο των πειραματικών ενοτήτων είναι το εξής:

- Κατά την πρώτη πειραματική ενότητα (διάγραμμα 1α) έγινε προσπάθεια βελτίωσης του κυτταρικού βιοαισθητήρα BERA 6^{ης} γενιάς (μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα) για μέτρηση O_2^- , με την ηλεκτροεισαγωγή διαφορετικών συγκεντρώσεων ενζυμικών μονάδων SOD στις μεμβράνες των κυττάρων, διαφορετικών συγκεντρώσεων ακινητοποιημένων κυττάρων ανά αισθητήρα, εφαρμόζοντας διαφορετικές εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου και αναλύοντας μικρότερες συγκεντρώσεις O_2^- (εώς 1 pM). Επίσης σε αυτή τη πειραματική ενότητα (διάγραμμα 1β) έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί ο μηχανισμός της μεμβρανικής μηχανικής εφαρμόζοντας παρεμποδιστές της SOD με σκοπό να μελετηθεί φθορισμομετρικά η μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού και η μεταβολή του ενδοκυτταρικού ασβεστίου κατά την αλληλεπίδραση με O_2^- . Στη συνέχεια εφαρμόστηκε θαψιγαργίνη (παρεμποδιστής των SERCA αντλιών ασβεστίου του ενδοπλασματικού δικτύου) και μελετήθηκε η μεταβολή του ενδοκυτταρικού ασβεστίου πριν και μετά την εφαρμογή O_2^- .

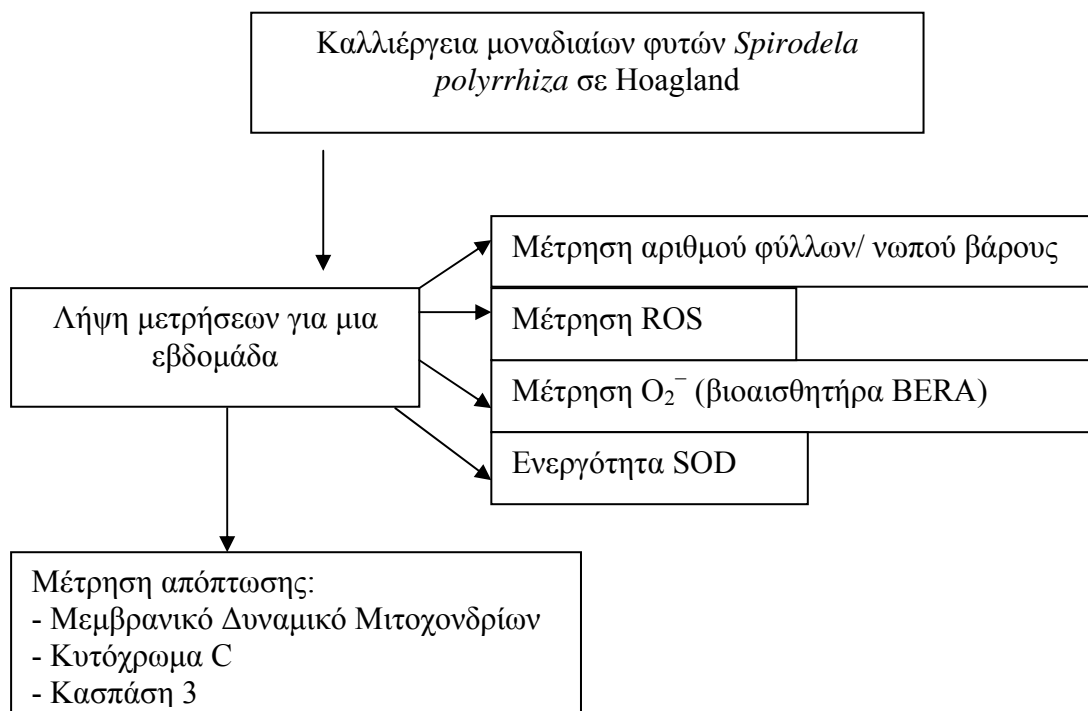


Διάγραμμα 1α : Σχηματική αναπαράσταση πρώτης πειραματικής ενότητας (βελτίωση αισθητήρα)



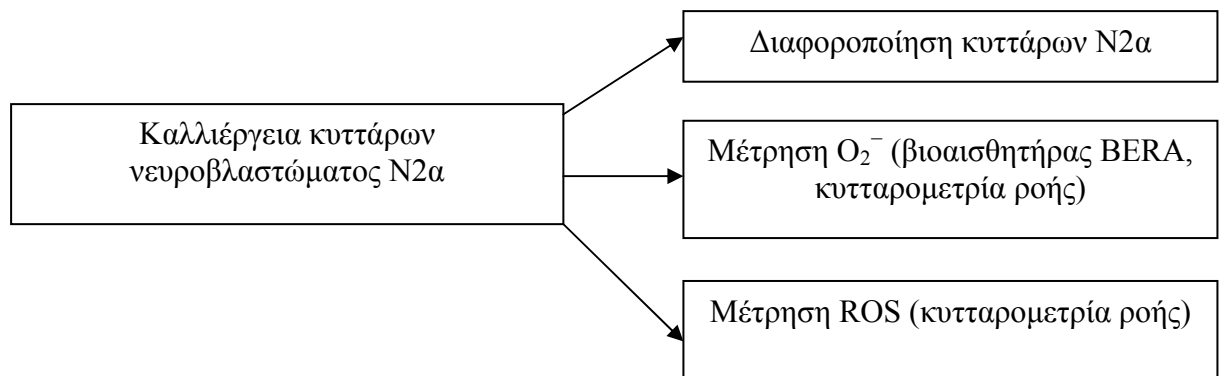
Διάγραμμα 1β : Σχηματική αναπαράσταση πρώτης πειραματικής ενότητας (διερεύνηση μηχανισμού)

- Κατά την δεύτερη πειραματική ενότητα (διάγραμμα 2) έγινε εφαρμογή του βιοαισθητήρα BERA με τα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα για την ανίχνευση O_2^- κατά την διάρκεια της *in vitro* κυτταροδιαίρεσης του φυτού *Spirodela polyrrhiza*. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω βιοχημικές αναλύσεις: μέτρηση αριθμού φυλλιδίων, νωπού βάρους, προσδιορισμός ελευθέρων ριζών (ROS), μέτρηση του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων, κυτοχρωμόματος C και η δραστικότητα κασπάσης-3 (με τα δύο τελευταία να αποτελούν πρώιμους αποπτωτικούς παράγοντας) καθώς και μέτρηση ενεργότητας της SOD.



Διάγραμμα 2 : Σχηματική αναπαράσταση δεύτερης πειραματικής ενότητας

- Κατά την τρίτη πειραματική ενότητα (διάγραμμα 3) έγινε εφαρμογή του βιοαισθητήρα BERA με τα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα για την ανίχνευση O_2^- κατά την διάρκεια της *in vitro* διαφοροποίησης κυττάρων νευροβλαστώματος της κυτταρικής σειράς N2a. Παράλληλα κατά την πρώτη και δεύτερη ημέρα της διαφοροποίησης προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών (ROS) και του επιπέδου του O_2^- με κυτταρομετρία ροής (κοινές πειραματικές μετρήσεις με διδακτορική διατριβή Teresa Valero).



Διάγραμμα 3 : Σχηματική αναπαράσταση τρίτης πειραματικής ενότητας

- Κατά την τέταρτη πειραματική ενότητα ο βιοαισθητήρας δοκιμάστηκε στην κλινική ιατρική, με σκοπό την καταγραφή των επιπέδων O_2^- σε ασθενείς σε μεταχειριστική κατάσταση, σε συνεργασία με το Νοσοκομείο ΝΙΜΙΤΣ. Πραγματοποιήθηκε αιμοληψία από ασθενείς και υγιείς ανθρώπους και έγινε άμεση μέτρηση με τον βιοαισθητήρα.

**Γ1. ΠΡΩΤΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ:
ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ
ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένας κυτταρικός αισθητήρας χρησιμοποιεί τις φυσιολογικές αποκρίσεις των κυττάρων σαν αισθητήριο στοιχείο, όπως είναι η χημική επιφάνεια ή το ηλεκτρικό δυναμικό, η κινητικότητα ή η γενική κυτταρική δραστηριότητα. Συνεπώς ολόκληρο το κύτταρο παρέχει πολυστοχευμένους καταλύτες ειδικότερα σε διαδικασίες που απαιτείται η συμμετοχή πολλών ενζύμων στη σειρά (D'Souza 1999; Kintzios 2007). Άρα τα κύτταρα είναι ικανά να παρέχουν δεδομένα για τη φυσιολογική απόκριση στον αναλύτη-στόχο καθώς και για την εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας του αναλύτη (Daunert et al. 2000). Ένα από τα χαρακτηριστικά που κάνει τους κυτταρικούς αισθητήρες ελκυστικούς σαν ένα κλινικό αναλυτικό εργαλείο είναι η ευαισθησία τους, που σε κάποιες περιπτώσεις αγγίζει το επίπεδο ενός μόνο μορίου-στόχου. Αυτή η θεωρητική υπόθεση είναι βασισμένη στην περίπλοκη αλληλεπίδραση η οποία έχει προκύψει ως αποτέλεσμα της συνεξέλιξης των κυττάρων με διάφορα μόρια στο περιβάλλον τους, σε βαθμό που επιτρέπει στα κύτταρα να ανταποκρίνονται στα μόρια και οργανισμούς με ακριβείς και αναπαραγόμενους τρόπους. Όμως, αυτή η ικανότητα εξισορροπείται από ένα εξελικτικό «κόστος» (εν ίδει συμβιβασμού) γιατί τα κύτταρα μπορούν να αντιδράσουν με τον ίδιο χονδρικά τρόπο ενάντια σε ένα εκπληκτικό μεγάλο αριθμό διαφορετικών μορίων, οπότε οι κυτταρικοί αισθητήρες παρουσιάζουν φτωχή εκλεκτικότητα. Αυτό είναι ένα πολύ κοινό πρόβλημα σε τοξικολογικές μεθόδους, όπου οι αισθητήρες επιτυχώς ανιχνεύουν την παρουσία ενός τοξικού παράγοντα αλλά γενικά αποτυγχάνουν να καθορίσουν την ακριβή φύση του τοξικού αναλύτη (Kaiser and Palabrica 1991; Van der Lelie et al. 1997; Riska et al. 1999).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι κυτταρικής τροποποίησης, με σκοπό την αύξηση της εκλεκτικότητας των κυττάρων, με σχετική επιτυχία. Οι μέθοδοι κυτταρικής τροποποίησης είναι βασισμένες στην κυτταρική αναρρόφηση ξένου DNA κυρίως από Β ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και κατά συνέπεια οδηγούν στην έκφραση μεμβρανικών προσφώμενων υποδοχέων (Falsey et al. 2001; Ziauddin and Sabatini 2001; Andrews J.S. 2004; Delehanty et al. 2004). Μία γνωστή εφαρμογή είναι το σύστημα CANARY αναπτυγμένο από το εργαστήριο Lincoln Lab του MIT. Το CANARY έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του *Yersinia pestis* και άλλων

παθογόνων (Rider et al. 2003). Όμως, η εφαρμογή της κυτταρικής τροποποίησης είναι περιορισμένη λόγω της έλλειψης σταθερότητας και των συχνών μη επιθυμητών αλλαγών του κυτταρικού φαινοτύπου.

Μια εναλλακτική προσέγγιση της κυτταρικής τροποποίησης είναι η τελευταίως ανεπτυγμένη τεχνολογικά μέθοδος της μεμβρανικής μηχανικής (Kintzios 2008). Είναι μια γενική μεθοδολογία τεχνικώς εισαγόμενων δεκάδων χιλιάδων υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια έτσι ώστε το κύτταρο να μπορεί να αποκριθεί εκλεκτικά στον αναλύτη μετά την αλληλεπίδραση υποδοχέα-αναλύτη. Τα μόρια του υποδοχέα μπορούν να ποικίλουν από αντισώματα ως ένζυμα και πολυσακχαρίτες. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι η σύνδεση του μορίου-στόχου με τον αντίστοιχο υποδοχέα του, η οποία προκαλεί αλλαγή στην κυτταρική μεμβρανική δομή και μπορεί να μετρηθεί με την αλλαγή του μεμβρανικού δυναμικού.

Σε παλαιότερη εργασία, είχαμε αναφέρει την πρώτη εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας για την ανάπτυξη ενός υπερευαίσθητου αισθητήρα σουπεροξειδίου, ο οποίος βασίστηκε σε μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα θηλαστικών, ακινητοποιημένα σε πήγμα αλγινικού ασβεστίου (Moschoroulou and Kintzios 2006). Η διαδικασία της μεμβρανικής μηχανικής πραγματοποιείται με την ηλεκτροεισαγωγή μορίων της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (SOD) στις μεμβράνες των κυττάρων Vero, τα οποία και δρουν σα καταλυτικές μονάδες για τη μετατροπή του σουπεροξειδίου σε υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η αντίδραση του σουπεροξειδίου με την SOD προκαλεί αλλαγές στο μεμβρανικό δυναμικό των κυττάρων, οι οποίες μετρήθηκαν με κατάλληλα ηλεκτρόδια σύμφωνα με την μέθοδο βιοηλεκτρικής αναγνώρισης (BERA). Ο αισθητήρας αποκρίθηκε σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σουπεροξειδίου, με όριο ανίχνευσης τα 100 pM.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Αισθητήριο κυτταρικό υλικό

Για την κατασκευή των αισθητήρων χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικά ζωικά υγιή κύτταρα, τα οποία προήλθαν κλωνικά μέσω κυτταροκαλλιέργειας, από την κυτταρική σειρά Vero (νεφρικά κύτταρα πράσινου πιθήκου – ινοβλάστες).

2.2 Καλλιέργεια και Απομόνωση κυττάρων

Η διαδικασία που ακολουθείται για την παραλαβή μεμονωμένων ζωικών και κυττάρων είναι η εξής:

Για την παραλαβή μεμονωμένων κυττάρων πρέπει να γίνει αποκόλληση αυτών από την επιφάνεια της φιάλης όπου αναπτύσσονται. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη ενζυμικού διαλύματος θρυψίνης/EDTA στα κύτταρα για 5 min στους 37 °C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 2 min στους 25 °C. Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε πλάκα Neubauer και τα κύτταρα διατηρούνται σε εναιώρημα μέχρι το επόμενο στάδιο.

Το θρεπτικό υπόστρωμα θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ζωικών κυττάρων περιέχει:

- 1x DMED (Biochrom AG)
- 10% (v/v) ορός εμβρύου μόσχου (FCS) (Invitrogen)
- 1% (w/v) διάλυμα πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Biochrom AG)
- 1% (v/v) L – γλουταμίνη (Biochrom AG)
- 0.5% πυρουβικό οξύ (Biochrom AG)
- 7.5% NaHCO₃

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θάλαμο με 5% CO₂ στους 37 °C.

2.3 Ηλεκτροεισαγωγή της SOD στις κυτταρικές μεμβράνες

Προκειμένου να δημιουργηθούν τα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα, για την εκλεκτικότητα του συστήματος, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροεισαγωγής εφαρμόζοντας τροποποιημένο το πρωτόκολλο των Zeira et al. (1991) και Moschoroulou and Kintzios (2006). Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

1. PBS (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων), pH 7.4:
 - 130 mM NaCl
 - 5 mM Na₂HPO₄·12H₂O
 - 15.6 mM KH₂PO₄
2. Διάλυμα 0.8 M CaCl₂ σε θρεπτικό υλικό
3. Διάλυμα 4% αλγινικού νατρίου σε θρεπτικό υλικό
4. SOD (EC 1.15.1.1) (Fluka)

➤ **Διαδικασία Ηλεκτροεισαγωγής**

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν κατά την διαδικασία της ηλεκτροεισαγωγής είναι:

- Μέτρηση αριθμού κυττάρων Vero.
- Παραλαβή τόσης ποσότητας ώστε να έχουμε την απαραίτητη συγκέντρωση κυττάρων ανά mL και τοποθέτηση σε erpendorf.
- Φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 2 min.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση σε 1 mL PBS.
- Φυγοκέντρηση (δεύτερη φορά) στις 1000 στροφές για 2 min.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση σε 1 mL PBS.
- Φυγοκέντρηση (τρίτη φορά) στις 1000 στροφές για 2 min.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση σε 40 μL PBS.
- Πρόσθεση 400 μL SOD και επώαση για 20 min στον πάγο.
- Τοποθέτηση του μίγματος «κύτταρα-SOD» στην κυβέττα ηλεκτροεισαγωγής, η οποία έχει επωαστεί για αρκετή ώρα στο πάγο.
- Εφαρμογή 4 παλμών (διάρκεια παλμού 5 ms) στην ανάλογη ένταση πεδίου.
- Μεταφορά του δείγματος στο erpendorf και το τοποθέτηση για 1 ώρα στους 37 °C.
- Φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 2 min.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση σε 1 mL PBS.
- Φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 2 min.
- Πέταμα υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση σε 1 mL θρεπτικό υλικό.

Έπειτα ακολουθήθηκε η διαδικασία της ακινητοποίησης και συνεπώς της δημιουργίας των κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA.

2.4 Ηλεκτροεισαγωγή διαφορετικών συγκεντρώσεων SOD στις κυτταρικές μεμβράνες

Προκειμένου να ερευνηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης των ηλεκτροεισαγόμενων μορίων της SOD στην ευαισθησία του συστήματος, τα κύτταρα Vero τροποποιήθηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις SOD όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3. Οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν 750, 1500 και 3000 U mL⁻¹.

2.5 Εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών κατά την ηλεκτροεισαγωγή

Προκειμένου να ερευνηθεί η επίδραση των διαφορετικών συνθηκών ηλεκτροεισαγωγής στην αποτελεσματικότητα της μεμβρανικής μηχανικής, δημιουργήθηκαν μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα Vero ηλεκτροεισάγωντας SOD στις μεμβράνες τους, εφαρμόζοντας τέσσερις παλμούς σε διαφορετικά ηλεκτρικά πεδία. Οι εντάσεις αυτών των ηλεκτρικών πεδίων ήταν 400 V cm⁻¹ και 1800 V cm⁻¹ και η διαδικασία περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.

2.6 Παρασκευή κυτταρικού βιοαισθητήρα BERA 6^{ης} γενιάς

Η παρασκευή του κυτταρικού βιοαισθητήρα BERA έγινε ως εξής:

Παραλήφθηκε 1 mL τροποποιημένων κυττάρων Vero με SOD και αναμίχθηκε με 2 mL 4% αλγινικού νατρίου. Έπειτα το μίγμα παραλήφθηκε με σύριγγα (22G) και προστέθηκε σταγονηδόν μέσα σε διάλυμα 0.8 M CaCl₂, με αποτέλεσμα την άμεση ακινητοποίηση των κυττάρων σε αλγινικό ασβέστιο, σε σφαιρικό σχήμα. Μετά τα σφαιρίδια τοποθετήθηκαν μέσα σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό DMED, κλείστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν σε συνθήκες δωματίου 25 °C (εικόνα 3).

Προκειμένου να ερευνηθεί η επίδραση του αριθμού των κυττάρων στην ευαισθησία του συστήματος, ακινητοποιήθηκαν διαφορετικοί πληθυσμοί κυττάρων (2x10⁶, 3x10⁶ και 4x10⁶) ανά mL. Αυτό σημαίνει ότι ανά σφαιρίδιο, το οποίο έχει 2 mm διάμετρο, ο αριθμός των κυττάρων ήταν περίπου 50 x10³, 75 x10³ και 100 x10³, αντιστοίχως.

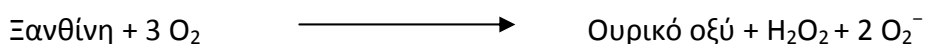


Εικόνα 3: Απεικόνιση των σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου, στα οποία βρίσκονται ακινητοποιημένα κύτταρα και αποτελούν τους βιοαισθητήρες BERA 6^{ης} γενιάς. Οι βιοαισθητήρες αποθηκεύονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό.

2.7 Πρότυπα Διαλύματα

Στους βιοαισθητήρες BERA 6^{ης} γενιάς δοκιμάστηκαν πρότυπα διαλύματα O_2^- σε διάφορες συγκεντρώσεις, : 0, 1, 10, 100 pM και 10 nM.

Το O_2^- παράγεται από την οξείδωση της ξανθίνης μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης (XOD, EC 1.1.3.22) σύμφωνα με την αντίδραση:

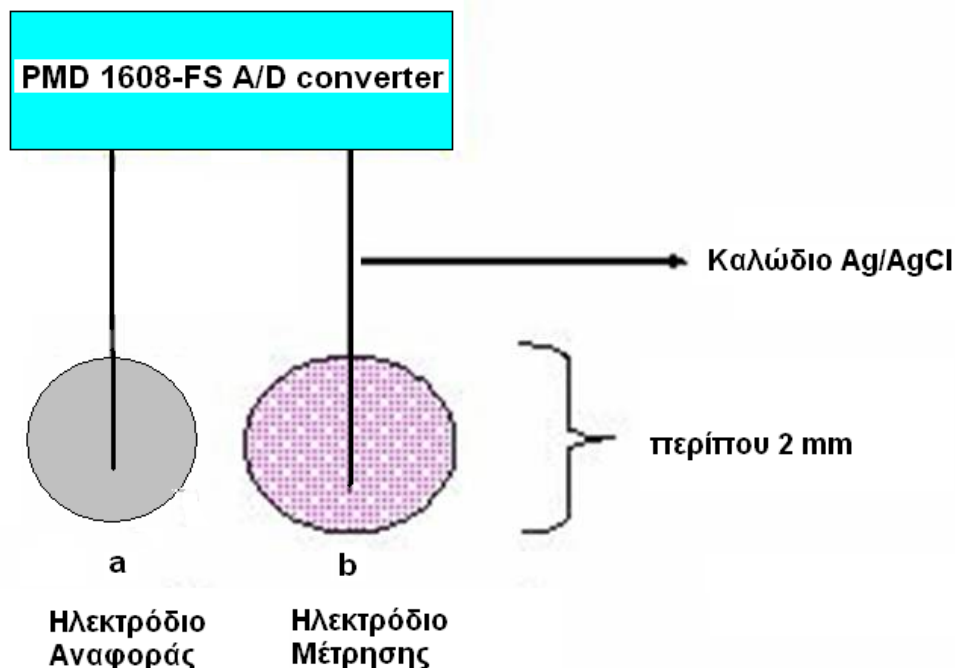


Οι συγκεντρώσεις ξανθίνης κυμάνθηκαν από $1-10^4$ pM και η συγκέντρωση της XOD ήταν 100 mU/mL και διαλύθηκαν σε PBS, pH 7.4

2.8 Διάταξη βιοαισθητήρα και καταγραφή μέτρησης

Κάθε σφαιρίδιο (αισθητήρας) συνδέθηκε στο ηλεκτρόδιο μέτρησης, το οποίο είναι από ασήμι, επενδυμένο με μια στρώση χλωριούχου αργύρου (AgCl) και η διάμετρος του ηλεκτροδίου είναι 0.2 mm. Επίσης, στο ηλεκτρόδιο αναφοράς συνδέθηκε ένα σφαιρίδιο χωρίς κύτταρα (εικόνα.4). Τα ηλεκτρόδια συνδέθηκαν διαμέσου ομοαξονικών καλωδίων προς απαλοιφή ηλεκτροστατικών φορτίων, με τη συσκευή καταγραφής δεδομένων η οποία περιλαμβάνει κάρτα τύπου PMD-1608FS A/D (Measurement Computing) (εικόνα 5). Η κάρτα μετατροπής του αναλογικού

σήματος σε ψηφιακό κατέγραφε το σήμα σε τάση ηλεκτρικού ρεύματος (V). Το υπεύθυνο λογισμικό για την καταγραφή του σήματος και την επεξεργασία των δεδομένων ήταν το InstaCal (Measurement Computing).

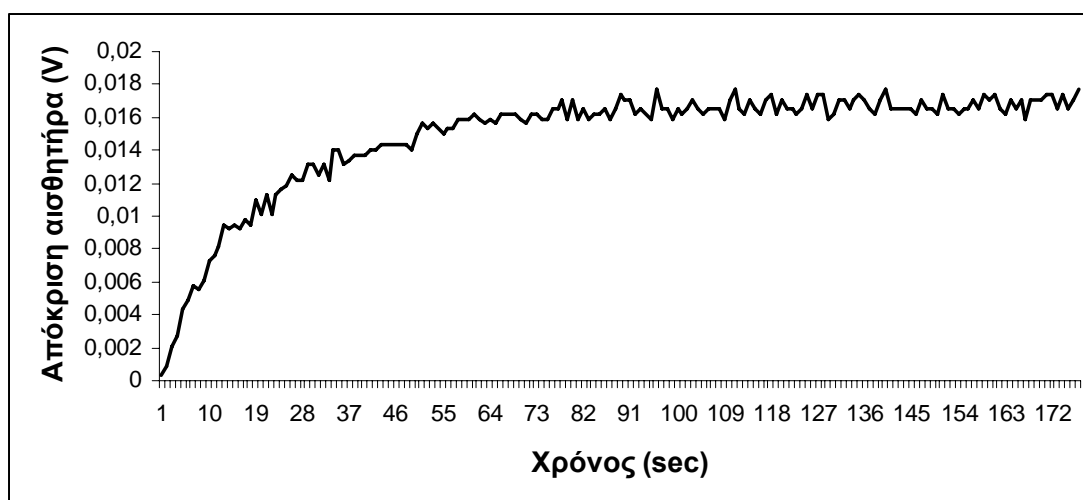


Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της σύνδεσης του σφαιριδίου με τα ακινητοποιημένα κύτταρα (b) στο ηλεκτρόδιο μέτρησης και της σύνδεσης του σφαιριδίου χωρίς κύτταρα (a) στο ηλεκτρόδιο αναφοράς. Και τα δυο ηλεκτρόδια συνδέονται στην κάρτα μετατροπής του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό.



Εικόνα 5: Η κάρτα μετατροπής του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό, τύπου PMD-1608FS A/D (Measurement Computing).

Σε κάθε εφαρμογή και τα δύο σφαιρίδια, που ήταν συνδεδεμένα στα ηλεκτρόδια, βυθίζονταν στο δείγμα (όγκος δείγματος 1 mL). Η απόκριση του κάθε βιοαισθητήρα εκτιμήθηκε καταγράφοντας την αλλαγή στο ηλεκτρικό δυναμικό τη στιγμή της προσθήκης του δείγματος και μέχρι αυτή να σταθεροποιηθεί (διάγραμμα 4). Σε κάθε μέτρηση υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών του ηλεκτρικού δυναμικού, μετά την σταθεροποίηση ο οποίος και αποτέλεσε την τελική τιμή του ηλεκτρικού δυναμικού (V) του βιοαισθητήρα για κάθε δείγμα.



Διάγραμμα 4: Η καμπύλη απόκρισης του αισθητήρα κατά την διάρκεια της μέτρησης (Ενδεικτική απόκριση αισθητήρα).

2.9 Παρεμπόδιση SOD και φθορισμομετρική μέτρηση μεμβρανικού δυναμικού και ενδοκυτταρικού ασβεστίου

Σύμφωνα με την αρχή των μεμβρανικώς τροποποιημένων κυττάρων η αλληλεπίδραση του O_2^- με την ηλεκτροεισαγώμενη SOD προκαλεί αλλαγές στο μεμβρανικό δυναμικό. Προκειμένου να αποδείξουμε αυτή την υπόθεση, η SOD ($1500 U mL^{-1}$) επωάστηκε με 2 mM H_2O_2 και 2 mM NaCN για 1 ώρα, δύο γνωστούς παρεμποδιστές της SOD (Bloor et al. 1983; Haddad and Yuan 2005; Castellano et al. 2006) και μετά ηλεκτροεισήχθη στις κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων Vero, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.

Προκειμένου να ερευνήσουμε την επίδραση του O_2^- στις κυτταρικές μεμβράνες των τροποποιημένων κυττάρων, έγινε έλεγχος του μεμβρανικού δυναμικού και του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, πριν και μετά την εφαρμογή 1 nM

O_2^- . Η εκτίμηση του μεμβρανικού δυναμικού έγινε με την χρωστική 3,3 Ιωδιούχος διπροπυλο-θειαδικαρβοκυανίνη (DiSC3(5)) και της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου με την χρωστική Fluo 3 (Dajas-Bailador et al. 2002; Kho et al. 2003).

Η DiSC3(5) είναι λιπόφιλη κατιονική χρωστική και δεν ανήκει στην κατηγορία των συνήθων φθορισμομετρικών ποτενσιομετρικών ουσιών, οι οποίες περνούν μέσα από το πλασμάλημμα ως εστέρες (μη φθορίζουσα μορφή) και στη συνέχεια διασπώνται από τις εστεράσες του κυτταροπλάσματος στην ελεύθερη, φθορίζουσα μορφή. Αντίθετα, η συγκεκριμένη ουσία φθορίζει όσο βρίσκεται στο (κυρίως εξωκυτταρικό) διάλυμα, και χάνει την ιδιότητα του φθορισμού όταν βρεθεί μέσα στη διαμεμβρανική περιοχή. Αντιθέτως η χρωστική Fluo-3 ανήκει στους ακετυλομεθυλεστέρες (AM), που χρησιμοποιούνται ως δείκτες φθορισμού σε ζωντανά κύτταρα. Όταν οι ουσίες αυτές εισέλθουν στον ενδοκυτταρικό χώρο υδρολύονται από διάφορες μη εξειδικευμένες εστεράσες που υπάρχουν στο εσωτερικό του κυττάρου. Μετά την υδρόλυση του ακετυλομεθυλεστέρα αποδεσμεύεται η χρωστική και αποκτά ικανότητα φθορισμού (ενεργό μόριο), έτοιμη να ενωθεί με το ιόν-στόχο που θέλουμε να εντοπίσουμε μέσα στο κύτταρο. Η χρωστική αυτή μετά από κατάλληλη διέγερση φθορίζει στα σημεία όπου υπάρχει το ιόν στόχος (Ca^{2+}).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

1. Kreb`s-Hepes (Ρυθμιστικό διάλυμα), pH 7.4:
 - 144 mM NaCl
 - 5.9 mM KCl
 - 1.2 mM $MgCl_2$
 - 10 mM Γλυκόζη
 - 10 mM Hepes
 - 2 mM $CaCl_2$
2. 300 μ M DiSC3(5) (Invitrogen)
3. 1 mM Fluo 3 (Invitrogen)
4. 1 nM Ξανθίνη
5. 100 mU/mL XOD
6. 5 mg/mL MTT

➤ **Διαδικασία**

- Τροποποιημένα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας 96 θέσεων, σε πυκνότητα 3×10^4 ανά πηγαδάκι.
- Αναμονή για 3 ώρες ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα στο πιάτο καλλιέργειας.
- Επώαση με 3 μM DiSC3(5) και 10 μM Fluo 3, για 45 min και 1 ώρα στους 37°C , αντιστοίχως (η κάθε χρωστική εφαρμόστηκε σε διαφορετικά πηγαδάκια).
- Ξέπλυμα με Kreb's-Hepes δύο φορές.
- Μέτρηση φθορισμού χρησιμοποιώντας το Spectra Max M2e Microplate Reader (Molecular devices) στα 651/675 nm και στα 492/520 nm, αντιστοίχως.
- Προσθήκη 1 nM O_2^- και ξανά μέτρηση του φθορισμού.

Μετά την φθορισμομετρική μέτρηση επώαστηκαν τα κύτταρα με βρωμιούχο διμεθυλ-θιαζολ-διφαιλυτετραζόλιο (MTT) για 30 min στους 37°C και μετρήθηκε η απορρόφηση της φορμαζάνης στα 560 nm (Dutta et al. 2005). Αυτό έγινε έτσι ώστε να υπολογιστεί το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων, με το οποίο διαιρέσαμε την φθορισμομετρική απορρόφηση, έτσι ώστε η μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού και της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης να αναχθεί ανά κύτταρο.

2.10 Παρεμπόδιση των SERCA αντλιών ασβεστίου του ενδοπλασματικού δικτύου

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η πιθανή συμμετοχή του των ενδοκυτταρικών ιόντων ασβεστίου στην αλληλεπίδραση του O_2^- με τα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα, μετρήθηκε η προκαλούμενη μεταβολή του ενδοκυτταρικού ασβεστίου από το O_2^- , παρεμποδίζοντας την κίνηση του ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Πιο αναλυτικά, κύτταρα Vero μεμβρανικώς τροποποιημένα με SOD και ηλεκτροπορωμένα χωρίς SOD, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3 επώαστηκαν με 100 nM θαψιγαργίνη για 1 ώρα στους 37°C και σημάνθηκαν με τη χρωστική Fluo 3 για τη μέτρηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου

πριν και μετά την προσθήκη O_2^- , σύμφωνα με την παράγραφο 2.9. Η θαψιγαργίνη είναι ένας μη ανταγωνιστικός παρεμποδιστής των ενζύμων γνωστών με το ακρωνύμιο SERCA, τα οποία είναι Ca^{+2} -ATPase του σαρκο/ενδοπλασματικού δικτύου (Thastrup et al. 1990; Rogers et al. 1995) και αυτό που κάνει είναι να μπλοκάρει την εισροή του ασβεστίου στο σαρκο/ενδοπλασματικό δίκτυο. Η χρησιμοποίηση ενός ρυθμιστικού διαλύματος με ασβέστιο μπορεί να ανεβάσει τη συγκέντρωση του κυτοπλασματικού ασβεστίου λόγω της θαψιγαργίνης, καθώς η εξάντληση των αποθεμάτων ασβεστίου μπορεί δευτερευόντως να ενεργοποιήσει τις αντλίες ασβεστίου της κυτταρικής μεμβράνης και να εισέλθει ασβέστιο στο κυτόπλασμα (Lampe et al. 1995; Kovacs et al. 2005) .

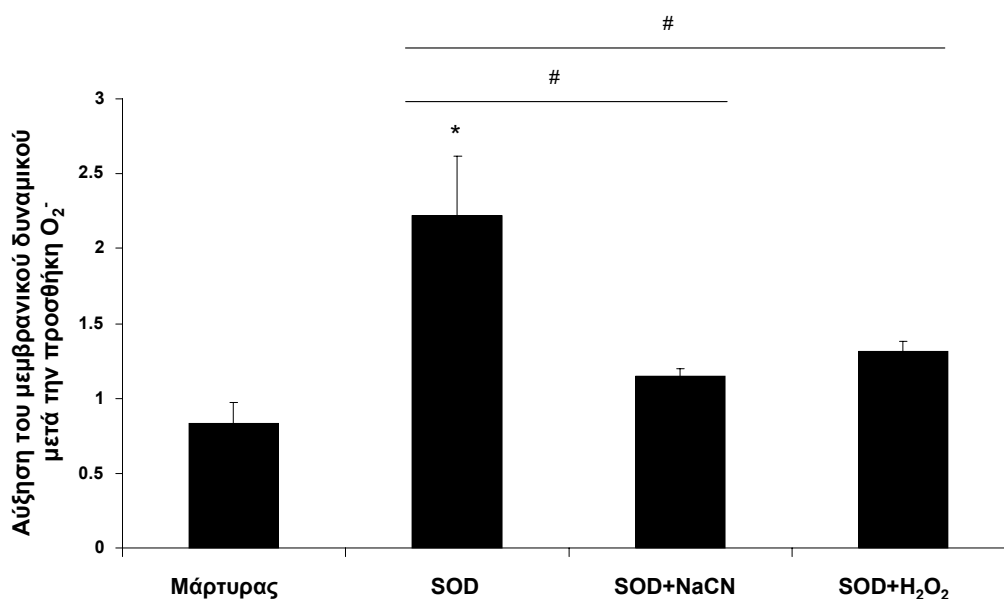
2.11 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές και σε κάθε εφαρμογή δοκιμάστηκαν πέντε βιοαισθητήρες. Χρησιμοποιήθηκε one-way ANOVA με *post hoc* ανάλυση Newman-Keuls για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω του προγράμματος GraphPad Prism version 4.00 (www.graphpad.com). Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά όταν $p < 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

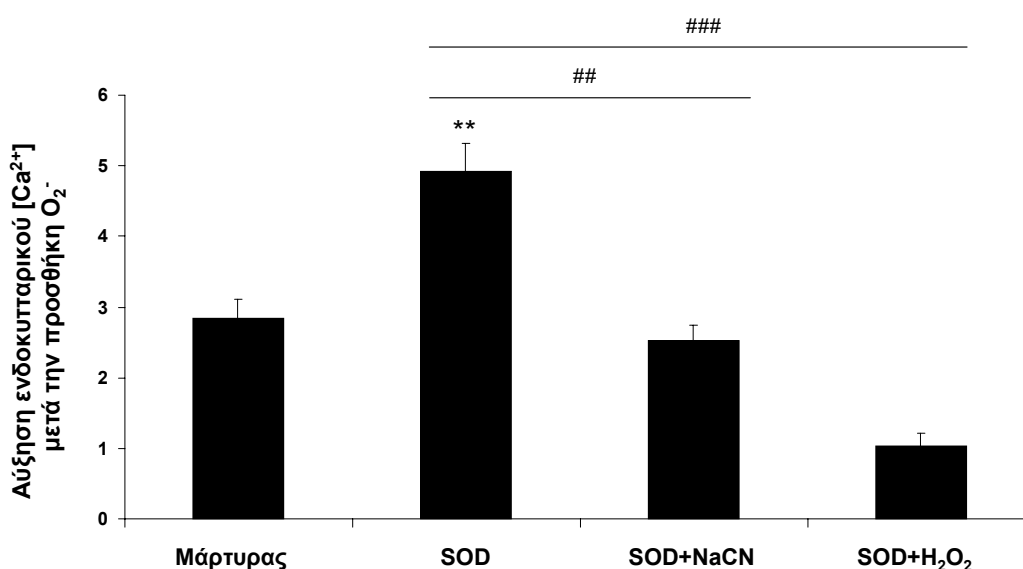
3.1 Μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού και της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικού ασβεστίου μετά την παρεμπόδιση της SOD

Στα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα Vero με SOD, αφού επώαστηκαν με τη φθορίζουσα χρωστική DiSC3(5), καταγράφηκε η εκπομπή του φθορισμού η οποία ανταποκρίνεται στην κατάσταση του μεμβρανικού δυναμικού τους υπό την παρουσία O_2^- . Η ένταση του σχετικού φθορισμού αυξήθηκε υπό την παρουσία 1 nM O_2^- (διάγραμμα 5), ενώ δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού εκείνων των κυττάρων των οποίων η ηλεκτροεισαχθείσα SOD είχε παρεμποδιστεί είτε με 2 mM NaCN είτε με 2 mM H_2O_2 , σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρας (ηλεκτροπορωμένα αλλά χωρίς να προστεθεί SOD).



Διάγραμμα 5: Μεταβολές του μεμβρανικού δυναμικού των μεμβρανικώς τροποποιημένων κυττάρων με SOD (SOD), μετά την προσθήκη 1 nM O_2^- (εκφρασμένη σαν ποσοστιαία αύξηση του σχετικού φθορισμού σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε O_2^-) ή των ηλεκτροπορωμένων κυττάρων χωρίς την προσθήκη κανενός μορίου (μάρτυρας). Πριν την ηλεκτροεισαγωγή η SOD είχε επωαστεί με 2mM NaCN (SOD+NaCN) ή με 2 mM H_2O_2 (SOD+ H_2O_2), δύο γνωστούς παρεμποδιστές της CuZnSOD. * $p < 0.05$, στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα. # $p < 0.05$, στατιστικά σημαντική διαφορά από τα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα με SOD.

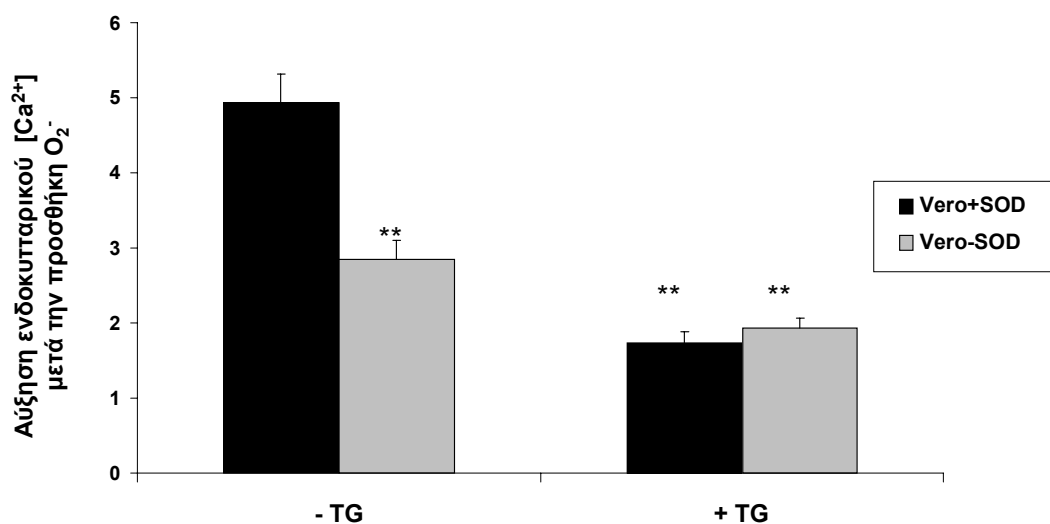
Η παρουσία του O_2^- προκάλεσε σημαντική αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου στα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα Vero με SOD (διάγραμμα 6) σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρα (ηλεκτροπορωμένα αλλά χωρίς να προστεθεί SOD). Επίσης δεν υπήρξε μεταβολή του ενδοκυτταρικού ασβεστίου στα κύτταρα με παρεμποδισμένη SOD από το NaCN σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρα, ενώ εκείνα τα κύτταρα που είχαν παρεμποδισμένη SOD από το H_2O_2 παρουσίασαν τη μικρότερη μεταβολή.



Διάγραμμα 6: Μεταβολές του ενδοκυτταρικού ασβεστίου των μεμβρανικώς τροποποιημένων κυττάρων με SOD (SOD), μετά την προσθήκη 1 nM O_2^- (εκφρασμένη σαν ποσοστιαία αύξηση του σχετικού φθορισμού σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε O_2^-) ή των ηλεκτροπορωμένων κυττάρων χωρίς την προσθήκη κανενός μορίου (μάρτυρας). Πριν την ηλεκτροεισαγωγή η SOD είχε επωαστεί με 2mM NaCN (SOD+NaCN) ή με 2 mM H_2O_2 (SOD+ H_2O_2), δύο γνωστούς παρεμποδιστές της CuZnSOD. ** $p < 0.01$, στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, στατιστικά σημαντική διαφορά από τα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα με SOD.

3.2 Μεταβολή της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικού ασβεστίου μετά την παρεμπόδιση των SERCA αντλιών

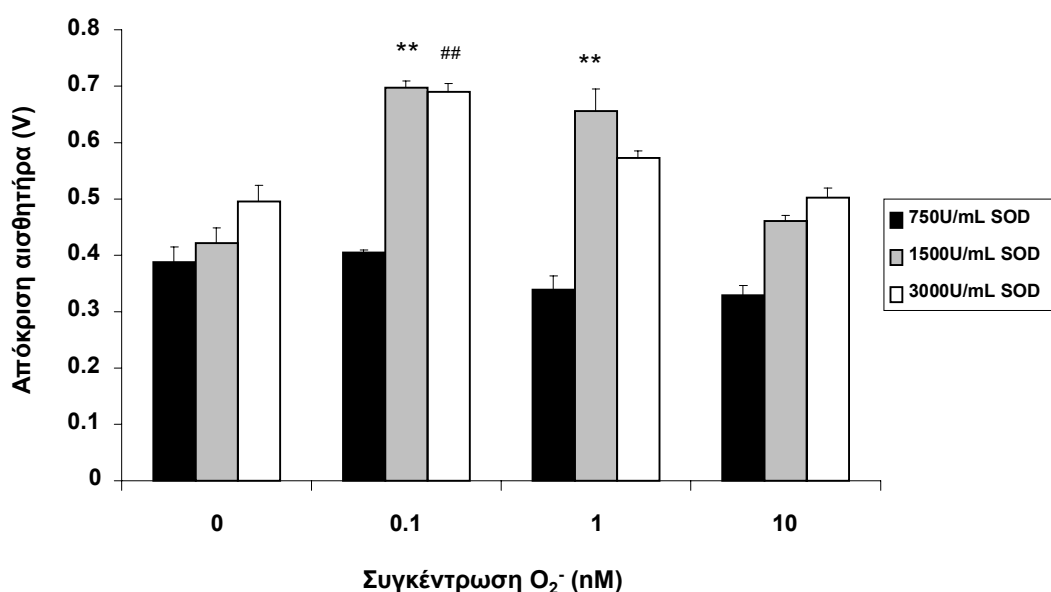
Η αλληλεπίδραση του O_2^- με τα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα με SOD, προκάλεσε αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, όμως αυτό το φαινόμενο μειώθηκε σημαντικά όταν πριν την αλληλεπίδραση τα κύτταρα επώαστηκαν με θαψιγαρίνη (TG) (διάγραμμα 7), η οποία παρεμποδίζει την κίνηση του ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αντίθετα η συγκέντρωση του ασβεστίου δεν μεταβλήθηκε στα ηλεκτροπορωμένα αλλά όχι τροποποιημένα κύτταρα (δηλαδή κύτταρα όχι εκλεκτικά στο O_2^- , Vero-SOD) ανεξάρτητα από την επώαση με ή χωρίς TG.



Διάγραμμα 7: Μεταβολές του ενδοκυτταρικού ασβεστίου των μεμβρανικώς τροποποιημένων κυττάρων με SOD (Vero+SOD), μετά την προσθήκη 1 nM O_2^- (εκφρασμένη σαν ποσοστιαία αύξηση του σχετικού φθορισμού σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε O_2^-) ή των ηλεκτροπορωμένων κυττάρων χωρίς την προσθήκη κανενός μορίου (Vero-SOD). Πριν την προσθήκη O_2^- τα κύτταρα επώαστηκαν με 100 nM θαψιγαρίνη (+TG) ή δεν επώαστηκαν (-TG). ** $p < 0.01$ στατιστικά σημαντική διαφορά από μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα με SOD και χωρίς θαψιγαρίνη.

3.3 Απόκριση του κυτταρικού αισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς με διαφορετικές συγκεντρώσεις ηλεκτροεισαγώμενης SOD

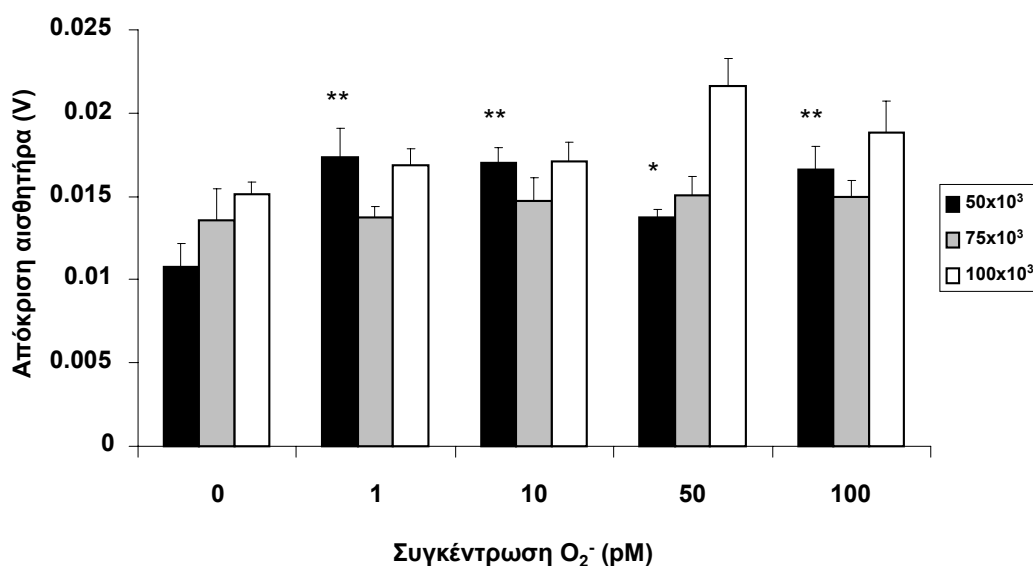
Οι αισθητήρες με συγκέντρωση 750 units mL⁻¹ SOD, δεν έδειξαν κάποια σημαντική απόκριση στις διαφορετικές συγκεντρώσεις O₂⁻. Αντιθέτως, αυξάνοντας τη συγκέντρωση της SOD σε 1500 ή 3000 units mL⁻¹ παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική απόκριση στη συγκέντρωση 0.1 nM O₂⁻. Στις άλλες δύο συγκεντρώσεις O₂⁻ (1 και 10 nM) οι αποκρίσεις των αισθητήρων ήταν χαμηλότερες από την 0.1 nM O₂⁻ (διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 8: Απόκριση του αισθητήρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις O₂⁻, μετά την ηλεκτροεισαγωγή διαφορετικών συγκεντρώσεων μορίων SOD στις κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων. Η απόκριση του αισθητήρα εκφράζεται σαν αλλαγή του μεμβρανικού δυναμικού των ακινητοποιημένων κυττάρων. Συγκεντρώσεις ηλεκτροεισαχθείσας SOD (units mL⁻¹): 750 (μαύρες στήλες), 1500 (γκρι στήλες), 3000 (άσπρες στήλες). ***p* < 0.01, στατιστικά σημαντική διαφορά από την μηδενική συγκέντρωση O₂⁻ των 1500 units mL⁻¹. ## *p* < 0.01, στατιστικά σημαντική διαφορά από την μηδενική συγκέντρωση O₂⁻ των 3000 units mL⁻¹.

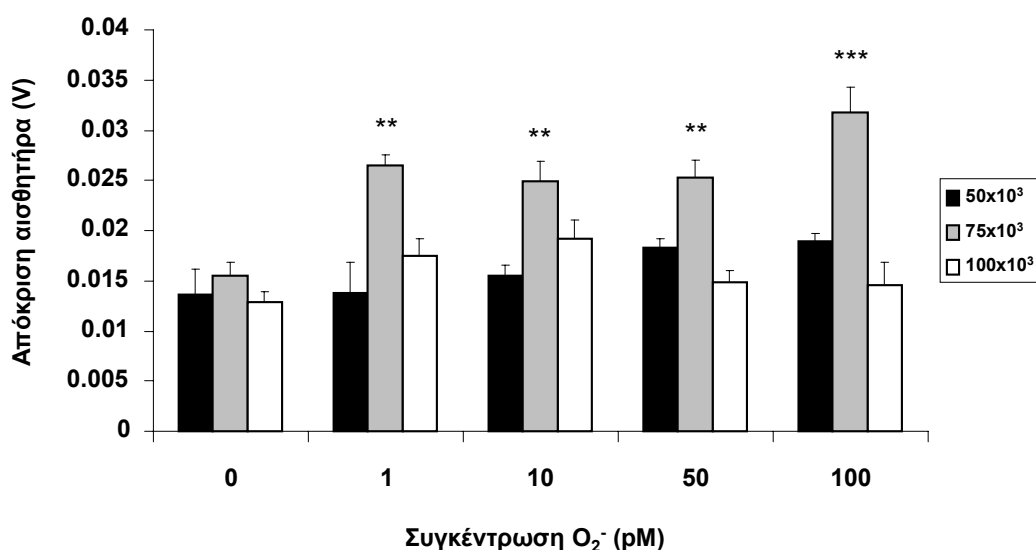
3.4 Η απόκριση του αισθητήρα BERA 6^{ης} γενιάς εξαρτάται από τη συγκέντρωση των κυττάρων αλλά και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου

Η απόκριση του αισθητήρα εφαρμόζοντας 400 V cm^{-1} ένταση πεδίου κατά την ηλεκτροεισαγωγή παρουσίασε μια μικρή αύξηση του δυναμικού αυξάνοντας τη συγκέντρωση των κυττάρων (διάγραμμα.9). Όμως, μόνο οι αισθητήρες με συγκέντρωση 50×10^3 κύτταρα/αισθητήρα είχαν μια στατιστικά σημαντική απόκριση στο O_2^- (σε όλο το εύρος συγκεντρώσεων 1-100 μM) έναντι της μηδενικής συγκέντρωσης O_2^- . Ενώ οι αισθητήρες με συγκέντρωση 100×10^3 κύτταρα/αισθητήρα παρουσίασαν μια αυξημένη απόκριση μόνο στα 50 μM O_2^- .



Διάγραμμα 9: Η επίδραση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου (400 V cm^{-1}) και του κυτταρικού πληθυσμού στην απόκριση του αισθητήρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις O_2^- . Η απόκριση του αισθητήρα εκφράζεται σαν αλλαγή του μεμβρανικού δυναμικού των ακινητοποιημένων κυττάρων. Πληθυσμός ακινητοποιημένων κυττάρων ανά αισθητήρα: (μαύρες στήλες), 75×10^3 (γκρι στήλες), 100×10^3 (άσπρες στήλες). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, στατιστικά σημαντική διαφορά από την μηδενική συγκέντρωση O_2^- .

Μια διαφορετική εικόνα παρατηρήθηκε όταν κατά την ηλεκτροεισαγωγή εφαρμόστηκε ένταση πεδίου 1800 V cm^{-1} . Σε αυτή τη περίπτωση η απόκριση των αισθητήρων ήταν σημαντικά υψηλότερη με συγκέντρωση ακινητοποιημένων κυττάρων 75×10^3 /αισθητήρα (διάγραμμα 10) και μόνο οι αισθητήρες με τη μεσαία (75×10^3) και υψηλότερη συγκέντρωση (100×10^3) αποκρίθηκαν στατιστικά σημαντικά στη συγκέντρωση 1 pM O_2^- . Η μέγιστη απόκριση (έναντι των 100 pM O_2^-) καταγράφηκε από τους αισθητήρες με τη μεσαία συγκέντρωση (75×10^3).



Διάγραμμα 10: Η επίδραση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου (1800 V cm^{-1}) και του κυτταρικού πληθυσμού στην απόκριση του αισθητήρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις O_2^- . Η απόκριση του αισθητήρα εκφράζεται σαν αλλαγή του μεμβρανικού δυναμικού των ακινητοποιημένων κυττάρων. Πληθυσμός ακινητοποιημένων κυττάρων ανά αισθητήρα: 50×10^3 (μαύρες στήλες), 75×10^3 (γκρι στήλες), 100×10^3 (άσπρες στήλες). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, στατιστικά σημαντική διαφορά από την μηδενική συγκέντρωση O_2^- .

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα με SOD παρατηρήθηκε αύξηση του σχετικού φθορισμού της χρωστικής για την ένδειξη της κατάστασης του μεμβρανικού δυναμικού τους υπό την παρουσία O_2^- (διάγραμμα 5). Η αύξηση της ένδειξης υποδεικνύει την αποπόλωση των κυτταρικών μεμβρανών σε σχέση με τα απλώς ηλεκτροπορωμένα κύτταρα (μάρτυρας) (Kho et al. 2003). Σημαντικό, όμως, ήταν το γεγονός ότι δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού εκείνων των κυττάρων των οποίων η ηλεκτροεισαχθείσα SOD είχε παρεμποδιστεί είτε με 2 mM NaCN είτε με 2 mM H_2O_2 , σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρας. Αυτό το γεγονός επιβεβαιώνει την υπόθεση μας, καθώς η εκλεκτική παρεμπόδιση της SOD δείχνει ότι τα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα με SOD δρουν σαν καταλυτικές μονάδες και ότι τα ηλεκτροεισαχθέντα μόρια της SOD διατηρούν τις χαρακτηριστικές τους ιδιότητες.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 3, η παρουσία του O_2^- προκάλεσε αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Επιπλέον, η παρατηρούμενη αποπόλωση των μεμβρανών (διάγραμμα 5) συνδέεται με την εισροή ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που τεκμηριώνει την αρχή λειτουργίας της μεμβρανικής μηχανικής. Με άλλα λόγια, η μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού μπορεί να οφείλεται στη γρήγορη εισροή ιόντων ασβεστίου και πιθανόν να συσχετίζεται με αλλαγές στη στερεοδιάταξη των ηλεκτροεισαχθέντων μορίων SOD, στις κυτταρικές μεμβράνες, κατά την αντίδραση τους με το O_2^- . Έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων (υποδοχέων) στην κυτταρική επιφάνεια και αναλυτών-στόχων προκαλούν αλλαγή στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου (Whelan and Zare 2003), ενώ συσχέτιση μεταξύ των διαμορφωτικών αλλαγών των ηλεκτροεισαχθέντων μορίων SOD, της κίνησης των ιόντων ασβεστίου και κυτταρικού μεμβρανικού δυναμικού έχει αναφερθεί από Moschoroulou and Kintzios (2006). Στην παρούσα μελέτη δείχνεται ότι οι αλλαγές στην κίνηση των ιόντων του ενδοκυτταρικού ασβεστίου είναι συνδεδεμένες με την αλληλεπίδραση του O_2^- και των μεμβρανικώς τροποποιημένων κυττάρων με SOD. Επιπροσθέτως, η εμπλοκή των ιόντων ασβεστίου στον μηχανισμό της μοριακής αναγνώρισης μέσω μεμβρανικής μηχανικής έχει αναφερθεί σε αρκετές δημοσιεύσεις (Perdikaris et al. 2009; Varelas et al. 2010; Perdikaris et al. 2011).

Όπως είδαμε παραπάνω η αλληλεπίδραση του O_2^- με τα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα με SOD, συνδέθηκε με την αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, όμως αυτό το φαινόμενο μειώθηκε όταν πριν την αλληλεπίδραση τα κύτταρα επώαστηκαν με θαψιγαρίνη (TG) (διάγραμμα 4), η οποία παρεμποδίζει την κίνηση του ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το αποτέλεσμα που προκλήθηκε από την TG φάνηκε λιγότερο στα ηλεκτροπορωμένα αλλά όχι τροποποιημένα κύτταρα (δηλαδή κύτταρα όχι εκλεκτικά αντιδρώντα στο O_2^-). Η επώαση με TG, η οποία παρεμποδίζει εκλεκτικά τις αντλίες SERCA, προκαλεί εξάντληση των αποθεμάτων ασβεστίου του ενδοπλασματικού δικτύου πριν την προσθήκη O_2^- . Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4, η επώαση με TG είναι ικανή να σταματήσει την αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου που προκαλείται από την αλληλεπίδραση του O_2^- με τα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας ότι η αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου προκαλούμενη από το O_2^- οφείλεται στην απελευθέρωση ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.3 ο κυτταρικός αισθητήρας παρασκευάζεται τροποποιώντας μεμβρανικώς κύτταρα Vero με SOD. Απουσία O_2^- ο αισθητήρας παρουσίασε μια αυξημένη απόκριση αυξάνοντας τη συγκέντρωση της ηλεκτροεισαγώμενης SOD (διάγραμμα 8). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη περατότητα της κυτταρικής μεμβράνης που προκύπτει σαν αποτέλεσμα της ηλεκτροπόρωσης, καθώς αποτελεί μέρος της διαδικασίας της ηλεκτροεισαγωγής. Όταν ηλεκτροεισήχθησαν $750 \text{ units mL}^{-1}$ SOD, οι αισθητήρες δεν έδειξαν κάποια σημαντική απόκριση στα $0.1 \text{ nM } O_2^-$, αλλά μια ελαφρά μείωση του δυναμικού στο 1 nM και $10 \text{ nM } O_2^-$. Αντιθέτως, αυξάνοντας τη συγκέντρωση της SOD σε 1500 ή $3000 \text{ units mL}^{-1}$ παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική απόκριση στη συγκέντρωση O_2^- 0.1 nM . Όπως και στη συγκέντρωση $750 \text{ units mL}^{-1}$, έτσι και στις άλλες δύο συγκεντρώσεις SOD οι αποκρίσεις των αισθητήρων στις συγκεντρώσεις 1 και $10 \text{ nM } O_2^-$ ήταν χαμηλότερες από την $0.1 \text{ nM } O_2^-$ (και μόνο η $1 \text{ nM } O_2^-$ ήταν στατιστικά σημαντική). Αυτό το φαινόμενο συμφωνεί με προηγούμενη εργασία (Moschoroulou and Kintzios 2006).

Γενικά η απόκριση των αισθητήρων εφαρμόζοντας 400 V cm^{-1} ένταση πεδίου κατά την ηλεκτροεισαγωγή παρουσίασε μια μεγαλύτερη ευαισθησία στις διαφορετικές συγκεντρώσεις O_2^- σε συνδυασμό με τη μικρότερη συγκέντρωση κυττάρων (50×10^3 /αισθητήρα) (διάγραμμα.9). Αντιθέτως η απόκριση των

αισθητήρων εφαρμόζοντας υψηλότερο πεδίο (1800 V cm^{-1}) ήταν σημαντικά υψηλότερη με συγκέντρωση ακινητοποιημένων κυττάρων 75×10^3 /αισθητήρα (διάγραμμα 10) και μόνο οι αισθητήρες με τη μεσαία (75×10^3) και υψηλότερη συγκέντρωση (100×10^3) αποκρίθηκαν στατιστικά σημαντικά στη συγκέντρωση 1 pM O_2^- . Οι διαφορετικές εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου κατά την ηλεκτροεισαγωγή ίσως επηρέασαν τις καταλυτικές ιδιότητες των μεμβρανικώς τροποποιημένων κυττάρων με διάφορους τρόπους. Υψηλής έντασης πεδία έχουν συσχετιστεί με αύξηση των θερμικών επιδράσεων λόγω της θερμότητας Joule (Teissie et al. 2005), ενώ χαμηλότερης έντασης πεδία έχουν συσχετιστεί με αύξηση της υπερπόλωσης των κυτταρικών μεμβρανών (Lojewska et al. 1989).

**Γ2. ΔΕΥΤΕΡΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ:
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΣΤΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ IN VITRO ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ
ΔΙΑΙΡΕΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το φυτό *Spirodela polyrrhiza* ανήκει στην οικογένεια Lemnaceae. Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται υδρόβιοι φυτικοί οργανισμοί γνωστοί ως «φακές του νερού» (duckweeds). Οι «φακές του νερού» αποτελούνται από μια δομή που μοιάζει με φύλλο και ονομάζεται φυλλίδιο (frond) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Φυτά *S. polyrrhiza* (φωτογραφία από μεταπτυχιακή εργασία κ. Ι. Παπαθανασίου)

Οι «φακές του νερού» έχουν την ιδιότητα κάτω από ιδανικές συνθήκες να πολλαπλασιάζονται ταχύτατα για αυτό και χρησιμοποιούνται σε οικολογικές μελέτες, ως μοντέλα βασικής μελέτης στη βιολογία, στην τοξικολογία, στην παραγωγή βιοφαρμακευτικών προϊόντων και σαν πηγή τροφής για τα ζώα στην γεωπονία. Οι αποξηραμένες «φακές του νερού» είναι καλή ζωοτροφή καθώς περιέχουν 25-45% πρωτεΐνες (εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης), 4.4% λίπη, and 8-10% ίνες, ανά ξηρό βάρος. Ευδοκιμούν σε στάσιμα νερά π.χ. λίμνες και κυρίως αναπτύσσονται την άνοιξη και το φθινόπωρο. Είναι πολύ χρήσιμες στο οικοσύστημα γιατί λειτουργούν σαν ένα φυσικό φίλτρο καθώς απορροφάνε πολλά θρεπτικά συστατικά που μπορεί να είναι επιβαρυντικά για την ισορροπία του οικοσυστήματος. Βέβαια από την άλλη μπορεί να είναι ανεπιθύμητο καθώς πολύ γρήγορα καλύπτει όλη την επιφάνεια του νερού με αποτέλεσμα να στερεί το φως από τα υπόλοιπα φυτά. Κάποια από τα είδη της οικογένειας Lemnaceae μπορούν

να αναπτυχθούν και στη σκιά όπως το είδος *Lemna minor*, το οποίο χρησιμοποιείται και στα ενυδρεία (Den Hartog 1975; Wang 1990).

Αναλυτικότερα τα γένη και τα είδη είναι:

- *Spirodela sp.*: Είναι πράσινα και μπορεί από την κάτω πλευρά να έχουν ένα κοκκινο-καφέ χρώμα. Έχουν πολλές ρίζες (7 - 12) ανά φυλλίδιο. Το μήκος τους φτάνει τα 10 mm.
 - *S. intermedia*
 - *S. polyrrhiza*
 - *S. punctata*
- *Landoltia sp.*: Μορφολογικά βρίσκονται ανάμεσα στη *Spirodela sp.* και τη *Lemna sp.* Έχουν 2-3 ρίζες ανά φυλλίδιο και το μήκος τους είναι 3-6 mm.
 - *L. punctata*
- *Lemna sp.*: Έχουν μία ρίζα και το μήκος τους είναι 2-5 mm.
 - *L. gibba*
 - *L. minor*
 - *L. minuta*
 - *L. trisulca*
 - *L. valdiviana*
- *Wolffiella sp.*: Δεν έχουν ρίζα αλλά έχουν μία τρόπιδα που τους επιτρέπει να διατηρούν τον προσανατολισμό τους στο νερό. Είναι μικρά και έχουν 2-10 mm μήκος.
 - *W. caudata*
 - *W. denticulata*
 - *W. gladiata*
 - *W. hyalina*
 - *W. lingulata*
 - *W. neotropica*
 - *W. oblonga*
 - *W. repanda*
 - *W. rotunda*
 - *W. welwitschii*

- Wolffia sp.: Είναι πράσινα ή κιτρινοπράσινα και δεν έχουν ρίζα. Αυτά τα είδη συνθέτουν 40% πρωτεΐνες, όσο και η σόγια, κάνοντας τα μια πολύ σημαντική πηγή πρωτεϊνών για τον άνθρωπο.
 - *W. angusta*
 - *W. arrhiza*
 - *W. australiana*
 - *W. borealis*
 - *W. brasiliensis*
 - *W. columbiana*
 - *W. cylindracea*
 - *W. elongata*
 - *W. globosa*
 - *W. microscopica*
 - *W. neglecta*

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Φυτικό υλικό

Καλλιεργήθηκαν μοναδιαία φυλλίδια *S. polyrrhiza* σε θρεπτικό διάλυμα Hoagland χωρίς σουκρόζη (Kang and Cleland 1990), το οποίο παρασκευάζεται 5 φορές πιο πυκνό ως εξής:

1. Διάλυμα Α: 1 M KH_2PO_4
2. Διάλυμα Β: 1 M KNO_3
3. Διάλυμα Γ: 1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
4. Διάλυμα Δ: 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
5. Διάλυμα Ε: 1 M Fe-EDTA
6. Διάλυμα Ζ:
 - 46 mM H_3BO_3
 - 9 mM $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 - 0.765 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 0.32 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - 0.08 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Για 1 L πυκνού διαλύματος Hoagland:

	Όγκος (mL)
Διάλυμα Α	1
Διάλυμα Β	5
Διάλυμα Γ	5
Διάλυμα Δ	2
Διάλυμα Ε	2
Διάλυμα Ζ	1
H_2O	984

Το τελικό διάλυμα καλλιέργειας Hoagland αραιώνεται 1:5 και αποστειρώνεται

Η διαδικασία παραλαβής μοναδιαίων φυλλιδίων ήταν η προσεκτική αποκόλληση των νεότερων φυλλιδίων από το μητρικό, με τη χρήση λαβίδας. Οι

συνθήκες καλλιέργειας ήταν 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι στους 22 °C για μία εβδομάδα (Lemon et al. 2001).

2.2 Βιοχημικές Αναλύσεις

Οι βιοχημικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν καθημερινά (για 7 ημέρες) κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*, ήταν μέτρηση αριθμού φυτών, μέτρηση νωπού βάρους, προσδιορισμός ελευθέρων ριζών, προσδιορισμός συγκέντρωσης σουπεροξειδικού ανιόντος (O_2^-) με τους βιοαισθητήρες BERA 6^{ns} γενιάς, ανίχνευση του βαθμού απόπτωσης μέσω της δράσης των κασπασών, προσδιορισμός του κυτταροπλασματικού κυτοχρωμάτος C, προσδιορισμός μεμβρανικού δυναμικού μιτοχονδρίων, και προσδιορισμός της ενεργότητας της SOD.

2.2.1 Μέτρηση αριθμού φυτών και νωπού βάρους

Καθημερινή μέτρηση αριθμού φυλλιδίων (fronds) και μέτρηση νωπού βάρους.

2.2.2 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός ελευθέρων ριζών (ROS)

Ο υπολογισμός των ελευθέρων ριζών, κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*, έγινε με μέτρηση του φθορισμού του δείγματος, στο φθορισμόμετρο, μετά από προσθήκη της χρωστικής 2,7 διοξική διχλωρό-διυδροφλουορεσκεΐνη (H_2DCFDA) (Invitrogen) σε αυτό (Schopfer et al. 2002).

Τα **διαλύματα** που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη μέτρηση, καθώς και η σύστασή τους φαίνονται παρακάτω:

1 0.01 M PBS, pH 7.4:

- 0.14 M NaCl
- 0.01 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
- 0.01 M $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$

Απαιτείται αποστείρωση του διαλύματος

2 10 mM H_2DCFDA :

Διάλυση σε DMSO

Το διάλυμα της χρωστικής αποθηκεύεται στο σκοτάδι στους – 20 °C.

➤ **Διαδικασία**

- Ομογενοποίηση με 5 mL διαλύματος PBS.
- Ακολούθησε διήθηση και λήψη του υπερκειμένου.
- Προσθήκη 5 μL χρωστικής και παραμονή των δειγμάτων στο σκοτάδι για 30 min

Μέτρηση στο φθορισμόμετρο Jasco FP-920 Fluorescence detector με μάρτυρα το διάλυμα PBS. Το φθορισμόμετρο ρυθμίστηκε όπως φαίνεται πιο κάτω:

- Διέγερση : 492 nm
- Απορρόφηση : 732 nm
- Gain : 100
- Slit : 18

Στις μετρήσεις που ελήφθησαν έγινε η αναγωγή ανά g νωπού βάρους, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.

2.2.3 Μέτρηση O_2^- με κυτταρικό βιοαισθητήρα BERA 6ης γενιάς

Ο υπολογισμός του O_2^- , κατά την *in vitro* κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*, έγινε με την χρήση κυτταρικού βιοαισθητήρα BERA 6^{ης} γενιάς (Moschoroulou and Kintzios 2006). Γινόταν καθημερινή παραλαβή ιστού, ο οποίος ομογενοποιείτο με 5 mL διαλύματος 0,01 M PBS, ακολουθούσε διήθηση και παραλαβή 1 mL, μέσα στο οποίο εμβαπτίζονταν τα ηλεκτρόδια με τον βιοαισθητήρα και γινόταν καταγραφή της διαφοράς δυναμικού όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3 της πρώτης πειραματικής ενότητας.

2.2.4 Απομόνωση μιτοχονδρίων και προσδιορισμός μεμβρανικού δυναμικού μιτοχονδρίων

Η απομόνωση των μιτοχονδρίων που έγινε με σκοπό να προσδιορισθεί σε αυτά το μεμβρανικό τους δυναμικό βασίζεται στην μεθοδολογία που αναφέρεται από τους Braeckman et al. (2002) και Eddy (1989).

Τα **διαλύματα** που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη μέτρηση, καθώς και η σύστασή τους φαίνονται παρακάτω:

1. **Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης:**

- 70 mM σουκρόζη
- 220 mM μαννιτόλη
- 2mM HEPES
- 7.2 mM κυστεΐνη
- 2.6 mM MgCl₂.

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.4 και έπειτα ακολουθεί αποστείρωση. Μετά το τέλος της αποστείρωσης και όταν το διάλυμα έρθει σε θερμοκρασία δωματίου προστίθενται 0.5 % (w/v) ορού εμβρύου μόσχου (Bovine Serum Albumin). Η προσθήκη γίνεται υπό ασηπτικές συνθήκες μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής με την χρήση φίλτρου 0.2 μm.

2. **0.1% Triton X-100**

3. **0.01 M PBS, pH 7.4:**

- 0.14 M NaCl
- 0.01 M NaH₂PO₄·H₂O
- 0.01 M Na₂HPO₄·12H₂O

Απαιτείται αποστείρωση του διαλύματος

4. **10 mM 3,3 Ιωδιούχο διπροπυλο-θειαδικαρβοκυανίνη (DiSC3(5)):**

Διάλυση σε DMSO, αποθηκεύεται στο σκοτάδι στους – 20 °C

Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα στις προαναφερόμενες συνθήκες.

➤ **Διαδικασία**

A) *Απομόνωση μιτοχονδρίων*

1. Λήψη του νωπού βάρους του δείγματος, λειοτρίβηση με 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης και διήθηση υπό κενό.
2. Φυγοκέντρηση του διηθήματος στις 3.000 rpm για 10 min στους 4°C.
3. Απομάκρυνση του ιζήματος και φυγοκέντρηση του υπερκειμένου στις 10.000 rpm για 10 min στους 4°C.

4. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης και 0.1% Triton X-100 και επαναφυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 5 min στους 4°C.
5. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος (μιτοχόνδρια) σε 3mL PBS.

B) Προσδιορισμός του μεμβρανικού δυναμικού μιτοχονδρίων

- Απομόνωση μιτοχονδρίων όπως περιγράφεται παραπάνω
- Προσθήκη 1 μL χρωστικής και παραμονή των δειγμάτων στο σκοτάδι για 15 min

Μέτρηση στο φθορισμόμετρο Jasco FP-920 Fluorescence detector με μάρτυρα το διάλυμα PBS. Το φθορισμόμετρο ρυθμίστηκε όπως φαίνεται πιο κάτω:

- Διέγερση : 651 nm
- Απορρόφηση : 675 nm
- Gain : 100
- Slit : 18

Στις μετρήσεις που ελήφθησαν έγινε η αναγωγή ανά g νωπού βάρους, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.

2.2.5 Προσδιορισμός κυτταροπλασματικού κυτοχρώματος C

Για τον προσδιορισμό του κυτταροπλασματικού κυτοχρώματος C εφαρμόστηκε το ίδιο πρωτόκολλο απομόνωσης μιτοχονδρίων. Η μόνη διαφορά βρίσκεται στο βήμα 4 της παραγράφου 2.2.4, καθώς το ίζημα απομακρύνεται και επαναφυγοκεντρείται το υπερκείμενο στις 35.000 rpm για 90 min (Braeckman et al. 2002). Η ανάλυση κυτοχρώματος C γίνεται στο υπερκείμενο (Margoliash and Walasek 1967).

Τα **αντιδραστήρια** που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη μέτρηση, καθώς και η σύστασή τους φαίνονται παρακάτω:

1. **0.1 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών**, το οποίο παρασκευάστηκε αναμειγνύοντας 80.2 mL K_2HPO_4 1M με 19.8 mL KH_2PO_4 1M, pH=7.4
2. **Υποθειικό νάτριο ($Na_2S_2O_4$)**, το οποίο ανάγει το κυτόχρωμα C.

➤ **Διαδικασία**

- Σε 0.2 mL δείγματος προστέθηκαν 1.8 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και μερικοί κόκκοι $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.
- Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε με φασματοφωτόμετρο τύπου SHIMAZU-160A στα 550 nm με μάρτυρα το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Η συγκέντρωση του ανηγμένου κυτοχρώματος C υπολογίστηκε από τον τύπο των Beer-Lambert:

$$A = \epsilon c l,$$

Όπου $\epsilon = 21,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Μοριακός συντελεστής κυτοχρώματος C).

2.2.6 Δραστικότητα Κασπάσης-3

Για την ανίχνευση της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε το kit EnzChek Caspase-3 Assay της εταιρείας Molecular Probes. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην μέτρηση της δράσης των κασπασών της ομάδας Caspase -3 που είναι εξειδικευμένες πρωτεάσες για την αμινοξική ακολουθία Asp-Glu-Val-Asp (DEVD). Το υπόστρωμα που είναι και το βασικό σημείο της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η Z-Asp-Glu-Val-Asp-7-άμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη (Z-DEVD-AMC, το Z συμβολίζει μία βενζυλοξυκαρβονυλική ομάδα) που εκπέμπει φθορίζον μπλε χρώμα στα 441 nm όταν διεγερθεί στα 342 nm. Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε έτοιμο αντιδραστήριο 7-άμινο-4-μεθυλοκουμαρίνης (AMC) ως πρότυπο αναφοράς σε συγκεντρώσεις από 10 μM έως 120 μM . Η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης που προέκυψε με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων είναι η ακόλουθη: $y = 1621.5x - 7700.4$ ($R^2 = 0.9468$), x = τιμή εκπομπής φθορισμού στα 441 nm μετά από διέγερση στα 342 nm., y = συγκέντρωση AMC σε μM .

Τα **διαλύματα** που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη μέτρηση, καθώς και η σύστασή τους φαίνονται παρακάτω:

1. **Διάλυμα ομογενοποίησης:**

- 10 mM Tris, pH 7.5
- 100 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 0.01% Triton X-100

2. Διάλυμα αντίδρασης:

- 10 mM PIPES
- 2 mM EDTA
- 0.1% CHAPS, pH 7.4.
- 10 mM DTT

3. **Πυκνό διάλυμα υποστρώματος Z-DEVD-AMC** (EnzChek Caspase-3 Assay Kit #1, Molecular Probes). Για να φτιάξουμε το τελικό διάλυμα του υποστρώματος αραιώνουμε 1:500 σε διάλυμα αντίδρασης.

➤ Διαδικασία

- Μέτρηση του νωπού βάρους του δείγματος, ομογενοποίηση σε 3 mL διάλυμα ομογενοποίησης, φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 5 min και λήψη του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 50 μL τελικού διαλύματος υποστρώματος, ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
- Μέτρηση στο φθορισμόμετρο Jasco FP-920 Fluorescence detector με μάρτυρα το 3 mL διαλύματος ομογενοποίησης + 50 μL διαλύματος υποστρώματος. Το φθορισμόμετρο ρυθμίστηκε όπως φαίνεται πιο κάτω:
 - Διέγερση : 342 nm
 - Απορρόφηση : 441 nm
 - Gain : 100
 - Slit : 18

2.2.7 Μέτρηση σχετικής ενεργότητας SOD

Ο υπολογισμός της ενεργότητας της SOD, κατά την *in vitro* κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*, έγινε με μέτρηση της απορρόφησης της φορμαζάνης, καθώς αυτή σχηματίζεται από την αναγωγή του μπλε του νιτρο-τετραζολίου (NBT) από το O_2^- . Η παραγωγή του O_2^- γίνεται με την διάσπαση της ριβοφλαβίνης, όταν βρεθεί κάτω από έντονο φωτισμό (Yu and Rengel 1999). Η παρουσία, λοιπόν, της SOD παρεμποδίζει την αναγωγή του NBT από το παραγόμενο (από την ριβοφλαβίνη) O_2^- ,

καθώς το μετατρέπει σε H_2O_2 , οπότε παρατηρείται μείωση της απορρόφησης έναντι του τυφλού.

Τα **διαλύματα** που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

1. 50 mM Hepes, pH 7.6

- 50 mM Hepes
- 50 mM $NaCO_3$
- 13 mM Μεθειονίνη
- 0.1 mM EDTA
- 0.025% Triton-X100
- 20 μ M Ριβοφλαβίνη

Διατήρηση του διαλύματος στο σκοτάδι.

2. 1 mM NBT

Διάλυση σε 0.05 M PBS, pH 7.4 και διατήρηση του διαλύματος στο σκοτάδι.

3. 0.05 M PBS, pH 7.4

- 0.14 M NaCl
- 0.05 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
- 0.05 M $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$

Απαιτείται αποστείρωση του διαλύματος.

➤ **Διαδικασία**

- Ομογενοποίηση με 5 mL Hepes
- Διήθηση (στον πάγο)
- Παραλαβή 2,5 mL δείγματος
- Προσθήκη 0,1 mL NBT
- Τοποθέτηση για 25 min κάτω από το φως (4000 Lux)
- Μέτρηση στα 560 nm

Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε Hepes

Τυφλό: - 2,5 mL Hepes

- 0,1 mL NBT

- Μέτρηση μετά από 20 min κάτω από το φως στα 560 nm

Πραγματική Απορ Δείγματος = Απορ Τυφλού - Απορ Δείγματος

Υπολογίστηκε η σχετική απορρόφηση του NBT. Στις μετρήσεις που ελήφθησαν έγινε η αναγωγή ανά g νωπού βάρους, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.

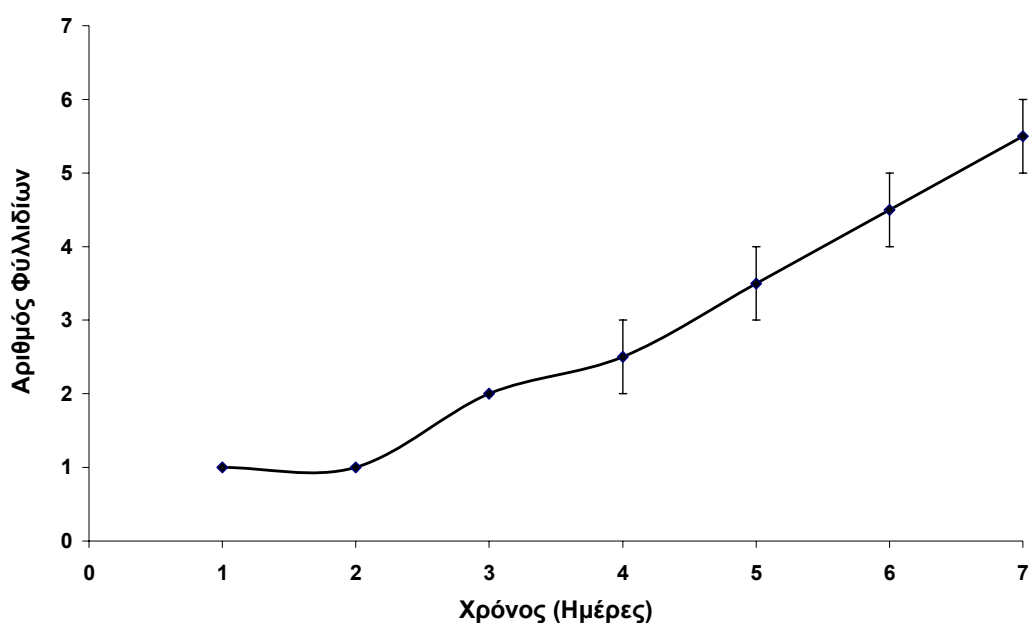
2.3 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

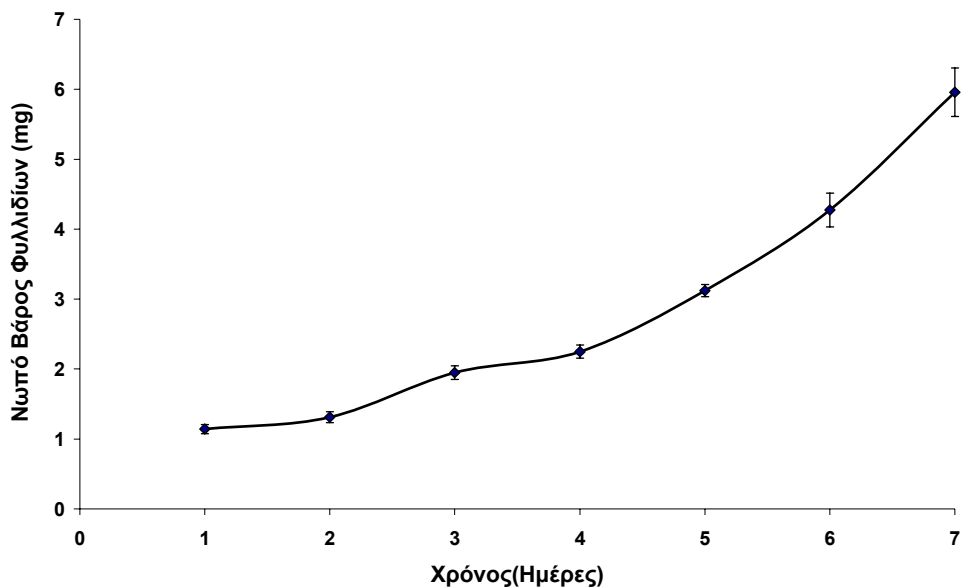
3.1 Ρυθμός ανάπτυξης *S. polyrrhiza*

Παρατηρώντας την πορεία ανάπτυξης του *S. polyrrhiza* βλέπουμε μια εκθετική αύξηση (διάγραμμα 11). Μετά από μια φάση προσαρμογής κατά την 1^η και 2^η ημέρα, τα μοναδιαία φυλλίδια άρχισαν να διαιρούνται περίπου κάθε 40 ώρες και τελικά να φτάσουν σε έναν μέσο όρο $5,5 \pm 0,5$ φυλλίδια στο τέλος της 7^{ης} ημέρας καλλιέργειας.



Διάγραμμα 11: Πορεία αριθμού φυλλιδίων κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*

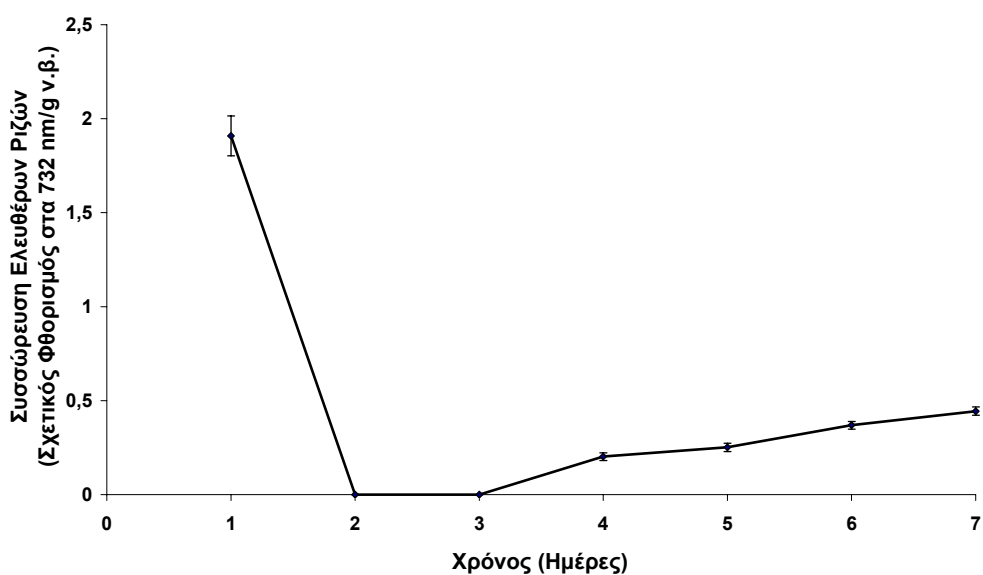
Μια ανάλογη πορεία παρατηρήθηκε και στο νωπό βάρους, το οποίο άρχισε να αυξάνεται εκθετικά από την 4^η ημέρα και μετά (διάγραμμα 12).



Διάγραμμα 12: Πορεία νωπού βάρους φυλλιδίων (mg) κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*

3.2 Συγκέντρωση ελευθέρων ριζών κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*

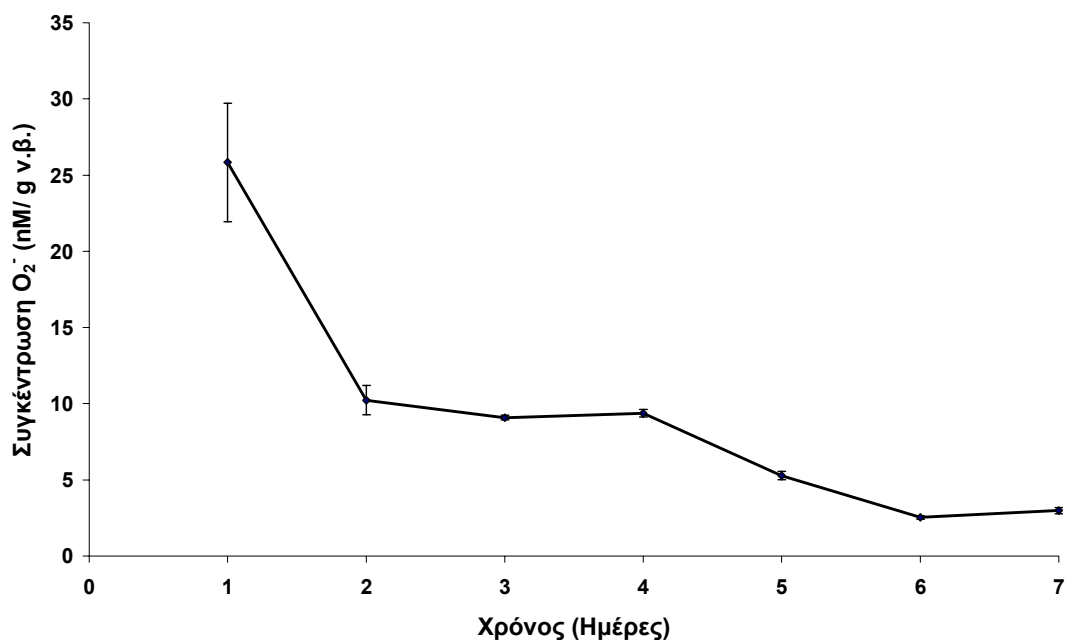
Οι ελεύθερες ρίζες, κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*, παρουσίασαν μια απότομη πτώση την 2^η και 3^η ημέρα φτάνοντας σε τιμές μηδενικές. Από την 4^η έως και την 7^η ημέρα εμφανίστηκε μια μικρή άνοδος, η οποία σε καμιά περίπτωση δεν έφτασε την τιμή της 1^{ης} ημέρας (διάγραμμα 13).



Διάγραμμα 13: Συγκέντρωση ελευθέρων ριζών (σχετικός φθορισμό ανά g νωπού βάρους) κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*

3.3 Συγκέντρωση O_2^- κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza* με τον βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς

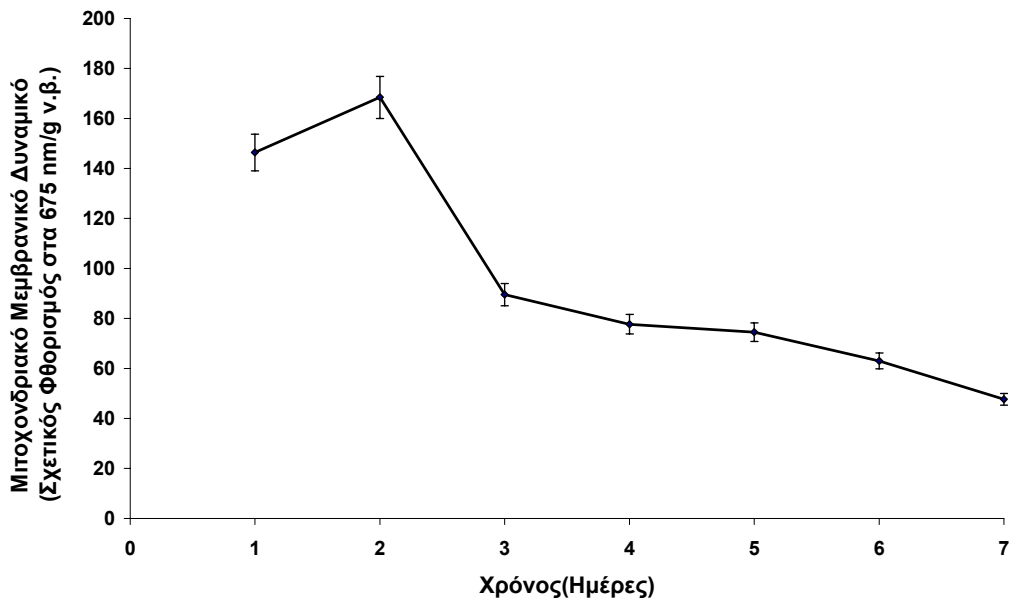
Παρατηρώντας την πορεία συγκέντρωσης του O_2^- (διάγραμμα 14) κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*, βλέπουμε μια απότομη πτώση από την 1^η στη 2^η ημέρα και μετά μια σταθεροποίηση των τιμών του O_2^- μέχρι την 4^η ημέρα καλλιέργειας. Από την 4^η έως την 7^η ημέρα παρατηρείται μια καθοδική πορεία της συγκέντρωσης O_2^- .



Διάγραμμα 14: Συγκέντρωση O_2^- (nM) κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza* ανά g νωπού βάρους

3.4 Μιτοχονδριακό μεμβρανικό δυναμικό κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*

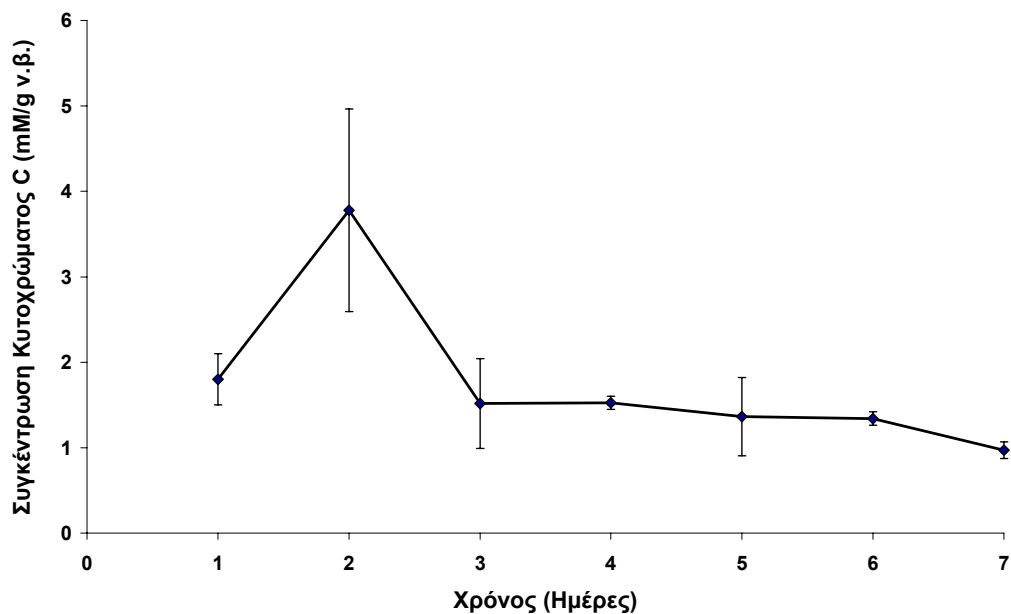
Κατά τις δύο πρώτες ημέρες παρατηρήθηκε αυξημένη αποπόλωση των μεμβρανών των μιτοχονδρίων, εκφρασμένη σαν θετική αλγεβρική αύξηση του μεμβρανικού δυναμικού (διάγραμμα 15) και από την 3^η ημέρα και μετά εμφανίστηκε μια σταδιακή επαναπόλωση, δηλαδή το μεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων οδεύει προς τις φυσιολογικές τιμές του.



Διάγραμμα 15: Μεμβρανικό δυναμικό μιτοχονδρίων (σχετικός φθορισμό ανά g νωπού βάρους) κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*

3.5 Συγκέντρωση κυτοχρώματος C κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*

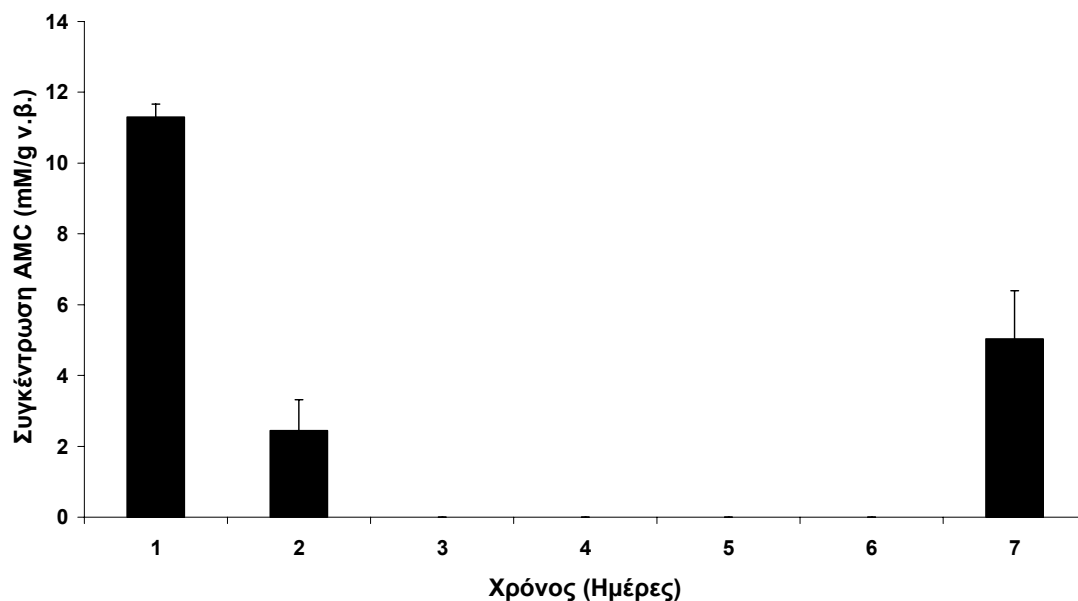
Η συγκέντρωση του κυτοχρώματος C παρουσιάζει μία αύξηση τη 2^η ημέρα ενώ από την 3^η ημέρα παρατηρείται μια μείωση και σταθεροποίηση των τιμών (διάγραμμα 16).



Διάγραμμα 16: Συγκέντρωση κυτοχρώματος C (mM) κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza* ανά g νωπού βάρους

3.6 Δραστικότητα Κασπάσης-3 κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*

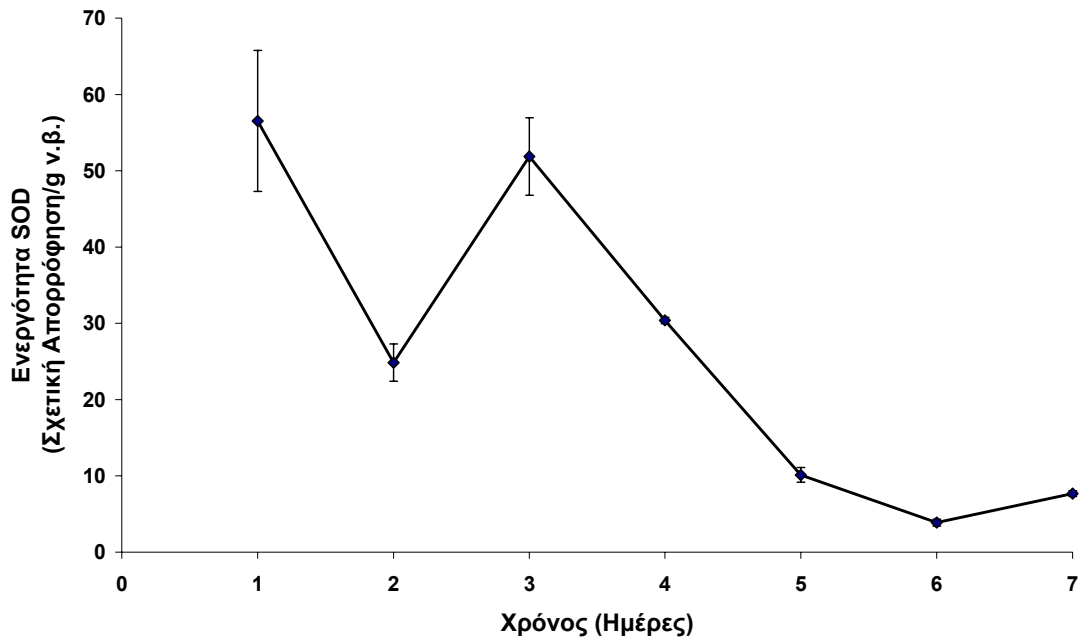
Ο βαθμός απόπτωσης υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωση της 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνης (AMC), η οποία αρχικά είναι υψηλή. Από την 1^η ημέρα μειώνεται έντονα. Την 3^η, 4^η, 5^η και 6^η ημέρα παρατηρούνται μηδενικές τιμές. Όμως από την 7^η ημέρα παρατηρείται και πάλι άνοδος της συγκέντρωσης της AMC (διάγραμμα 17).



Διάγραμμα 17: Συγκέντρωση AMC (μM) κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza* ανά γωπού βάρους

3.7 Σχετική ενεργότητα SOD κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*

Η πορεία της σχετικής ενεργότητας της SOD κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza* παρουσιάζει μια μείωση κατά την 2^η ημέρα, η οποία κατά την 3^η ημέρα επανέρχεται στα επίπεδα της 1^{ης} ημέρας. Από την 3^η ημέρα και μετά εμφανίζεται μια σταδιακή μείωση της ενεργότητας της SOD η οποία σταθεροποιείται από την 5^η έως την 7^η ημέρα καλλιέργειας (διάγραμμα 18).



Διάγραμμα 18: Πορεία σχετικής ενεργότητας SOD κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza* ανά g νωπού βάρους

3.8 Συσχέτιση των μετρούμενων παραμέτρων κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*

Από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε φάνηκε η θετική υψηλή συσχέτιση (α) μεταξύ του αριθμού των φυλλιδίων, του νωπού βάρους και του χρόνου, (β) της συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών με την συγκέντρωση O_2^- και την δράση της κασπάσης-3 (γ) της συγκέντρωσης O_2^- με την ενεργότητα της SOD, τη δράση της κασπάσης-3 και με το μεμβρανικό δυναμικό μιτοχονδρίων και (δ) του μεμβρανικού δυναμικού μιτοχονδρίων με τη συγκέντρωση κυτοχρώματος C. Αντίθετα, ο χρόνος, ο αριθμός των φυλλιδίων και το νωπό βάρος ήταν αρνητικά συσχετισμένα με την συγκέντρωση του O_2^- , την ενεργότητα της SOD και το μεμβρανικό δυναμικό μιτοχονδρίων (πίνακας 5). Ο αναλυτικός πίνακας βρίσκεται στο παράρτημα.

	Χρόνος	Αρ. Φυτών	Νωπό Βάρος	Συγκ. O ₂ ⁻	Συγκ. ROS	Μιτοχ. Δυναμικό	Κυτοχ. C	Συγκ. AMC	Ενεργ. SOD
Χρόνος									
Αρ. Φυτών	+								
Νωπό Βάρος	+	+							
Συγκ. O ₂ ⁻	-	-	-						
Συγκ.ROS				+					
Μιτοχονδρ. Δυναμικό	-	-	-	+					
Κυτόχρωμα C						+			
Συγκ. AMC				+	+				
Ενεργ. SOD	-	-	-	+					

Πίνακας 5: Πίνακας συσχέτισης των μετρούμενων παραμέτρων κατά την κυτταροδιαίρεση του *S. polyrrhiza*

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το *S. polyrrhiza* έχει καθορισμένο πρότυπο ανάπτυξης και το κάθε φυλλίδιο παράγει 6-14 φυτά και μετά πεθαίνει (Kang and Cleland 1990). Σύμφωνα με τη μελέτη των Lemon et al (2001) το *S. polyrrhiza* έχει μικρότερο χρόνο ζωής (12,1 ημέρες) και παράγει λιγότερα φυτά σε σχέση με άλλες «φακές του νερού», όπως είναι το *Lemna minor* και το *Wolffia borealis*. Όμως αν τα φυλλίδια απομακρυνθούν από το μητρικό φυτό (όπως εφαρμόστηκε στο πείραμα) τότε ο αριθμός των παραγόμενων θυγατρικών φυτών αλλά και ο ρυθμός παραγωγής τους αυξάνονται (φυτά ανά ημέρα), σχεδόν τετραπλασιάζεται. Παρόμοια παρατήρηση έκανε και ο McLay 1976 (McLay 1976) καθώς φυτά που αποκολληθήκαν από το μητρικό αναπαράχθηκαν γρηγορότερα σε αντίθεση με εκείνα που σχηματίστηκαν και παρέμειναν ενωμένα κατά την ανάπτυξή τους, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*.

Μια σημαντική μείωση των ελευθέρων ριζών προηγείται πριν την αύξηση του ρυθμού των θυγατρικών φυτών και η πορεία τους παρουσίασε μια αρκετά θετική συσχέτιση ($r^2 = 0.79$) με την συγκέντρωση του O_2^- , καθώς και το O_2^- μετά την 1^η ημέρα μειώθηκε σημαντικά. Προκειμένου να ερευνηθεί η σχέση μεταξύ της αρχικής μείωσης των ελευθέρων ριζών με την επερχόμενη κυτταρική διαίρεση, έγινε προσπάθεια να καθοριστεί η κυτταρική ζημιά από τη μεγάλη συσσώρευση ελευθέρων ριζών. Αυτό έγινε μελετώντας διάφορους αποπτωτικούς δείκτες, όπως είναι η απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια, η αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και η δραστικότητα της κασπάσης-3.

Η οξειδωτική ζημιά συσχετίζεται με την αύξηση της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, όπως αυτή εκφράζεται από την αύξηση της συγκέντρωσης του κυτοχρώματος C στο κυτόπλασμα και την αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Kunkel and Campbell 1952; Van den Bogert et al. 1988; Hancock 2005). Στη συγκεκριμένη εργασία η ζημιά στα μιτοχόνδρια παρατηρήθηκε κατά τις δύο πρώτες ημέρες καλλιέργειας καθώς υπήρξε αποπόλωση μιτοχονδρίων και αύξηση της συγκέντρωσης του κυτοχρώματος C στο κυτόπλασμα. Όμως η λειτουργία των μιτοχονδρίων αποκατεστάθη από την 3^η ημέρα και μετά όπου και παρατηρήθηκε η πρώτη διαίρεση. Ίσως αυτή η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία των δύο πρώτων ημερών να συσχετίζεται με την αρχική συσσώρευση των ελευθέρων ριζών. Παρότι

την 2^η ημέρα οι ελεύθερες ρίζες παρουσίασαν μηδενικές τιμές ενδεχομένως δευτερεύοντα ελευθέρως ριζικά προερχόμενα από τις μιτοχονδριακές μεμβράνες να οφείλονται στην παρατηρούμενη οξειδωτική ζημιά της 2^{ης} ημέρας. Είναι πολύ πιθανό να εμπλέκονται πιο πολύπλοκοι βιοχημικοί μηχανισμοί, οι οποίοι θα μπορούσαν να μελετηθούν στο μέλλον. Σημαντικό γεγονός φαίνεται να είναι η μεσολάβηση του οξειδωμένου κυτοχρώματος C προκειμένου να ενεργοποιηθεί το μονοπάτι των κασπασών, οι οποίες οδηγούν στην απόπτωση (Green and Reed 1998; Petrosillo et al. 2001).

Η μιτοχονδριακή αποπόλωση κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ημερών της καλλιέργειας θα μπορούσε να οδηγήσει στη μείωση της παραγωγής του ATP (Van den Bogert et al. 1988) και ακολούθως στον κυτταρικό θάνατο (Xin et al. 2003), αλλά υπήρξε σημαντική μείωση της οξειδωτικής ζημιάς από την 2^η ημέρα και μετά (διάγραμματα 15&16). Πράγματι η πορεία της μιτοχονδριακής αποπόλωσης ήταν υψηλά αρνητικά συσχετισμένη με την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των θυγατρικών φυτών ($r^2 = -0.89$). Επίσης η αύξηση του οξειδωμένου κυτοχρώματος C και/ή μιτοχονδριακή αποπόλωση μπορεί να ευθύνονται για την αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-3, όπως αυτή εκφράζεται μέσω της συγκέντρωσης της AMC κατά την 1^η ημέρα καλλιέργειας (διάγραμμα 17). Η στατιστική ανάλυση έδειξε υψηλή θετική συσχέτιση της συσσώρευσης των ελευθέρων ριζών αλλά και του O_2^- με την δραστικότητα της κασπάσης-3 ($r^2 = 0.90$ και 0.77 , αντιστοίχως). Η δραστικότητα της κασπάσης-3 αυξάνεται ελαφρώς την 7^η και τελευταία ημέρα της πειραματικής περιόδου. Ίσως αυτό το γεγονός θα συνδέεται με την ωρίμανση του μητρικού φυτού, καθώς σε αυτό το στάδιο τα θυγατρικά φυτά είναι πλήρως ανεπτυγμένα και ήδη ξεκινούν τον δικό τους πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη των θυγατρικών τους φυτών, ενώ το μητρικό τους φυτό βρίσκεται στο στάδιο της γήρανσης (Lemon et al. 2001; Stomp 2005). Επίσης η επαναδραστηριοποίηση των κασπασών μπορεί να συνδέεται με την σταδιακή αύξηση των ελευθέρων ριζών μετά την 4^η ημέρα.

Τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα οι ελεύθερες ρίζες συχνά όχι μόνο εμπλέκονται στην πυροδότηση της απόπτωσης (Kroemer et al. 1997) αλλά μπορούν επίσης να παίξουν (σε λογικές συγκεντρώσεις) έναν σημαντικό ρόλο, σα ρυθμιστές, στη μεταγωγή σημάτων κατά τη κυτταρική διαίρεση (Droge 2002; Guo et al. 2003).

Οι Burdon et al. 1993 (Burdon et al. 1993) πρότειναν ότι ο θάνατος των κυττάρων BHK-21, καλλιεργούμενα σε μικρό πληθυσμό, μπορεί να οφείλεται στην ασθενή παρουσία «οξειδωτικού σήματος ζωής»! Συνέχισαν λέγοντας ότι η ικανότητα αυτών των οξειδωτικών παραγόντων, υπεύθυνων για την διαμόρφωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων, θα μπορούσε να παρέχει ένα είδος αυστηρού ελέγχου που θα μπορούσε να καθορίσει τη γενικότερη αποτελεσματικότητα της μεταγωγής σημάτων κατά την ανάπτυξη διαφορετικών τύπων κυττάρων. Βέβαια, το αντάλλαγμα είναι ο κίνδυνος της οξειδωτικής ζημιάς η οποία και μπορεί να προκληθεί στα κύτταρα αν υπάρξει υπερβολική παραγωγή. Οι Li et al. (1997) αναφέρθηκαν στις μιτωτικές ιδιότητες του O_2^- στα αγγειακά μυϊκά κύτταρα (Li et al. 1997). Επίσης τα μετασχηματισμένα 3T3 κύτταρα τα οποία παρήγαγαν παρεμποδισμένη οξειδάση *Mox1*, αύξησαν σημαντικά το ρυθμό πολλαπλασιασμού (Suh et al. 1999). Στα φυτικά κύτταρα έχει αναφερθεί ότι το H_2O_2 λειτουργεί σαν μεσάζων για την ενεργοποίηση της γουανυλυλ-κυκλάσης και της φωσφολιπάσης D (Neill et al. 2002). Τέλος, η ρύθμιση της ανάπτυξης των ριζών έχει αποδοθεί τόσο στο O_2^- όσο και στο H_2O_2 (Very and Davies 2000; Rodriguez et al. 2002; Carol et al. 2005). Μελετώντας τις *rhd2* μεταλλάξεις του *Arabidopsis thaliana*, με προβληματική της παραγωγή ελευθέρων ριζών, φάνηκε ότι οι ελεύθερες ρίζες απαιτούνται για την εκροή ασβεστίου κατά την επιμήκυνση και επέκταση των κυττάρων (Foreman et al. 2003).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μας παρέχουν επιπρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία των ελευθέρων ριζών σαν ρυθμιστές κυτταρικής ανάπτυξης στα φυτά. Όπως ήδη αναφέρθηκε η δραστηριοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης από τις ελεύθερες ρίζες ίσως γίνεται μέσω της δημιουργίας οξειδωτικών προϊόντων όπως είναι η απελευθέρωση μικρών συγκεντρώσεων κυτοχρώματος C. Προκειμένου να αποδειχτεί αυτή η υπόθεση πρέπει να ξεκαθαριστεί η φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ κυτταρικής διαίρεσης, οξειδοαναγωγικής κατάστασης και μιτοχονδριακής λειτουργίας, με την πιθανή συμμετοχή μεταγραφικών παραγόντων (Dempfle and Amabile-Cuevas 1991; Xanthoudakis et al. 1992; Gapper and Dolan 2006).

**Γ3. ΤΡΙΤΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ:
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΣΤΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ IN VITRO
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΖΩΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν ένα φυσιολογικό υποπροϊόν της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και, συγκεκριμένα, της διαφυγής ηλεκτρονίων μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής μεμβράνης σε ποσοστό έως και 25% αυτών που χρησιμοποιούνται για σύνθεση ATP (Maxwell et al. 1999).

Αρκετοί ερευνητές, με πρώτους τους Burdon et al. (1993, 1995) και Pennell and Lamb (1997) έχουν διαπιστώσει ότι τα ελεύθερα ριζικά αποτελούν ένα είδος σημάτων ανάμεσα σε κύτταρα (τουλάχιστον όσον αφορά κύτταρα καλλιεργούμενα *in vitro*) (Burdon et al. 1993; Burdon 1995; Pennell and Lamb 1997). Το γενικό συμπέρασμα των ερευνών τους είναι ότι η παρουσία ελευθέρων ριζών σε μικρές συγκεντρώσεις στο υπόστρωμα καλλιέργειας είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της κυτταροδιαίρεσης ή/και της κυτταρικής διαφοροποίησης *in vitro*, χωρίς να εμφανίζονται αρνητικές (τοξικές) επιδράσεις στα κύτταρα. Η θεωρία αυτή ενισχύεται και από την άρση της θετικής επίδρασης των ελευθέρων ριζών μετά την προσθήκη κάποιου αντιοξειδωτικού (Su et al. 2001; Huh et al. 2006; Moon et al. 2012).

Ειδικότερα όσον αφορά καρκινικές κυτταρικές σειρές, έχει παρατηρηθεί ότι μία αύξηση του επιπέδου των ελευθέρων ριζών, πέραν ενός ορισμένου ελαχίστου ορίου, συχνά οδηγεί σε διακοπή μεν της κυτταροδιαίρεσης, προώθηση δε της κυτταρικής διαφοροποίησης ρυθμίζοντας διάφορα μεταβολικά μονοπάτια (Schwamborn et al. 2004; Lee et al. 2005; Huh et al. 2006; Kemmerling et al. 2007; Valko et al. 2007; Wu et al. 2009; Bocchino et al. 2010; Wang et al. 2011). Ανάλογα φαινόμενα έχουν παρατηρηθεί σε πειράματα σχετικά με καλλιέργεια ακινητοποιημένων νευρικών κυττάρων, όπως προγονικών κυττάρων και αστροκυττάρων (O'Connor et al. 2000) και νευροβλαστώματος (Kintzios et al. 2007).

Οι νευροβλάστες είναι άωρα κύτταρα που υπάρχουν φυσιολογικά στην εμβρυϊκή ζωή. Μετά τη γέννηση υπάρχει φυσιολογικά ένα ποσοστό άωρων νευροβλαστών που ωριμάζουν προοδευτικά και εξαφανίζονται στο τέλος του πρώτου έτους της ζωής. Νευροβλάστωμα είναι η άθροιση άωρων νευροβλαστών και η ανεξέλεγκτη αύξησή τους και αποτελεί τον πιο συχνό εξωκρανικό όγκο της παιδικής ηλικίας (Hildebrandt and Traunecker 2005). Σε καλλιέργεια οι

νευροβλάστες πολλαπλασιάζονται εξαιρετικά εύκολα και γρήγορα. Τα κύτταρα νευροβλαστώματος N2α έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές έρευνες με σκοπό τη μελέτη της νευρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης, η οποία και έχει επιτευχθεί με τη χρήση διαφόρων παραγόντων (Flaskos et al. 1998; Mackler et al. 2003; Shinjyo and Kita 2007).

Η συσχέτιση της συγκέντρωσης του O_2^- με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης αποτελεί μία ιδιαίτερη πρόκληση, καθώς η μέτρηση του σε βιολογικά συστήματα είναι ένα αναλυτικό πρόβλημα. Οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις του O_2^- είναι της τάξης των 10^{-10} M (Cadenas and Davies 2000), οπότε η ανάγκη για μία αρκετά ευαίσθητη ανίχνευση O_2^- της τάξης των picomoles, είναι μεγάλη. Επίσης είναι επιθυμητό η μέτρηση του O_2^- να γίνεται με έναν γρήγορο και μη επεμβατικό τρόπο, έτσι ώστε να αντικατροπίζονται οι πραγματικές κυτταρικές διαδικασίες με τον καλύτερο επιθυμητό τρόπο.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, ο σκοπός του πειράματος που περιγράφεται στην παρούσα ενότητα ήταν η μελέτη και αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς για τον προσδιορισμό O_2^- , σε ένα γνωστό μοντέλο πολύπλοκου κυτταρικού συστήματος *in vitro* όπως είναι η κυτταρική διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων (νευροβλαστόμα N2α), υπό την επίδραση παραγόντων διαφοροποίησης.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σήμανση διαφοροποιημένων N2α κυττάρων

Προκειμένου να σημανθούν τα διαφοροποιημένα κύτταρα N2α εφαρμόστηκε η μέθοδος της χρώσης με coomassie brilliant blue (Flaskos et al. 1998). Έτσι τοποθετήθηκαν 100.000 κύτταρα ανά πηγάδι δίσκου καλλιέργειας (έξι πηγαδιών) και την επόμενη μέρα εφαρμόστηκαν οι χειρισμοί 10 μM φορσκολίνη και 0.3 mM db-cAMP, χωρίς ορό εμβρύου μόσχου με στόχο την πρόκληση διαφοροποίησης στα κύτταρα. Μετά από 48 ώρες καλλιέργειας εφαρμόστηκε η τεχνική. Ένα κύτταρο θεωρείται διαφοροποιημένο όταν έχει αναπτύξει άξονες μεγαλύτερους κατά 1,5 φορά το σώμα του.

Τα **διαλύματα** που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται παρακάτω:

1. Διάλυμα μονιμοποίησης:

- 90% (v/v) μεθανόλη
- 10% PBS

2. Διάλυμα χρωστικής:

- 1.25% (w/v) coomasie brilliant blue R-250
- 40% (v/v) μεθανόλη
- 20% (v/v) οξικό οξύ

➤ **Διαδικασία**

- Απομάκρυνση του υλικού καλλιέργειας
- Προσθήκη 2 σταγόνων διαλύματος μονιμοποίησης και τοποθέτηση για 20 min στους -20°C
- Απομάκρυνση του διαλύματος καθήλωσης και προσθήκη 2 σταγόνων διαλύματος χρωστικής
- Απομάκρυνση του διαλύματος χρωστικής και πλύσιμο με PBS
- Τέλος προστίθενται μερικές σταγόνες PBS και γίνεται παρατήρηση και φωτογράφιση στο ανάστροφο μικροσκόπιο MBL 3200 KRUSS Γερμανίας.

2.2 Κυτταρομετρία ροής

Η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής εφαρμόστηκε στην περίπτωση της μελέτης των ελευθέρων ριζών και του μιτοχονδριακού O_2^- κατά την πρώτη και δεύτερη ημέρα της διαφοροποίησης χρησιμοποιώντας τις χρωστικές H_2DCFDA και MitoSOX (Invitrogen), αντίστοιχα. Έτσι 50.000 κύτταρα τοποθετήθηκαν ανά πηγάδι δίσκου καλλιέργειας (12 πηγαδιών), και την επόμενη ημέρα εφαρμόστηκαν οι χειρισμοί 10 μM φορσκολίνη και 0,3 mM db-cAMP. Μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας έγιναν οι αναλύσεις στο μηχάνημα FACSCalibur II (BD Biosciences).

Τα **διαλύματα** που χρησιμοποιήθηκαν για τις συγκεκριμένες μετρήσεις:

1. 10 mM H_2DCFDA (Invitrogen) σε DMSO
2. 5 mM MitoSOX (Invitrogen) σε DMSO
3. PBS
4. Θρεπτικό υλικό

➤ Διαδικασία

- Αφαίρεση υλικού καλλιέργειας
- Προσθήκη χρωστικών στα κύτταρα: 10 μM H_2DCFDA , 5 μM MitoSOX, τελικές συγκεντρώσεις σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας. Να σημειωθεί ότι η κάθε χρωστική εφαρμόστηκε σε διαφορετικά πηγάδια
- Επώαση 45 min για τη χρωστική H_2DCFDA και 30 min για τη χρωστική MitoSOX, στους 37°C
- Ξέπλυμα δύο φορές με PBS
- Αποκόλληση των κυττάρων από τα πηγάδια με 250 μL PBS
- Μέτρηση στα παρακάτω μήκη διέγερσης και εκπομπής ανάλογα με την κάθε χρωστική:
 - H_2DCFDA : $\lambda_{\text{διέγερσης}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{εκπομπής}} = 526 \text{ nm}$
 - MitoSOX: $\lambda_{\text{διέγερσης}} = 492 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{εκπομπής}} = 520 \text{ nm}$

Από το κάθε δείγμα μετρήθηκαν 20.000 κύτταρα και για τα τελικά αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος έντασης φθορισμού χρησιμοποιώντας το σχετικό πρόγραμμα ανάλυσης FlowJo (<http://www.flowjo.com/index.php>).

2.3 Μέτρηση O_2^- με κυτταρικό βιοαισθητήρα BERA 6^{ης} γενιάς

Ο υπολογισμός του O_2^- , κατά την *in vitro* διαφοροποίηση των N2α κυττάρων νευροβλαστώματος με την εφαρμογή φορσκολίνης και db-cAMP, έγινε με την χρήση κυτταρικού βιοαισθητήρα BERA 6^{ης} γενιάς. Μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας εμβαπτίστηκαν τα ηλεκτρόδια με τον βιοαισθητήρα και έγινε καταγραφή της διαφοράς δυναμικού όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.8 Της πρώτης πειραματικής ενότητας.

2.4 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας one-way ANOVA με *post hoc* ανάλυση Newman-Keuls για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω του προγράμματος GraphPad Prism version 4.00 (www.graphpad.com). Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά όταν $p < 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Διαφοροποίηση N2α κυττάρων με Φορσκολίνη και db-cAMP

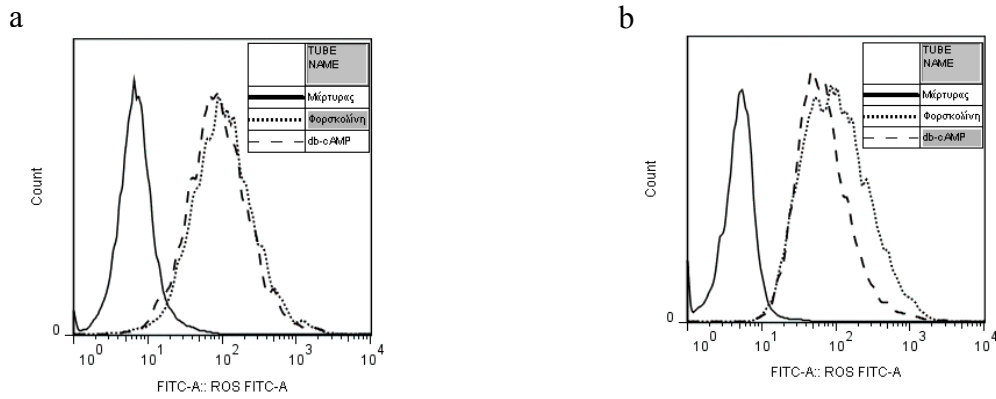
Όπως φαίνεται στην εικόνα 7, η φορσκολίνη και το db-cAMP διαφοροποιούν τα κύτταρα νευροβλαστώματος N2α μετά από 48 ώρες καλλιέργειας. Το ποσοστό διαφοροποίησης αγγίζει το 50-55% (κοινές πειραματικές μετρήσεις με Διδακτορική Διατριβή Teresa Valero).



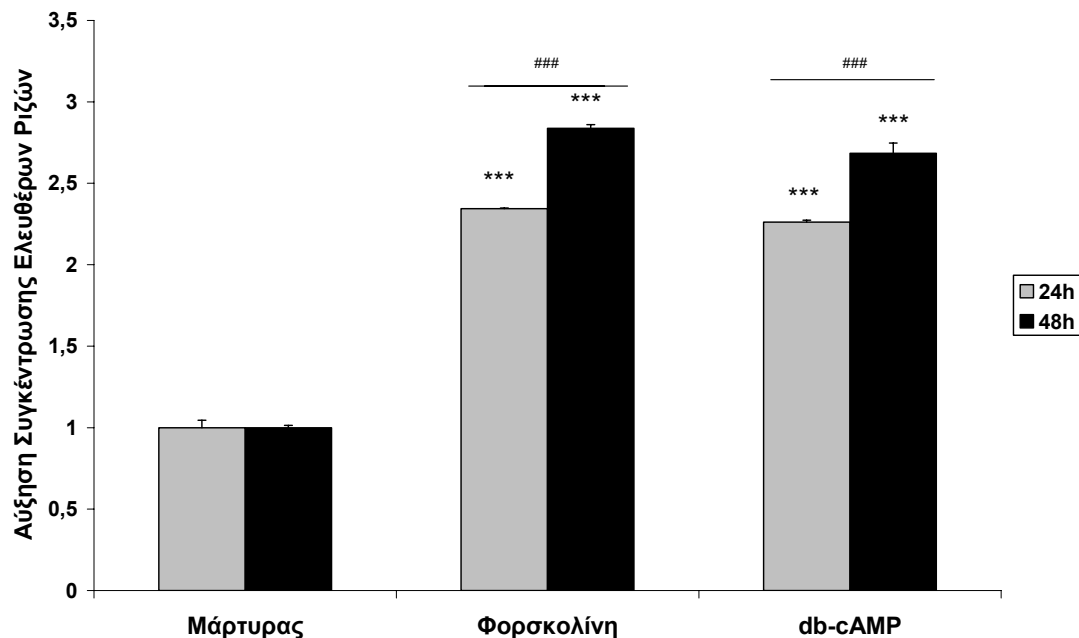
Εικόνα 7: Σημασμένα κύτταρα N2α με τη χρωστική coomassie brilliant blue, μετά από 48 ώρες καλλιέργειας, με 10 μ M φορσκολίνη και 0.3 mM db-cAMP. Η διαφοροποίηση χαρακτηρίζεται από τον αυξημένο αριθμό των αξονικών προεκβολών (κοινές πειραματικές μετρήσεις με Διδακτορική Διατριβή Teresa Valero).

3.2 Μέτρηση επιπέδων ελεύθερων ριζών με κυτταρομετρία ροής στα διαφοροποιημένα κύτταρα

Οι ελεύθερες ρίζες στα διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσίασαν μια ανοδική πορεία κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες (εικόνα 6). Η διαφορά από τον μάρτυρα και για τους δύο χειρισμούς ήταν στατιστικά σημαντική, αλλά επίσης σημαντική ήταν η αύξηση από τη μία ημέρα στην άλλη. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής είναι σχετικές μονάδες φθορισμού σε λογαριθμική κλίμακα και αφού μετατράπηκαν σε γραμμική κλίμακα, υπολογίζοντας τον λογάριθμο του φθορισμού, εκφράστηκαν κανονικοποιώντας ως προς το μάρτυρα (διάγραμμα 19).



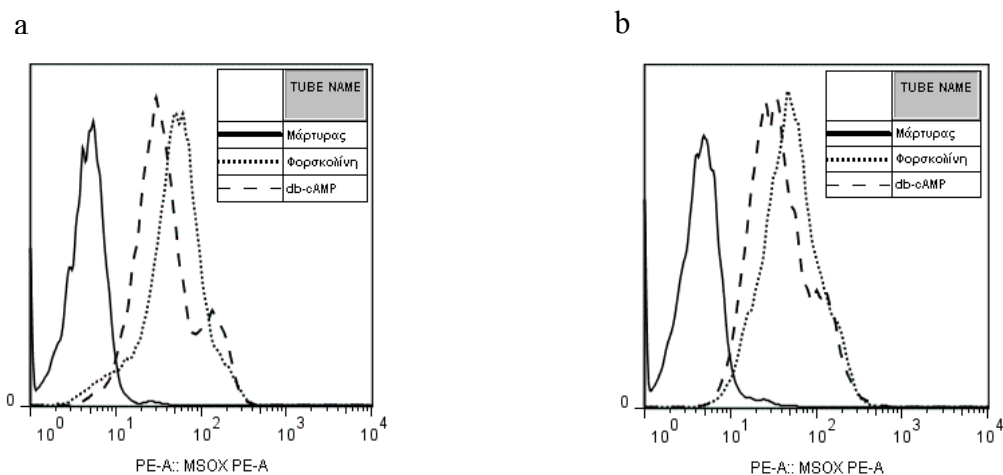
Εικόνα 6: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες φθορισμού της χρωστικής H_2DCFDA σε διαφοροποιημένα και μη κύτταρα στις 24 (a) και 48 (b) ώρες, όπως φαίνονται κατά τη μέτρηση χρησιμοποιώντας το κυτταρόμετρο ροής (κοινές πειραματικές μετρήσεις με Διδακτορική Διατριβή Teresa Valero).



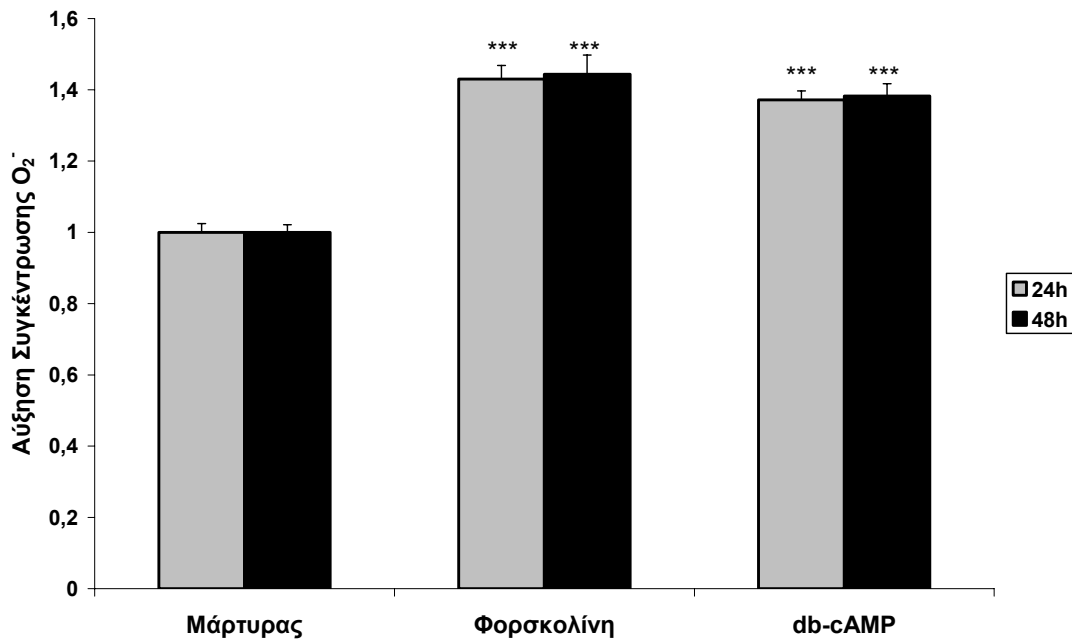
Διάγραμμα 19: Συγκέντρωση ελευθέρων ριζών κυττάρων N2a μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας, με 10 μM φορσκολίνη και 0.3 mM db-cAMP, κανονικοποιώντας ως προς τον μάρτυρα. *** $p < 0.001$, στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα στις 24 και 48 ώρες. ### $p < 0.001$, στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ημερών (κοινές πειραματικές μετρήσεις με Διδακτορική Διατριβή Teresa Valero).

3.3 Μέτρηση επιπέδων μιτοχονδριακού O_2^- με κυτταρομετρία ροής στα διαφοροποιημένα κύτταρα

Το μιτοχονδριακό O_2^- αυξήθηκε το ίδιο όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με φορσκολίνη και με db-cAMP κατά τις πρώτες 24 ώρες και έμεινε σταθερή στις 48 ώρες καλλιέργειας (εικόνα 7). Η διαφορά από τον μάρτυρα και για τους δύο χειρισμούς ήταν στατιστικά σημαντική. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής είναι σχετικές μονάδες φθορισμού σε λογαριθμική κλίμακα και αφού μετατράπηκαν σε γραμμική κλίμακα, υπολογίζοντας τον λογάριθμο του φθορισμού, εκφράστηκαν κανονικοποιώντας ως προς το μάρτυρα (διάγραμμα 20).



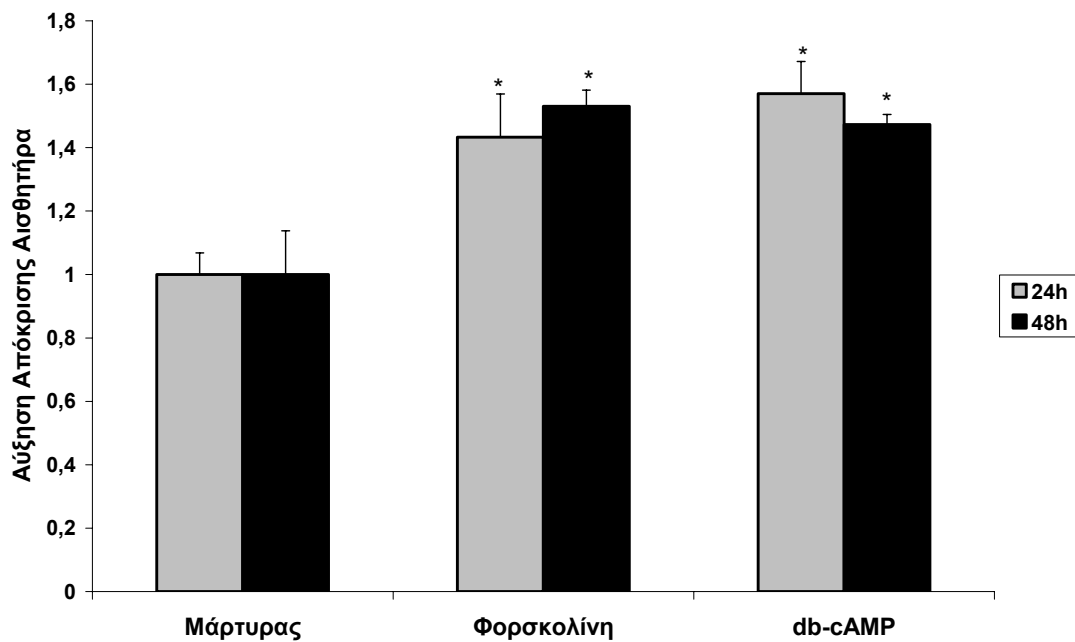
Εικόνα 7: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες φθορισμού της χρωστικής MitoSOX σε διαφοροποιημένα και μη κύτταρα στις 24 (a) και 48 (b) ώρες, όπως φαίνονται κατά τη μέτρηση χρησιμοποιώντας το κυτταρόμετρο ροής (κοινές πειραματικές μετρήσεις με Διδακτορική Διατριβή Teresa Valero).



Διάγραμμα 20: Συγκέντρωση μιτοχονδριακού O_2^- κυττάρων N2α μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας, με 10 μ M φορσκολίνη και 0.3 mM db-cAMP, κανονικοποιώντας ως προς τον μάρτυρα. *** $p < 0.001$, στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα στις 24 και 48 ώρες (κοινές πειραματικές μετρήσεις με Διδακτορική Διατριβή Teresa Valero).

3.4 Μέτρηση επιπέδων O_2^- με βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε αν ο βιοαισθητήρας BERA 6^{ns} γενιάς είναι ικανός να μετρήσει τις διαφορές της συγκέντρωσης του O_2^- στα διαφοροποιημένα κύτταρα N2α, πραγματοποιήθηκαν παράλληλα πειράματα με εκείνα της κυτταρομετρίας ροής και συγκρίθηκαν. Η άμεση μέτρηση του O_2^- με τον βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των N2α κυττάρων με φορσκολίνη και db-cAMP έδειξε αύξηση του κατά τη διάρκεια των 24 και 48 ωρών και για τις δύο ουσίες (διάγραμμα 21). Η διαφορά σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα ήταν στατιστικά σημαντική. Για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα του βιοαισθητήρα με εκείνα της κυτταρομετρίας ροής, εκφράστηκαν κανονικοποιώντας την απόκριση του αισθητήρα ως προς την απόκριση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων.



Διάγραμμα 21: Απόκριση κυττάρων N2α στο O_2^- , κανονικοποιώντας ως προς τον μάρτυρα, μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας, με 10 μ M φορσκολίνη και 0.3 mM db-cAMP. * $p < 0.05$, στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα στις 24 και 48 ώρες.

3.5 Συσχέτιση των μετρούμενων παραμέτρων κατά την κυτταροδιαίρεση των κυττάρων N2α

Από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το MS Excel φάνηκε η θετική υψηλή συσχέτιση των αποτελεσμάτων του βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς για την ανίχνευση O_2^- με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής για την μέτρηση του μιτοχονδριακού O_2^- . Ο συντελεστής συσχέτισης στις 24 ώρες ήταν ελαφρώς πιο χαμηλός ($r^2 = 0.93$) από εκείνον των 48 ωρών ($r^2 = 0.999$) μεταξύ του βιοαισθητήρα και της κλασικής μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής.

<i>24 h</i>	ROS	O₂⁻ Κυττ.Ροής	O₂⁻ Βιοαισθητήρα
ROS	1		
O₂⁻ Κυττ.Ροής	0,997548	1	
O₂⁻ Βιοαισθητήρα	0,958789	0,936552538	1
<i>48 h</i>	ROS	O₂⁻ Κυττ.Ροής	O₂⁻ Βιοαισθητήρα
ROS	1		
O₂⁻ Κυττ.Ροής	0,99866	1	
O₂⁻ Βιοαισθητήρα	0,99972	0,999602327	1

Πίνακας 6: Πίνακας συσχέτισης των μετρούμενων παραμέτρων κατά την κυτταροδιαίρεση των κυττάρων N2α

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πρώτο τμήμα από το τελευταίο σκέλος της παρούσας διδακτορικής μελέτης αφορούσε πάλι τη εφαρμογή και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς για την μέτρηση O_2^- σε ζωικά κύτταρα, δηλαδή σε πιο πολύπλοκα συστήματα, όπως είναι η νευρική διαφοροποίηση, συγκρίνοντας τον με κλασσικές μεθόδους. Στηριζόμενοι στη διδακτορική διατριβή της Teresa Valero και σε άλλες μελέτες στις οποίες έχει αποδεικτεί ότι το O_2^- μαζί με άλλες ελεύθερες ρίζες σχετίζονται με την νευρική διαφοροποίηση σε αρκετά *in vitro* μοντέλα (Schwamborn et al. 2004; Kemmerling et al. 2007; Wu et al. 2009; Vieira et al. 2011; Wang et al. 2011; Διδ. Διατριβή Valero). Κύτταρα νευροβλαστώματος N2a διαφοροποιήθηκαν με διάφορους παράγοντες όπως ήταν NGF, ρετινοϊκό οξύ, φορσκολίνη και db-cAMP και τελικά επιλέχθηκαν η φορσκολίνη και το db-cAMP ως οι δύο καλύτερες ουσίες για τη διαφοροποίησή τους. Το ποσοστό διαφοροποίησης άγγιξε και στις δύο περιπτώσεις το 50-55% (Διδ. Διατριβή Valero). Τα κύτταρα νευροβλαστώματος N2a διαφοροποιήθηκαν μέσα σε 48 ώρες και σε αυτό το διάστημα παρατηρήθηκε αύξηση των ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα του O_2^- (Διδ. Διατριβή Valero), γεγονός που επίσης καταγράφηκε και από τον βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας για το μιτοχονδριακό O_2^- και του βιοαισθητήρα γενικά για το O_2^- , έδειξαν πλήρη συμφωνία.

Ο βιοαισθητήρας μετράει το O_2^- που φτάνει ως τα ακινητοποιημένα κύτταρα μετά την αλληλεπίδραση του με την ηλεκτροεισαχθείσα SOD στις κυτταρικές μεμβράνες. Με την κυτταρομετρία ροής μετράμε το μιτοχονδριακό O_2^- . Πώς γίνεται να φτάνει το O_2^- από το μιτοχόνδριο στον αισθητήρα όντας ένα βραχύβιο μόριο?

Το O_2^- ως γνωστόν παράγεται στη μήτρα των μιτοχονδρίων από τα σύμπλοκα I και III (Raha and Robinson 2000) της αναπνευστικής αλυσίδας και δεν είναι περατό από τις μεμβράνες όπως είναι το H_2O_2 (Kinnula and Crapo 2003). Όμως υπάρχουν μηχανισμοί διάχυσης του O_2^- όπως είναι η πρωτονίωση του O_2^- για να μετατραπεί σε HO_2^{\cdot} , το οποίο είναι πιο ουδέτερο μόριο και περατό από τις μεμβράνες με αποτέλεσμα μετά τη διάχυσή του να ξανασυνθέτει O_2^- εξωκυτταρικά (Haines 1983;

Liu 1999; De Grey 2002; Zuo et al. 2003). Άλλος μηχανισμός είναι είναι οι ουμπισεμικινόνες (εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη), οι οποίες με την αυτοξειδώσή τους απελευθερώνουν O_2^- στον ενδομεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου και έπειτα ιοντικά κανάλια (voltage-dependent anion channels, VDAC) μεταφέρουν το O_2^- από τον ενδομεμβρανικό χώρο στο κυτόπλασμα (Schultz et al. 1996; Han et al. 2003; Zuo et al. 2003). Έχει αποδειχτεί σε ερυθροκύτταρα ο ρόλος των ιοντικών καναλιών στην απελευθέρωση του O_2^- από ενδοκυτταρικές πηγές, τα οποία είναι πολυεπεπίδια (Lynch and Fridovich 1978) και πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά του μιτοχονδριακού O_2^- . Έχουν βρεθεί τόσο στην εσωτερική όσο και στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Vanden Hoek et al. 1998; Han et al. 2003). Βέβαια το O_2^- παράγεται και εξωκυτταρικά από την δράση του ενζύμου NADPH οξειδάση, η οποία βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη και παράγει O_2^- μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADPH στο κύτταρο μέσω της μεμβράνης χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται και στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων παράγοντας O_2^- στον ενδομεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων.

Εώς σήμερα έχουν γίνει προσπάθειες για την *in vitro* καταγραφή της παραγωγής O_2^- σε απομωνομένα μιτοχόνδρια είτε ηλεκτροχημικά βασιζόμενος στην αναγωγή του κυτοχρώματος C (Henderson et al. 2009), είτε οπτικά χρησιμοποιώντας τον φθορισμομετρικό δείκτη δι-υδρο-αιθυδίνης (DHE) και τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (Degli Esposti 2002). Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί ηλεκτροχημικοί αισθητήρες για την *in vitro* καταγραφή της παραγωγής O_2^- σε κύτταρα και ιστούς (Manning et al. 1998; Read et al. 1999; Campanella et al. 2000; Endo et al. 2002; Chang et al. 2005; Aitken et al. 2007) και οπτικοί με τη χρήση δι-υδρο-ροδαμίνη (DHR) (Henderson and Chappell 1993). Εώς τώρα όλοι οι αισθητήρες ανιχνεύουν εμμέσως το O_2^- και δεν αναφέρονται σαν ιδιαίτερα ευαίσθητοι, καθώς δεν αναφέρονται σε όρια ανίχνευσης, εξαίρεση αποτελεί ο ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας για ανίχνευση O_2^- σε καρκινικά κύτταρα, με όριο ανίχνευσης 2.4 nM (Li et al. 2011) όπου και πάλι το όριο ανίχνευσης δεν πλησιάζει αυτό του κυτταρικού μας βιοαισθητήρα (1 pM).

Το πλεονέκτημα της μεθόδου ανίχνευσης του O_2^- με τον κυτταρικό βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς είναι το γεγονός ότι της άμεσης μέτρησης του *in vitro*

και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος. Επίσης θεωρούμε ότι είναι μια γρήγορη και μη επεμβατική μέθοδος καθώς δεν χρειάζεται ούτε ο χρόνος προετοιμασίας δείγματος αλλά ούτε «αναστάτωνουμε» τα κύτταρα, σημαίνοντάς τα με κάποια χρωστική ή αποκολλώντας τα από το δοχείο καλλιέργειας, ώστε η ανίχνευση να γίνει χρησιμοποιώντας μια άλλη συσκευή, όπως είναι το κυτταρόμετρο ροής. Όπως έχει αποδεικτεί πολλές φορές οι φθορίζουσες χρωστικές μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις μετρούμενες παραμέτρους και να επηρεάσουν τα αποτελέσματα (Dixit and Cyr 2003), πράγμα που δεν συμβαίνει με τον βιοαισθητήρα μας.

Γ4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

Άλλο ένα πολύπλοκο σύστημα που θελήσαμε να δοκιμάσουμε τον κυτταρικό βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς για O₂ είναι το αίμα με σκοπό την εφαρμογή του και στον τομέα της κλινικής ιατρικής. Εν συντομία το αίμα αποτελείται από τέσσερα κύρια συστατικά :

- **ερυθρά αιμοσφαίρια**, τα οποία αποτελούν το 38-48% του αίματος. Ο ρόλος τους είναι να μεταφέρουν O₂ από τους πνεύμονες στους περιφερικούς ιστούς και τα όργανα του σώματος. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια παράγουν την αιμοσφαιρίνη, μεταλλοπρωτεΐνη με σίδηρο στην οποία εγκλωβίζεται το οξυγόνο για να το μεταφέρουν από τους πνεύμονες και το μεταφέρει στους ιστούς και τα όργανα του σώματος. Ο αριθμός των κυκλοφορούντων ερυθρών ρυθμίζεται από την απαιτούμενη μεταφορά ποσότητα O₂ και από το ρυθμό παραγωγής ερυθροκυττάρων που εξαρτάται από ρυθμό απομάκρυνσης από τα φαγοκύτταρα.
- **λευκά αιμοσφαίρια**, έχουν αμυντικό ρόλο και με τη λειτουργία φαγοκυττάρωσης συμμετέχουν στην απομάκρυνση νεκρωμένων ή κατεστραμμένων ιστών. Παράγονται στον μυελό οστών μεταφέρονται με το αίμα στις κύριες θέσεις λειτουργίας τους. Υπάρχουν πέντε τύποι:
 - **ουδετερόφιλα** 40 - 75 %, είναι υπεύθυνα για φαγοκύττωση.
 - **ηωσινόφιλα** 5 %.
 - **βασίφιλα** 0,5 %.
 - **λεμφοκύτταρα** 20 - 50 %, παράγουν τα αντισώματα για αυτό και στις λοιμώξεις αυξάνεται ο αριθμός τους. Υπάρχουν δύο τύποι Β και Τ – λεμφοκύτταρα.
 - **μονοκύτταρα** 1 - 5 %.
- **αιμοπετάλια**, αποτελούν άμυνα σε αγγεία με βλάβη, διότι προσκολλώνται σε σημεία διακοπής και συμμετέχουν στη πήξη του αίματος.
- **πλάσμα** αποτελεί το 55% και αποτελείται κατά 90% από νερό. Είναι πρωτεϊνικό διάλυμα που μεταφέρει στις διάφορες περιοχές του οργανισμού θρεπτικά συστατικά, μεταβολίτες, ορμόνες, βιταμίνες και άλλα μόρια. (Moini 2005; Sherwood 2010).

Η αύξηση των ελευθέρων ριζών εμπλέκεται σε περισσότερες από 100 παθολογικές περιπτώσεις (Favier et al. 1995). Η εκτίμησή των ελευθέρων ριζών *in vivo* είναι πρόκληση λόγω της βραχύβιας φύσης τους.

Οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι εκείνες που εξετάζουν τις χημικές αλλαγές όταν ελεύθερες ρίζες προκληθούν από την αλληλεπίδραση με λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA, καθώς εκτιμούνται τα τελικά προϊόντα της λιπιδιακής οξείδωσης, καρβονύλια πρωτεϊνών και 8-υδροξυ-γουανίνη, αντιστοίχως. Μια άλλη στρατηγική για την *in vivo* καταγραφή των ελευθέρων ριζών είναι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής άμυνας στο πλάσμα αίματος, ερυθρά αιμοσφαίρια και ιστούς. Ένα παράδειγμα είναι η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη), η οποία προστατεύει τα μεμβρανικά λιπίδια από οξειδωτική ζημιά. Οι προσπάθειες που γίνονται για την άμεση ανίχνευση του σχηματισμού ελευθέρων ριζών σε βιολογικά δείγματα, όπως είναι το αίμα ή το πλάσμα, χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως είναι αρωματική υδροξυλίωση και η μέθοδος συντονισμού του spin των ηλεκτρονίων (ESR), σαν μέθοδοι παγίδευσης. Στην ESR χρησιμοποιούνται κάποιοι παράγοντες οι οποίοι αυξάνουν τη διάρκεια των ελευθέρων ριζών και τα κάνουν πιο σταθερά ώστε να μπορούν να ανιχνευτούν και να ποσοτικοποιηθούν. Αυτοί οι παράγοντες δεν μπορούν να δωθούν στους ασθενείς, για αυτό κατά την αιμοληψία υπάρχουν μέσα στις σύριγγες έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί *ex vivo* αντίδραση (Favier et al. 1995).

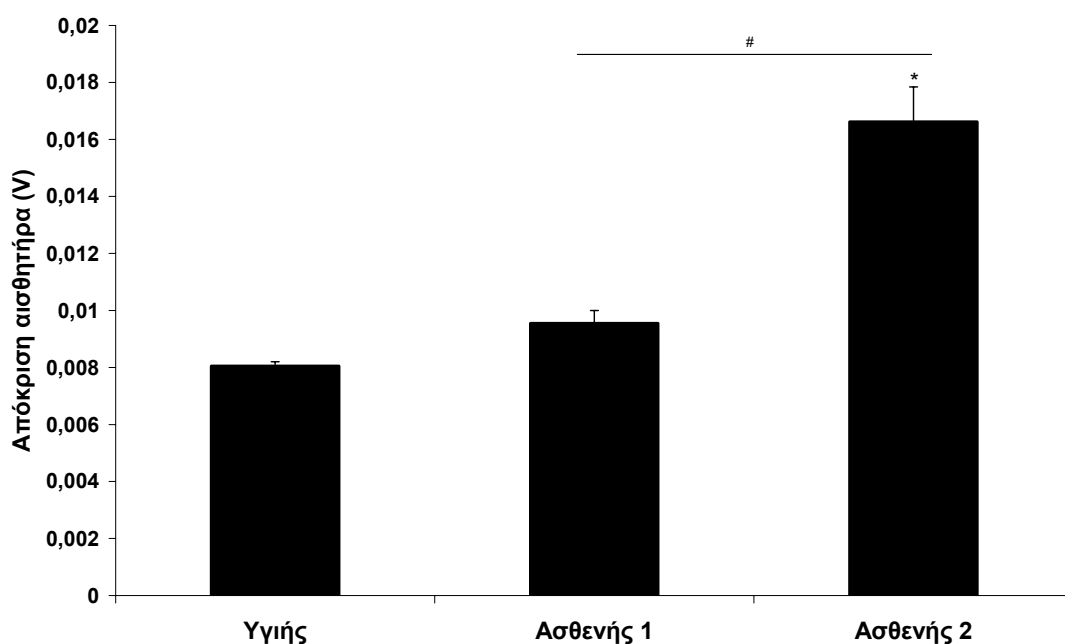
Πολλές ασθένειες συσχετίζονται με την NADPH οξειδάση, η οποία είναι ένα ενζυμικό σύμπλοκο προσδεδεμένο στην κυτταρική μεμβράνη και παράγει O_2^- μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADPH στο κύτταρο μέσω της μεμβράνης χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο. Αποτελείται από μεμβρανικώς συνδεδεμένη υπομονάδα κυτόχρωμα b558 (gp91^{phox} και p22^{phox}) και αρκετές κυταροπλασματικές πρωτεΐνες (p47^{phox}, p67^{phox} και p40^{phox}) και Rac G-πρωτεΐνη, οι οποίες μεταφέρονται στην μεμβράνη για την ενεργοποίηση της (Babior 2004; Sun et al. 2010). Η NADPH οξειδάση ενεργοποιείται όταν οι κυταροπλασματικές υπομονάδες είναι φωσφορυλιωμένες και η Rac είναι ενεργοποιημένη στο κυτταρόπλασμα και την τελική τους απόθεση στη μεμβράνη για την τελική ενεργοποίηση του ενζύμου (Block 2008). Η NADPH οξειδάση αρχικά ανακαλύφθηκε στα ουδετερόφιλα τα οποία κατά τη φαγοκύτωση παράγουν μεγάλες ποσότητες O_2^- που μπορεί να φτάσει και τα mmoles (Babior et al. 2002; Li and Shah 2003).

Η NADPH οξειδάση είναι ένα από τα κύρια ένζυμα που εμπλέκονται στην αρτηριοσκλήρωση. Παρεμποδιστές της NADPH οξειδάσης μπορούν να ελέγχουν την δράση της και έτσι να αντιμετωπιστεί η ασθένεια. Η αρτηριοσκλήρωση προκαλείται όταν συσσωρεύονται μακροφάγα, τα οποία περιέχουν χοληστερόλη, στα τοιχώματα των αρτηριών και η NADPH οξειδάση παράγει ROS. Αυτές οι ROS ενεργοποιούν ένα ένζυμο το οποίο κάνει τα μακροφάγα να προσκολούνται στα τοιχώματα των αρτηριών, πολυμερίζοντας τις ίνες ακτίνης. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι παρεμποδιστές της NADPH οξειδάσης, όπως είναι η αποκυκίνη και αντιοξειδωτικά, όπως είναι η N-ακετυλ-κυστεΐνη και η ρεσβερατρόλη, αποπολυμερίζουν την ακτίνη και έτσι τα μακροφάγα αποκολλώνται από τα τοιχώματα των αρτηριών. Επίσης η NADPH οξειδάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν στόχος για την αντιμετώπιση των ασθενειών Αλτσχάιμερ και Πάρκισον (Anantharam et al. 2007; Block 2008). Αντιθέτως η χρόνια κοκκιωματώδης νόσος οφείλεται στο γεγονός ότι τα ουδετερόφιλα δεν παράγουν την απαραίτητη ποσότητα ελευθέρων ριζών για την καταπολέμηση των παθογόνων (Yamazaki et al. 2011).

Άλλη αιτία παθήσεων οφειλόμενων στις ελεύθερες ρίζες είναι η ανισορροπία στα επίπεδα έκφρασης των διάφορων ισοενζύμων της SOD. Η μείωση της έκφρασης της MnSOD έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου. Η υπερέκφραση της CuZnSOD έχει συσχετιστεί με το σύνδρομο Down, ενώ μεταλλάξεις της οδηγούν στον νευρικό κυτταρικό θάνατο και την αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, η οποία είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια. Στο αγγειακό σύστημα είναι πολύ σημαντική η ισορροπία του O_2^- με το NO. Μείωση της ecSOD προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης O_2^- το οποίο και αντιδρά με το NO και τελικά συσσωρεύεται το υπεροξυνιτρώδες το οποίο εμπλέκεται στις καρδιοαγγειακές παθήσεις. Οπότε σύγχρονες μελέτες χρησιμοποιούν την αποκατάσταση της ισορροπίας της SOD ως θεραπευτική προσέγγιση (Valacchi and Davis 2008).

Σε συνεργασία με το στρατιωτικό νοσοκομείο NIMITS και εφαρμογή του νέου βιοαισθητήρα πραγματοποιήθηκαν ορισμένα πειράματα για την ανίχνευση O_2^- σε αίμα ασθενών βρισκόμενοι σε μετεγχειρητικό στάδιο και υγιών ανθρώπων. Έχει προταθεί ότι το οξειδωτικό στρες πιθανός εμλεκόμενος παράγοντας του μετεγχειρητικού στρες και της σήψης. Έχει αποδεικτεί η ζημιά των ελεύθερων ριζών

κατά το μετεγχειρητικό στρες (Yukioka et al. 1996; Anup et al. 1999). Ο σκοπός ήταν να δούμε πως κυμαίνεται το O_2^- , ιδιαίτερα στους ασθενείς, καθώς αποτελεί έναν πολύ σημαντικό δείκτη οξειδωτικού στρες. Πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και άμεση μέτρηση με τον βιοαισθητήρα χρησιμοποιώντας 100 μ L αίματος. Τα αποτελέσματα, αν και πρώιμα, λόγω του μικρού ακόμα μεγέθους δείγματος, έδειξαν ότι τα επίπεδα του O_2^- ήταν πιο αυξημένα στους (εγχειρισμένους) ασθενείς. Βέβαια, παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ασθενών καθώς ο ασθενής 1 είχε καλύτερη μετεγχειρητική πορεία σε σχέση με τον ασθενή 2 (Διάγραμμα 22). Η μέτρηση του O_2^- μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν έγκαιρος δείκτης της μετεγχειρητικής πορείας και της γενικότερης ανάρρωσης ενός καταπονημένου οργανισμού ακόμα και αρκετές εβδομάδες πριν την εμφάνιση κλινικής συμπτωματολογίας.



Διάγραμμα 22: Απόκριση αισθητήρα στο O_2^- , σε υγιείς και ασθενείς σε μετεγχειρητική κατάσταση. * $p < 0.05$, στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα (υγιές άτομο). # $p < 0.05$, στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ασθενών

Από τις πρώτες προσπάθειες που έγιναν για την ανίχνευση O_2^- σε αίμα ασθενών (πασχόντων από πνευμονία) ήταν με τη φωτομετρική μέθοδο αναγωγής του κυτοχρώματος c, ο οποίος είναι ένας έμμεσος τρόπος ανίχνευσης (Umeki et al. 1987). Η μέθοδος του spin των ηλεκτρονίων (ESR) έχει χρησιμοποιηθεί για *in vivo* μέτρηση O_2^- , αλλά λόγω του μεταβολισμού των ιστών, της έλλειψης ειδικότητας και σταθερότητας των υλικών παγίδευσης spin και του κόστους των φασματοφωτομέτρων κάνει τη μέθοδο δύσχρηστη. Μια οπτική μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί είναι η οξείδωση της δι-υδρο-αιθυδίνης (DHE)(Tarpey et al. 2004; Dai et al. 2006), η οποία είναι περατή από την κυτταρική μεμβράνη, οξειδώνεται από το O_2^- σε αιθύδιο, το οποίο και προσδένεται στο DNA. Όμως δεν οξειδώνεται μόνο από το O_2^- , αλλά και από το κυτόχρωμα c, το H_2O_2 και άλλες ουσίες (Georgiou et al. 2005). Επιλέον άλλη μια οπτική μέθοδος είναι η χημειοφωταύγεια με τη χρήση της λουσιγενίνης ανιχνεύοντας O_2^- σε ιστούς (Zanetti et al. 2005). Έχει αναπτυχθεί ένας ευαίσθητος χημειοφωταυγής αισθητήρας χρησιμοποιώντας μόνο 1 μ L αίματος, και βασίζεται στο σύστημα Διογένης με λουμινόλη (Yamazaki et al. 2011). Εφαρμόστηκε σε πάσχοντες από χρόνια κοκκιωματώδη νόσο. Το μειονέκτημα έναντι του βιοαισθητήρα μας, ο οποίος δεν αλληλεπιδρά με τις μετρούμενες παραμέτρους, είναι ότι πρέπει να σημάνουμε τα κύτταρα, οπότε κατά κάποιον τρόπο επεμβαίνουμε στη φυσιολογία τους και είναι ελαφρώς πιο χρονοβόρα η διαδικασία. Αντιθέτως το πλεονέκτημά του είναι ο πολύ μικρός όγκος δείγματος.

Από την άλλη μεριά η μέτρηση O_2^- σε πραγματικό χρόνο *in vivo* είναι ήδη εφικτή με αμπερομετρικό αισθητήρα που αναπτύχθηκε ανιχνεύοντας O_2^- σε αρουραίους και *in vitro* σε ανθρώπινο αίμα, αλλά το σύστημα πάσχει σε σχέση με το κυτταρικό βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς, καθώς έχει σαν περιορισμό τη συνεχή ροή έτσι ώστε να παραμένει το O_2^- σε επαφή με το ηλεκτρόδιο μέτρησης (Fujita et al. 2009).

Δ. ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μεμβρανική μηχανική είναι μια πρόσφατη προσέγγιση για την κατασκευή κυτταρικών βιοαισθητήρων, με σχεδιασμένη την εκλεκτική απόκριση έναντι διάφορων αναλυτών. Αν, λοιπόν, βασιστούμε στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, μπορούμε να εξάγουμε τα πρώτα συμπεράσματα σχετικά με τις ιδιότητες των ηλεκτροεισαχθέντων μορίων SOD και τις καταλυτικές ιδιότητες του O_2^- στα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα, ως ακολούθως:

1. Σύμφωνα και με προηγούμενη εργασία (Moschoroulou and Kintzios 2006), τα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα δρουν σαν καταλυτικές μονάδες, ικανές να μετατρέψουν το O_2^- σε H_2O_2 . Επιπλέον, τα ηλεκτροεισαχθέντα μόρια της SOD διατηρούν τις χαρακτηριστικές τους ιδιότητες, όπως αποδείχτηκε από την εκλεκτική παρεμπόδιση της SOD. Οπότε εκ των πραγμάτων, η παρούσα εργασία παρέχει για πρώτη φορά σημαντική γνώση για τη λειτουργικότητα των ηλεκτροεισαχθέντων μορίων της SOD.
2. Η μετατροπή του O_2^- προκαλεί αλλαγές στο κυτταρικό μεμβρανικό δυναμικό, όπως αποδείχτηκε από την κατανομή της φθορίζουσας χρωστικής DiSC3(5). Η διαπίστωση αυτή συμφωνεί με προηγούμενες αναφερθείσες μετρήσεις χρησιμοποιώντας κατάλληλα μικροηλεκτρόδια, σύμφωνα με τη μέθοδο βιοηλεκτρικής αναγνώρισης (BERA).
3. Η αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου μετά τη μετατροπή του O_2^- , από τα μεμβρανικώς τροποποιημένα κύτταρα, οφείλεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο συνεισφέρει στην περαιτέρω διευκρίνιση της αρχής λειτουργίας της μοριακής αναγνώρισης μέσω της μεμβρανικής μηχανικής.
4. Οι καταλυτικές ιδιότητες των μεμβρανικώς τροποποιημένων κυττάρων αυξάνουν με την αύξηση των ηλεκτροεισαχθέντων μορίων.
5. Η ευαισθησία του αισθητήρα αυξάνεται εξαρτώμενη από τις συνθήκες ηλεκτροεισαγωγής αλλά αυξάνοντας και τον αριθμό των ακινητοποιημένων

κυττάρων. Η ευαισθησία έναντι του O_2^- έφτασε το 1 pM, 100 φορές πιο κάτω από την προηγούμενη εργασία όπου το όριο ανίχνευσης ήταν 100 pM (Moschoroulou and Kintzios 2006).

Επιπλέον, χρειάζονται να ερευνηθούν και να βελτιωθούν διάφοροι παράμετροι κατά τη διαδικασία της ηλεκτροεισαγωγής. Για παράδειγμα πειράματα ηλεκτροπόρωσης έχουν δείξει ότι η έκθεση των κυττάρων Vero σε ηλεκτρικά πεδία συσχετίζεται με την αύξηση του μεμβρανικού πορώδους, όπως επίσης και μείωση της ζωτικότητας (Bahnsen and Boggs 1990; Baron et al. 2000). Η έκθεση των κυτταρικών μεμβρανών σε ηλεκτρικά πεδία μπορεί να προκαλέσει λιπιδιακή «επαναρρύθμιση» ως αποτέλεσμα της δημιουργίας αγώγιμων μεμβρανικών μονοπατιών, γνωστών ως «υδροφιλικούς» ή «αγώγιμους» πόρους (E Neumann 1982; Pliquett et al. 2007). Ο σχηματισμός των πόρων θα μπορούσε να εξηγήσει την ενσωμάτωση των υδρόφιλων μορίων SOD (η SOD διαλύεται σε υδατικό διάλυμα) στις μεμβράνες των κυττάρων Vero. Κατά την ηλεκτροεισαγωγή ένα ποσοστό των μορίων SOD δεν ενσωματώνεται στις κυτταρικές μεμβράνες αλλά παραμένει στο διάλυμα, όπως αποδείχτηκε με ενζυματικές μεθόδους (Moschoroulou et al. 2006). Επίσης, λογικά υποθέτουμε ότι ένα ποσοστό των μορίων SOD θα μπει στα κύτταρα και ένα άλλο ίσως μικρότερο θα παραμείνει εγκλωβισμένο στις μεμβράνες. Τελικά είναι άγνωστο εάν όλα τα ηλεκτροεισαχθέντα μόρια ενσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη με τον σωστό προσανατολισμό, δηλαδή εάν έχουν το ενεργό τους σημείο στραμμένο προς την εξωτερική πλευρά των κυττάρων. Όλα αυτά τα θέματα αξίζουν περαιτέρω έρευνα, και αρκετά από αυτά βρίσκονται ήδη υπό διερεύνηση στο εργαστήριο μας.

Σε επίπεδο εφαρμογής, μελετήθηκε η πρακτική χρήση του βιοαισθητήρα για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του O_2^- σε διάφορα βιολογικά συστήματα και της συσχέτισης του με συγκεκριμένα βιολογικά φαινόμενα. Με σκοπό τη μετάβαση από ένα απλό σύστημα, όπως είναι η εφαρμογή πρότυπων διαλυμάτων σουπεροξειδίου, σε πιο πολύπλοκα συστήματα, όπως είναι οι φυτικοί και ζωικοί ιστοί.

Όσον αφορά φυτικούς οργανισμούς, ερευνήθηκε η πιθανή σχέση μεταξύ των ελευθέρων ριζών και της δραστηριοποίησης της διαίρεσης των φυλλιδίων του υδρόβιου φυτού *Spirodela polyrrhiza* κατά τη διάρκεια 7ήμερης καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα καταγράφηκε η συγκέντρωση του O_2^- χρησιμοποιώντας τον βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς και παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση των ελευθέρων ριζών και του O_2^- κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ημερών, ενώ η καλλιέργεια των φυλλιδίων βρισκόταν λίγο πριν μπει στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Επιπλέον, αποπτωτικοί δείκτες, όπως η κυτοπλασματική οξειδάση του κυτοχρώματος C, αποπόλωση των μιτοχονδριακών μεμβρανών και δραστηριότητα της κασπάσης-3 είχαν επιβραδυσμένους ρυθμούς ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και τουλάχιστον πριν την ωρίμανση των φυλλιδίων. Θα μπορούσαμε να προτείνουμε ότι η διαίρεση των φυλλιδίων του *S. polyrrhiza* είναι πιθανόν να δραστηριοποιείται από την παρατηρούμενη μείωση των ελευθέρων ριζών και συσχετισμένη αποφυγή κυτταρικών αποπτωτικών μονοπατιών στα καλλιεργούμενα φυτά. Με άλλα λόγια, η κυτταροδιαίρεση στο συγκεκριμένο είδος μπορεί να λειτουργεί και σαν ένας τρόπος αποφυγής συσσώρευσης κυτταρικών βλαβών, σύμφωνα με όσα αναλύονται στη συνέχεια.

Ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου στα φυτά είναι ένα πεδίο στο οποίο απαιτείται πολλή έρευνα και ήδη ένας μεγάλος αριθμός κυκλινών έχουν κλωνοποιηθεί από διάφορα είδη όπως είναι το καρότο, η σόγια, η μηδική και το *Arabidopsis* (Doerner 1994; Riou-Khamlichi et al. 1999; Inze and De Veylder 2006). Οι Toussaint et al. (1991) ανέπτυξαν τη θεωρία της «λανθασμένης καταστροφής» κατά την γήρανση, προτείνοντας ότι η κυτταρική διαίρεση είναι το θεμελιώδες όπλο του κυττάρου εναντίον της αναπόφευκτης αύξησης των λαθών, τα οποία μπορούν να συσσωρευτούν και να προκαλέσουν αύξηση της εσωτερικής εντροπίας και μείωση της παραγωγής ATP (Toussaint et al. 1991). Αυτοί οι λανθασμένοι παράγοντες θα μπορούσαν να συμπεριλαμβάνουν, πέρα από άλλους υποψήφιους, τις ελεύθερες ρίζες, όπως είναι το O_2^- , το οξυγόνο στην πρώτη κατάσταση διεγερσης απλότητας (1O_2), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και τη ρίζα του υδροξυλίου ($OH\cdot$) (Harman 1956; Harman 1972). Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από τα μιτοχόνδρια, τους χλωροπλάστες και τα υπεροξεισώματα σαν υποπροϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και θεωρούνται τοξικά λόγω της

ικανότητάς τους να προκαλούν την έναρξη εκείνων των αντιδράσεων που θα προκαλέσουν πρωτεϊνική και νουκλεοτιδική ζημιά, λιπιδιακή οξειδωση και τελικά τον θάνατο (Green and Reed 1998; Kranner et al. 2002). Επίσης ένας μεγάλος αριθμός δεδομένων δείχνει ότι οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται στην ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης του φυτού (Rodriguez et al. 2002; Carol et al. 2005; Gapper and Dolan 2006) και ότι αυτή η λειτουργία έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση καναλιών ασβεστίου στην κυτταρική μεμβράνη (Very and Davies 2000; Foreman et al. 2003). Ωστόσο η ακριβής μέτρηση της συσσώρευσης ελευθέρων ριζών, ιδιαίτερα του O_2^- , είναι εξαιρετικά δυσχερής. Επομένως η ανάπτυξη του καινοτόμου βιοαισθητήρα ανοίγει νέες μεθοδολογικές προοπτικές προς αυτή την κατεύθυνση.

Εώς σήμερα οι βιοαισθητήρες BERA είχαν χρησιμοποιηθεί κυρίως για εφαρμογές στη Γεωπονία, όπως είναι η ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε φρούτα, λαχανικά και γενικότερα σε διάφορα γεωργικά προϊόντα, για ανίχνευση φυτικών και ζωικών ιών. Όμως η μελέτη φαινομένων σε κύτταρα θηλαστικών, χρησιμοποιώντας αυτούς τους βιοαισθητήρες ποτέ δεν είχε μελετηθεί. Για αυτό και βασιζόμενοι στη διδακτορική διατριβή της Teresa Valero, σε νευρικά κύτταρα και πιο συγκεκριμένα κύτταρα νευροβλαστώματος N2a μας φάνηκε ενδιαφέρουσα η επιβεβαίωση της ικανότητας του βιοαισθητήρα BERA 6^{ης} γενιάς, για την ανίχνευση O_2^- σε αυτό το μοντέλο. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι τα κύτταρα νευροβλαστώματος N2a διαφοροποιούνται με διάφορους χημικούς παράγοντες όπως είναι το α-λιποϊκό οξύ, το db-cAMP, η φορσκολίνη, το ρετινοϊκό οξύ (Mackler et al. 2003; Shinjyo and Kita 2007; Radio and Mundy 2008; Wang et al. 2011). Επίσης είναι γνωστό ότι κατά τη διαφοροποίηση τα κύτταρα παράγουν σε αυξημένο επίπεδο ελεύθερες ρίζες (Schwamborn et al. 2004; Kemmerling et al. 2007; Shinjyo and Kita 2007; Wu et al. 2009; Vieira et al. 2011; Wang et al. 2011). Στη διδακτορική διατριβή της Teresa Valero περιλαμβάνεται η πλήρης μελέτη της κυτταρικής διαφοροποίησης των κυττάρων N2a και του ρόλου των ελευθέρων ριζικών και πιο συγκεκριμένα του O_2^- , παραγόμενου από τα μιτοχόνδρια, σαν μεταγωγί σημάτων για την διαφοροποίηση των νευρώνων.

Σε αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε αύξηση των ελευθέρων ριζών και του μιτοχονδριακού O_2^- κατά τη νευρική διαφοροποίηση (Διδ. Διατριβή Valero). Για

αυτό το λόγο φάνηκε ενδιαφέρον να μελετήσουμε την αποτελεσματικότητα του βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς στην μέτρηση του O₂⁻ σε ένα πολύπλοκο σύστημα όπως είναι τα νευρικά κύτταρα και να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα με κλασικές μεθόδους, όπως είναι η κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα του βιοαισθητήρα αλλά και της κυτταρομετρίας ροής ήταν απόλυτα συνυφασμένα μεταξύ τους. Και οι δύο μέθοδοι έδειξαν αύξηση του O₂⁻ κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, όπως εξάλλου έδειξαν και τα αποτελέσματα των ελευθέρων ριζών με την κυτταρομετρία ροής. Οπότε ο βιοαισθητήρας BERA 6^{ns} γενιάς για την ανίχνευση O₂⁻ φαίνεται αξιόπιστος και το πλεονέκτημά του έναντι της κυτταρομετρίας ροής αλλά και άλλων ηλεκτροχημικών (Manning et al. 1998; Campanella et al. 2000; Endo et al. 2002; Chang et al. 2005; Aitken et al. 2007; Henderson et al. 2009) ή οπτικών αισθητήρων (Henderson and Chappell 1993; Degli Esposti 2002) είναι ότι μπορούμε να καταγράψουμε *in vitro* και σε πραγματικό χρόνο την παραγωγή O₂⁻, χωρίς να επεμβούμε στη φυσιολογία των κυττάρων. Η χρήση του βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς αποτελεί μια γρήγορη, άμεση και ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης O₂⁻.

Επίσης σε συνέχεια της εφαρμογής του βιοαισθητήρα σε πιο πολύπλοκα βιολογικά συστήματα και ενδεχόμενη εφαρμογή του σε προγνωσική μέθοδο στην κλινική ιατρική δοκιμάστηκε σε ασθενείς με μετεγχειρητικό στρες. Σε κλινικό επίπεδο έχει αποδειχτεί η συσχέτιση μεταξύ περίσσειας συγκέντρωσης του O₂⁻ στο αίμα και μεταχειρουργικής κατάστασης, εγκεφαλικού τραυματισμού και σακχαρώδους διαβήτη (Crimi et al. 2006; Maiese et al. 2007). Πιστεύεται ότι η πρόωρη ανίχνευση στις αλλαγές της συσσώρευσης του O₂⁻ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόγνωση της πορείας του ασθενή. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί κυρίως οπτικοί αισθητήρες (Tarpey et al. 2004; Zanetti et al. 2005; Dai et al. 2006; Yamazaki et al. 2011), αλλά και ηλεκτροχημικοί (Fujita et al. 2009) για την ανίχνευση O₂⁻ σε ασθενείς. Όμως παρουσιάζουν διάφορα μειονεκτήματα όπως είναι ο έμμεσος τρόπος ανίχνευσης του O₂⁻, η μειωμένη ευαισθησία του συστήματος και ο επεμβατικός τρόπος εφαρμογής τους, καθώς θα πρέπει να σημανθεί το δείγμα. Αντιθέτως με τη χρήση του βιοαισθητήρα μας δεν επεμβαίνουμε στη φυσιολογία, μετράμε αμέσως μετά την αιμοληψία το παραγόμενο O₂⁻, χωρίς να απαιτείται κάποια προεργασία. Είναι ένα ιδιαίτερα

ευαίσθητο και γρήγορο σύστημα. Έχοντας υπόψη ότι πρόσφατα έγινε εφικτό η σάρωση σε μεγάλη κλίμακα αισθητήρων BERA για 96 δοκιμές σε περίπου 70 λεπτά (Perdikaris et al. 2011), εμφανίζεται η ευκαιρία της εφαρμογής του συστήματος στα σημεία άμεσης ανάγκης π.χ. νοσοκομεία για καθημερινή και γρήγορη χρήση.

Εν κατακλείδι, η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια για τη συστηματική έρευνα της καινοτόμου τεχνολογίας της μεμβρανικής μηχανικής με στόχο την κατασκευή κυτταρικών βιοαισθητήρων εκλεκτικών ως προς ένα μόριο-στόχο. Τρέχουσα έρευνα που πραγματοποιείται στο εργαστήριό μας εστιάζει στην διερεύνηση του μηχανισμού που «κρύβεται» πίσω από την ηλεκτροεισαγωγή της SOD στους αγώγιμους πόρους των μεμβρανών μέσω προηγμένων ηλεκτροφυσιολογικών μεθόδων, όπως επίσης και στη βελτίωση της ενσωμάτωσης της SOD στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης μέσω χημικών τροποποιήσεων της πρωτεΐνης. Πιστεύουμε ότι αν και η εφαρμογή της μεμβρανικής μηχανικής για την κατασκευή κυτταρικών βιοαισθητήρων βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο, η έως τώρα απόδοση και συγκεκριμένα η ευαισθησία του αισθητήρα αποτελούν αρκετά ενθαρρυντικά στοιχεία για τη συγκεκριμένη τεχνολογία.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aitken G.R., Henderson J.R., Chang S.C., McNeil C.J. and Birch-Machin M.A. (2007) Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes. *Clinical and Experimental Dermatology* **32**(6): 722-7.
- Anantharam V., Kaul S., Song C., Kanthasamy A. and Kanthasamy A.G. (2007) Pharmacological inhibition of neuronal NADPH oxidase protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced oxidative stress and apoptosis in mesencephalic dopaminergic neuronal cells. *Neurotoxicology* **28**(5): 988-97.
- Andrews J.S., Mason V.P., Thompson I.P., Markx G.H. (2004) Investigation of the distribution of and interactions between microbial cells in artificially constructed biofilms by image analysis. *8th World Biosensor Congress, Granada*.
- Anup R., Aparna V., Pulimood A. and Balasubramanian K.A. (1999) Surgical stress and the small intestine: role of oxygen free radicals. *Surgery* **125**(5): 560-9.
- Babior B.M. (2004). NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology* **16**(1): 42-7.
- Babior B.M., Lambeth J.D. and Nauseef W. (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **397**(2): 342-4.
- Bahnson A.B. and Boggs S.S. (1990) Addition of Serum to Electroporated Cells Enhances Survival and Transfection Efficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **171**(2): 752-757.
- Banerjee P. and Bhunia A.K. (2009) Mammalian cell-based biosensors for pathogen and toxins. *Trends in Biotechnology* **27**: 179-188.
- Barbacanne, M.A., Souchard J.P., Darblade B., Iliou J.P., Nepveu F., Pipy B., Bayard F. and Arnal J.F. (2000). Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome C reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. *Free Radical Biology and Medicine* **29**(5): 388-96.
- Baron S., Poast J., Rizzo D., McFarland E. and Kieff E. (2000) Electroporation of antibodies, DNA, and other macromolecules into cells: a highly efficient method. *Journal of Immunological Methods* **242**(1-2): 115-126.

- Bickerstaff G.F. (1997) Immobilization of Enzymes and Cells. *Totowa, Humana Press*.
- Block M.L. (2008) NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC Neuroscience* **9** (Suppl 2): S8.
- Bloor J.H., Holtz D., Kaars J. and Kosman D.J. (1983) Characterization of Superoxide-Dismutase (Sod-1 and Sod-2) Activities in Inbred Mice - Evidence for Quantitative Variability and Possible Nonallelic Sod-1 Polymorphism. *Biochemical Genetics* **21**(3-4): 349-364.
- Bocchino M., Agnese S., Fagone E., Svegliati S., Grieco D., Vancheri C., Gabrielli A., Sanduzzi A. and Avvedimento E.V. (2010) Reactive oxygen species are required for maintenance and differentiation of primary lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* **5**(11): e14003.
- Bohrn U., Stutz E., Fleischer M., Schoning M. and Wagner P. (2011) Eukaryotic cell lines as a sensitive layer for rapid monitoring of carbon monoxide. *Physica Status Solidi A* **208**(6): 1345-1350.
- Bortner C.D. and Cidlowski J.A. (2004) The role of apoptotic volume decrease and ionic homeostasis in the activation and repression of apoptosis. *Pflugers Archiv* **448**(3): 313-8.
- Bowen I.D. and Lockshin R.A. (1981) Cell death in biology and pathology. *London, New York*.
- Braeckman B.P., Houthoofd K., De Vreese A. and Vanfleteren J.R. (2002) Assaying metabolic activity in ageing *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* **123**(2-3): 105-119.
- Brennan L.M., Widder M.W., Lee L.E. and van der Schalie W.H. (2012) Long-term storage and impedance-based water toxicity testing capabilities of fluidic biochips seeded with RTgill-W1 cells. *Toxicology In Vitro* **26**(5): 736-45.
- Burdon R.H. (1995) Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology and Medicine* **18**(4): 775-94.
- Burdon R.H., Gill V. and Rice-Evans C. (1993) Reduction of a tetrazolium salt and superoxide generation in human tumor cells (HeLa). *Free Radical Research Communications* **18**(6): 369-80.
- Cadenas E. and Davies K.J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine* **29**(3-4): 222-30.

- Campanella L., Favero G., Persi L. and Tomassetti M. (2000) New biosensor for superoxide radical used to evidence molecules of biomedical and pharmaceutical interest having radical scavenging properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **23**(1): 69-76.
- Carol R. J., Takeda S., Linstead P., Durrant M.C., Kakesova H., Derbyshire P., Drea S., Zarsky V. and Dolan L. (2005) A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature* **438**(7070): 1013-1016.
- Castellano I., Di Maro A., Ruocco M.R., Chambery A., Parente A., Di Martino M.T., Parlato G., Masullo M. and De Vendittis E. (2006). Psychrophilic superoxide dismutase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*: biochemical characterization and identification of a highly reactive cysteine residue. *Biochimie* **88**(10): 1377-1389.
- Ceriotti L., Kob A., Drechsler S., Ponti J., Thedinga E., Colpo P., Ehret R. and Rossi F. (2007) Online monitoring of BALB/3T3 metabolism and adhesion with multiparametric chip-based system. *Analytical Biochemistry* **371**(1): 92-104.
- Chang S.C., Pereira-Rodrigues N., Henderson J.R., Cole A., Bedioui F. and McNeil C.J. (2005) An electrochemical sensor array system for the direct, simultaneous in vitro monitoring of nitric oxide and superoxide production by cultured cells. *Biosensors & Bioelectronics* **21**(6): 917-22.
- Crimi E., Sica V., Williams-Ignarro S., Zhang H., Slutsky A.S., Ignarro L.J. and Napoli C. (2006). The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radical Biology and Medicine* **40**(3): 398-406.
- Curtis T.M., Tabb J., Romeo L., Schwager S.J., Widder M.W. and van der Schalie W.H. (2009) Improved cell sensitivity and longevity in a rapid impedance-based toxicity sensor. *Journal of Applied Toxicology* **29**(5): 374-80.
- Curtis T.M., Widder M.W., Brennan L.M., Schwager S.J., van der Schalie W.H., Fey J. and Salazar N. (2009) A portable cell-based impedance sensor for toxicity testing of drinking water. *Lab Chip* **9**(15): 2176-83.
- D'Souza S.F. (2001) Microbial biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **16**(6): 337-53.
- D'Souza S.F. (1999) Immobilized enzymes in bioprocess. *Current Science* **77**: 69-79.
- Dai X., Cao X. and Kreulen D.L. (2006). Superoxide anion is elevated in sympathetic neurons in DOCA-salt hypertension via activation of NADPH oxidase.

- American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* **290**(3): H1019-26.
- Dajas-Bailador F.A., Mogg A.J. and Wonnacott S. (2002) Intracellular Ca²⁺ signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ stores. *Journal of Neurochemistry* **81**(3): 606-614.
- Daunert S., Barrett G., Feliciano J.S., Shetty R.S., Shrestha S. and Smith-Spencer W. (2000) Genetically engineered whole-cell sensing systems: Coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical Reviews* **100**(7): 2705-2738.
- De Grey A.D. (2002) HO₂*: the forgotten radical. *DNA and Cell Biology* **21**(4): 251-7.
- Degli Esposti M. (2002) Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods* **26**(4): 335-40.
- Delehanty J.B., Shaffer K.M. and Lin B.C. (2004) A comparison of microscope slide substrates for use in transfected cell microarrays. *Biosensors & Bioelectronics* **20**(4): 773-779.
- Demple B. and Amabile-Cuevas C.F. (1991) Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell* **67**(5): 837-9.
- Den Hartog C. (1975) Thoughts about the taxonomical relationships within the Lemnaceae. *Aquatic Botany* **1**: 407-416.
- Dixit R. and Cyr R. (2003) Cell damage and reactive oxygen species production induced by fluorescence microscopy: effect on mitosis and guidelines for non-invasive fluorescence microscopy. *Plant Journal* **36**(2): 280-90.
- Doerner P.W. (1994) Cell Cycle Regulation in Plants. *Plant Physiology* **106**(3): 823-827.
- Droge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* **82**(1): 47-95.
- Dutta A., Bandyopadhyay S., Mandal C. and Chatterjee M. (2005) Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology International* **54**(2): 119-122.
- Eddy A.A. (1989) Use of carbocyanine dyes to assay membrane potential of mouse ascites tumor cells. *Methods in Enzymology* **172**: 95-101.

- Eltzov E. and Marks R.S. (2011). Whole-cell aquatic biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **400**(4): 895-913.
- Endo K., Miyasaka T., Mochizuki S., Aoyagi S., Himi N., Asahara H., Tsujioka K. and Sakai K. (2002) Development of a superoxide sensor by immobilization of superoxide dismutase. *Sensors and Actuators B* **83**: 30-34.
- Falsey J.R., Renil M., Park S., Li S.J. and Lam K.S. (2001) Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjugate Chemistry* **12**(3): 346-353.
- Favier A.E., Cadet J., Kalyanaraman B., Fontecave M. and Pierre J.L. (1995) Analysis of Free Radicals in Biological systems. (Ed. Favier, A. E., Cadet, J., Kalyanaraman, B., Fontecave, M., and Pierre, J.-L.) *Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland*.
- Flampouri K., Mavrikou S., Kintzios S., Miliadis G. and Aplada-Sarlis P. (2010) Development and validation of a cellular biosensor detecting pesticide residues in tomatoes. *Talanta* **80**(5): 1799-804.
- Flaskos J., McLean W.G., Fowler M.J. and Hargreaves A.J. (1998) Tricresyl phosphate inhibits the formation of axon-like processes and disrupts neurofilaments in cultured mouse N2a and rat PC12 cells. *Neuroscience Letters* **242**(2): 101-4.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.F., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D.G., Davies J.M. and Dolan L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**(6930): 442-446.
- Fujita M., Tsuruta R., Kasaoka S., Fujimoto K., Tanaka R., Oda Y., Nanba M., Igarashi M., Yuasa M., Yoshikawa T. and Maekawa T. (2009) *In vivo* real-time measurement of superoxide anion radical with a novel electrochemical sensor. *Free Radical Biology and Medicine* **47**(7): 1039-48.
- Gallois P., Makishima T., Hecht V., Despres B., Laudie M., Nishimoto T. and Cooke R. (1997) An Arabidopsis thaliana cDNA complementing a hamster apoptosis suppressor mutant. *Plant Journal* **11**(6): 1325-31.
- Gapper C. and Dolan L. (2006) Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiology* **141**(2): 341-345.

- Ge B. and Lisdat F. (2002) Superoxide sensor based on cytochrome C immobilized on mixed-thiol SAM with a new calibration method. *Analytica Chimica Acta* **454**: 53–64.
- Ge B., Scheller F.W. and Lisdat F. (2003) Electrochemistry of immobilized CuZnSOD and FeSOD and their interaction with superoxide radicals. *Biosensors & Bioelectronics* **18**(2-3): 295-302.
- Georgiou C.D., Papapostolou I., Patsoukis N., Tsegenidis T. and Sideris T. (2005) An ultrasensitive fluorescent assay for the in vivo quantification of superoxide radical in organisms. *Analytical Biochemistry* **347**(1): 144-51.
- Giaever I. and Keese C.R. (1993) A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* **366**(6455): 591-2.
- Gilchrist K.H., Giovangrandi L., Whittington R.H. and Kovacs G.T. (2005) Sensitivity of cell-based biosensors to environmental variables. *Biosensors & Bioelectronics* **20**(7): 1397-406.
- Gobi K.V. and Mizutani F. (2000) Efficient mediatorless superoxide sensors using cytochrome C - modified electrodes: surface nano - organization for selectivity and controlled peroxidase activity. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **484**: 172-181.
- Gobi K.V. and Mizutani F. (2001) Amperometric detection of superoxide dismutase at cytochrome c-immobilized electrodes: xanthine oxidase and ascorbate oxidase incorporated biopolymer membrane for *in vivo* analysis. *Analytical Sciences* **17**(1): 11-5.
- Godiard L., Grant M.R., Dietrich R.A., Kiedrowski S. and Dangl J.L. (1994) Perception and response in plant disease resistance. *Current Opinion in Genetics and Development* **4**(5): 662-71.
- Grace S.C. (1990) Phylogenetic distribution of superoxide dismutase supports an endosymbiotic origin for chloroplasts and mitochondria. *Life Sciences* **47**(21): 1875-86.
- Gramberg B., Kintzios S., Schmidt U., Mewis I. and Ulrichs C. (2012) A basic approach towards the development of bioelectric bacterial biosensors for the detection of plant viruses. *Journal of Phytopathology* **160**: 106-111.

- Green D.R. and Reed J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**(5381): 1309-1312.
- Grover N.B. and Woldringh C.L. (2001) Dimensional regulation of cell-cycle events in *Escherichia coli* during steady-state growth. *Microbiology* **147**(Pt 1): 171-81.
- Guilbault G.G. (1991) Biosensors. *Current Opinion in Biotechnology* **2**(1): 3-8.
- Guo F.Q., Okamoto M. and Crawford N.M. (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**(5642): 100-103.
- Haddad N.I.A. and Yuan Q.S. (2005) Purification and some properties of Cu,Zn superoxide dismutase from *Radix lethospermi* seed, kind of Chinese traditional medicine. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **818**(2): 123-131.
- Haines T.H. (1983) Anionic lipid headgroups as a proton-conducting pathway along the surface of membranes: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **80**(1): 160-4.
- Han D., Antunes F., Canali R., Rettori D. and Cadenas E. (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *Journal of Biological Chemistry* **278**(8): 5557-63.
- Hancock J.T. (2005) Cell signaling. *New York, Oxford University Press*.
- Harman D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal in Gerontology* **11**(3): 298-300.
- Harman D. (1972) The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society* **20**(4): 145-7.
- Hediger S., Sayah A., Horisberger J.D. and Gijs M.A. (2001) Modular microsystem for epithelial cell culture and electrical characterisation. *Biosensors & Bioelectronics* **16**(9-12): 689-94.
- Henderson J.R., Swalwell H., Boulton S., Manning P., McNeil C.J. and Birch-Machin M.A. (2009) Direct, real-time monitoring of superoxide generation in isolated mitochondria. *Free Radical Research* **43**(9): 796-802.
- Henderson L.M. and Chappell J.B. (1993) Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *European Journal of Biochemistry* **217**(3): 973-80.

- Hildebrandt T. and Traunecker H. (2005) Neuroblastoma: A tumor with many faces. *Current Pediatrics* **15**(5): 412-420.
- Huang B. and Xing J.Z. (2006) Dynamic Modelling and Prediction of Cytotoxicity on Microelectronic cell Sensor Array. *Canadian Journal of Chemical Engineering* **84**(4): 393-405.
- Huh Y.J., Kim J.M., Kim H., Song H., So H., Lee S.Y., Kwon S.B., Kim H.J., Kim H.H., Lee S.H., Choi Y., Chung S.C., Jeong D.W. and Min B.M. (2006) Regulation of osteoclast differentiation by the redox-dependent modulation of nuclear import of transcription factors. *Cell Death and Differentiation* **13**(7): 1138-46.
- Inze D. and De Veylder L. (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* **40**: 77-105.
- Kaiser K.L.E. and Palabrica V.S. (1991) Photobacterium phosphoreum toxicity data index. *Water Pollution Research Journal of Canada* **26**: 361-431.
- Kang B.G. and Cleland C.F. (1990) Characterization of Senescence in Lemna-Gibba G3 - a Determinate Growth System. *Plant and Cell Physiology* **31**(5): 661-665.
- Kemmerling U., Munoz P., Muller M., Sanchez G., Aylwin M.L., Klann E., Carrasco M.A. and Hidalgo C. (2007) Calcium release by ryanodine receptors mediates hydrogen peroxide-induced activation of ERK and CREB phosphorylation in N2a cells and hippocampal neurons. *Cell Calcium* **41**(5): 491-502.
- Kho K.H., Morisawa M. and Choi K.S. (2003) Membrane hyperpolarization increases cAMP to induce the initiation of sperm motility in salmonid fishes, rainbow trout and masu salmon. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**(6): 833-840.
- Kim E.J., Lee Y., Lee J.E. and Gu M.B. (2002) Application of recombinant fluorescent mammalian cells as a toxicity biosensor. *Water Science and Technology* **46**(3): 51-6.
- Kinnula V.L. and Crapo J.D. (2003) Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **167**(12): 1600-19.
- Kintzios S. (2006) Next generation cell sensors for virus identification-field-based assays. *Proc. 6th Biodetection Conference*, Washington DC.

- Kintzios S. (2007) Cell-based biosensors in clinical chemistry. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **7**: 1019-1026.
- Kintzios S. (2008) Molecular Identification Through Membrane-Engineered Cells (MIME): State-of-the-art biosensor technology for instant, ultra-specific and ultra-sensitive detection of infectious disease agents at global scale. In: Commercial and Pre-Commercial Cell Detection Technologies for Defence against Bioterror (Ed. L.M. Lechuga, F.P. Milanovich, P. Skladal, O. Ignatov, T.R. Austin) *IOS Press, Amsterdam, The Netherlands*, pp. 115-124.
- Kintzios S. (2013) Mammalian cell-based sensors for high throughput screening for detecting chemical residues, pathogens and toxins in food. In: A.K. Bhunia (Ed.) High throughput screening for food safety assessment: biosensor technologies, hyperspectral imaging and practical applications, *Woodhead Publishers* (in press).
- 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. and Simonian A. (2004). Study on the mechanism of Bioelectric Recognition Assay: evidence for immobilized cell membrane interactions with viral fragments. *Biosensors & Bioelectronics* **20**(4): 907-16.
- Kintzios S., Makri O., Panagiotopoulos E. and Scapeti M. (2003). *In vitro* rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum L.*). *Biotechnology Letters* **25**(5): 405-8.
- Kintzios S., Marinopoulou I., Moschopoulou G., Mangana O., Nomikou K., Endo K., Papanastasiou I. and Simonian A. (2006) Development of a novel, multi-analyte biosensor system for assaying cell division: identification of cell proliferation/death precursor events. *Biosensors & Bioelectronics* **21**(7): 1365-73.
- Kintzios S., Pistola E., Konstas J., Bem F., Matakias T., Alexandropoulos N., Biselis I. and Levin R. (2001) The application of the bioelectric recognition assay for the detection of human and plant viruses: definition of operational parameters. *Biosensors & Bioelectronics* **16**(7-8): 467-80.

- Kintzios S., Pistola E., Panagiotopoulos P., Bomsel M., Alexandropoulos N., Bem F., Ekonomou G., Biselis J. and Levin R. (2001) Bioelectric recognition assay (BERA). *Biosensors & Bioelectronics* **16**(4-5): 325-36.
- Kintzios S., Yiakoumetis I., Moschopoulou G., Mangana O., Nomikou K. and Simonian A. (2007) Differential effect of the shape of calcium alginate matrices on the physiology of immobilized neuroblastoma N2a and Vero cells: a comparative study. *Biosensors & Bioelectronics* **23**(4): 543-8.
- Kiselev N.A., Shpitzberg C.L. and Vainshtein B.K. (1967) Crystallization of catalase in the form of tubes with monomolecular walls. *Journal of Molecular Biology* **25**(3): 433-41.
- Koukalova B., Kovarik A., Fajkus J. and Siroky J. (1997) Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS Letters* **414**(2): 289-92.
- Kovacs G.G., Zsembery A., Anderson S.J., Komlosi P., Gillespie G.Y., Bell P.D., Benos D.J. and Fuller C.M. (2005) Changes in intracellular Ca²⁺ and pH in response to thapsigargin in human glioblastoma cells and normal astrocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **289**(2): C361-C371.
- Kranner I., Beckett R.P., Wornik S., Zorn M. and Pfeifhofer H.W. (2002) Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *Plant Journal* **31**(1): 13-24.
- Kroemer G., Zamzami N. and Susin S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today* **18**(1): 44-51.
- Kubisch R., Bohrn U., Fleischer M. and Stutz E. (2012) Cell-Based Sensor System Using L6 Cells for Broad Band Continuous Pollutant Monitoring in Aquatic Environments. *Sensors* **12**(3): 3370-3393.
- Kunkel H.O. and Campbell J.E., Jr. (1952) Tissue cytochrome oxidase activity and body weight. *Journal of Biological Chemistry* **198**(1): 229-36.
- Lampe P.A., Cornbrooks E.B., Juhasz A., Johnson E.M. and Franklin J. a. J. L. (1995) Suppression of Programmed Neuronal Death by a Thapsigargin-Induced Ca²⁺ Influx. *Journal of Neurobiology* **26**(2): 205-212.

- Lee N. K., Choi Y.G., Baik J.Y., Han S.Y., Jeong D.W., Bae Y.S., Kim N. and Lee S.Y. (2005) A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* **106**(3): 852-9.
- Lemon G.D., Posluzny U. and husband B.C. (2001) Potential and realised states of vegetative reproduction in *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor* and *Wolffia borealis*. *Aquatic Botany* **70**: 79-87.
- Li J.M. and Shah A.M. (2003) ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* **14**(8 Suppl 3): S221-6.
- Li P.F., Dietz R. and von Harsdorf R. (1997) Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* **96**(10): 3602-9.
- Li X.R., Wang B., Xu J.J. and Chen H.Y. (2011) *In vitro* detection of superoxide anions released from cancer cells based on potassium-doped carbon nanotubes-ionic liquid composite gels. *Nanoscale* **3**(12): 5026-33.
- Liu S.S. (1999) Cooperation of a "reactive oxygen cycle" with the Q cycle and the proton cycle in the respiratory chain--superoxide generating and cycling mechanisms in mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **31**(4): 367-76.
- Lob V., Geisler T., Brischwein M., Uhl R. and Wolf B. (2007) Automated live cell screening system based on a 24-well microplate with integrated microfluidics. *Medical & Biological Engineering & Computing* **45**: 1023–1028.
- Lojewska Z., Farkas D.L., Ehrenberg B. and Loew L.M. (1989) Analysis of the Effect of Medium and Membrane Conductance on the Amplitude and Kinetics of Membrane-Potentials Induced by Externally Applied Electric-Fields. *Biophysical Journal* **56**(1): 121-128.
- Luo X. L., Xu J.J., Zhao W. and Chen H.Y. (2004) A novel glucose ENFET based on the special reactivity of MnO₂ nanoparticles. *Biosensors & Bioelectronics* **19**(10): 1295-300.
- Lvovich V. and Scheeline A. (1997) Amperometric sensors for simultaneous superoxide and hydrogen peroxide detection. *Analytical Chemistry* **69**(3): 454-62.

- Lynch R.E. and Fridovich I. (1978) Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *Journal of Biological Chemistry* **253**(13): 4697-9.
- Mackler S. A., Homan Y.X., Korutla L., Conti A.C. and Blendy J.A. (2003) The mouse *nac1* gene, encoding a cocaine-regulated Bric-a-brac Tramtrac Broad complex/Pox virus and Zinc finger protein, is regulated by AP1. *Neuroscience* **121**(2): 355-61.
- Maiese K., Morhan S.D. and Chong Z.Z. (2007) Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Current Neurovascular Research* **4**(1): 63-71.
- Manning P., McNeil C.J., Cooper J.M. and Hillhouse E.W. (1998) Direct, real-time sensing of free radical production by activated human glioblastoma cells. *Free Radical Biology and Medicine* **24**(7-8): 1304-9.
- Margoliash E. and Walasek, O.F. (1967) Cytochrome C from Vertebrate and Invertebrate Sources. *Methods in Enzymology* **10**: 399-349.
- Marks R.S., Cullen D.C., Karube I., Lowe C.R. and Weetall H.H. (2007) Handbook of biosensors and biochips, *Wiley, Chichester*.
- Martinoia S., Massobrio G. and Lorenzelli L. (2005) Modeling ISFET microsensor and ISFET-based microsystems: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **105**: 14-27.
- Mavrikou S., Flampouri K., Moschopoulou G., Mangana O., Michaelides A. and Kintzios S. (2008) Assessment of Organophosphate and Carbamate Pesticide Residues in Cigarette Tobacco with a Novel Cell Biosensor. *Sensors* **8**(4): 2818-2832.
- Maxwell D.P., Wang Y. and McIntosh L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **96**(14): 8271-6.
- McLay C.L. (1976) The effect of pH on the population growth of three species of duckweed: *Spirodela oligorrhiza*, *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza*. *Freshwater Biology* **6**: 125-136.

- McNeil C.J. and Manning P. (2002) Sensor-based measurements of the role and interactions of free radicals in cellular systems. *Journal of Biotechnology* **82**(4): 443-55.
- McNeil C.J., Smith K.A., Bellavite P. and Bannister J.V. (1989) Application of the electrochemistry of cytochrome C to the measurement of superoxide radical production. *Free Radical Research Communications* **7**(2): 89-96.
- Michelini E., Guardigli M., Magliulo M., Mirasoli M., Roda A., Simoni P. and Baraldini M. (2006) Bioluminescent Biosensors Based on Genetically Engineered Living Cells in Environmental and Food Analysis. *Analytical Letters* **39**: 1503–1515.
- Mittler R. and Lam E. (1997) Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. *Plant Molecular Biology* **34**(2): 209-21.
- Moini J. (2005) Comprehensive exam review for the pharmacy technician. *Thomson-Delmar Learning: Clifton Park*
- Moon H.J., Ko W.K., Han S.W., Kim D.S., Hwang Y.S., Park H.K. and Kwon I.K. (2012) Antioxidants, like coenzyme Q10, selenite, and curcumin, inhibited osteoclast differentiation by suppressing reactive oxygen species generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **418**(2): 247-53.
- Moschopoulou G. and 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**: 90-96.
- Moschopoulou G., Korea C., Maggana O., Nomkou K., Papanastasiou J. and Kintzios S. (2006) Membrane-engineering as a novel tool for the production of ultra-specific, ultra-sensitive cell biosensors. *9th World Biosensors Congress, Toronto*.
- 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. and Kintzios S. (2008) Engineering of the membrane of fibroblast cells with virus-specific antibodies: A novel biosensor tool for virus detection. *Biosensors & Bioelectronics* **24**(4): 1027-1030.

- Murk A.J., Legler J., Denison M.S., Giesy J.P., van de Guchte C. and Brouwer A. (1996) Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): a novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fundamental and Applied Toxicology* **33**(1): 149-60.
- Natarajan A., Molnar P., Sieverdes K., Jamshidi A. and Hickman J.J. (2006) Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity. *Toxicology In Vitro* **20**(3): 375-81.
- Neill S., Desikan R. and Hancock J. (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**(5): 388-95.
- Neumann E., Schaefer-Ridder M.E., Wang Y. and Hofschneider P.H. (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal* **1**(7): 841-845.
- O'Connor S.M., Andreadis J.D., Shaffer K.M., Ma W., Pancrazio J.J. and Stenger D.A. (2000) Immobilization of neural cells in three-dimensional matrices for biosensor applications. *Biosensors & Bioelectronics* **14**(10-11): 871-81.
- Ohsaka T., Tian Y., Shioda M., Kasahara S. and Okajima T. (2002) A superoxide dismutase-modified electrode that detects superoxide ion. *Chemical Communications* **7**(9): 990-1.
- Owicki J.C. and Parce J.W. (1992) Biosensors based on the energy metabolism of living cells: the physical chemistry and cell biology of extracellular acidification. *Biosensors & Bioelectronics* **7**(4): 255-72.
- Pantoja R., Nagaraj J.M., Starace D.M., Melosh N.A., Blunck R., Bezanilla F. and Heath J.R. (2004) Silicon chip-based patch-clamp electrodes integrated with PDMS microfluidics. *Biosensors & Bioelectronics* **20**(3): 509-17.
- Parker M.W., Blake C.C., Barra D., Bossa F., Schinina M.E., Bannister W.H. and Bannister J.V. (1987) Structural identity between the iron- and manganese-containing superoxide dismutases. *Protein Engineering* **1**(5): 393-7.
- Pennell R.I. and Lamb C. (1997) Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell* **9**(7): 1157-1168.
- Perdikaris A., Alexandropoulos N. and Kintzios S. (2009) Development of a Novel, Ultra-rapid Biosensor for the Qualitative Detection of Hepatitis B Virus-

- associated Antigens and Anti-HBV, Based on "Membrane-engineered" Fibroblast Cells with Virus-Specific Antibodies and Antigens. *Sensors* **9**(3): 2176-2186.
- Perdikaris A., Vassilakos N., Yiakoumettis I., Kektsidou O. and Kintzios S. (2011) Development of a portable, high throughput biosensor system for rapid plant virus detection. *Journal of Virological Methods* **177**(1): 94-99.
- Petrosillo G., Ruggiero F.M., Pistolese M. and Paradies G. (2001) Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome C dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS Letters* **509**(3): 435-8.
- Pliquett U., Joshi R.P., Sridhara V. and Schoenbach K.H. (2007) High electrical field effects on cell membranes. *Bioelectrochemistry* **70**(2): 275-282.
- Poghossian A., Ingebrandt S., Offenhausser A. and Schoning M.J. (2009) Field-effect devices for detecting cellular signals. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **20**(1): 41-8.
- Polyak K., Xia Y., Zweier J.L., Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**(6648): 300-5.
- Potters G., De Gara L., Asard H. and Horemans N. (2002) Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? Review. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 537-548.
- Radio N.M. and Mundy W.R. (2008) Developmental neurotoxicity testing in vitro: models for assessing chemical effects on neurite outgrowth. *Neurotoxicology* **29**(3): 361-76.
- Raha S. and Robinson B.H. (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences* **25**(10): 502-8.
- Rainina E.I., Efremenco E.N., Varfolomeyev S.D., Simonian A.L. and Wild J.R. (1996) The development of a new biosensor based on recombinant E. coli for the direct detection of organophosphorus neurotoxins. *Biosensors & Bioelectronics* **11**(10): 991-1000.
- Read S.J., Manning P., McNeil C.J., Hunter A.J. and Parsons A.A. (1999) Effects of sumatriptan on nitric oxide and superoxide balance during glyceryl trinitrate

- infusion in the rat. Implications for antimigraine mechanisms. *Brain Research* **847**(1): 1-8.
- Ricciarelli R., Zing J.M. and Nazi A. (2002) The 80th anniversary of vitamin E: Beyond its antioxidant properties. *Biological Chemistry* **383**: 457–465.
- Rider T.H., Petrovick M.S., Nargi F.E., Harper J.D., Schwoebel E.D., Mathews R.H., Blanchard D. J., Bortolin L.T., Young A.M., Chen J.Z. and Hollis M.A. (2003) A B cell-based sensor for rapid identification of pathogens. *Science* **301**(5630): 213-215.
- Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacqumard A. and Murray J.A. (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**(5407): 1541-4.
- Riska P.F., Su Y., Bardarov S., Freundlich L., Sarkis G., Hatfull G., Carriere C., Kumar V., Chan J. and Jacobs W.R. (1999) Rapid film-based determination of antibiotic susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a luciferase reporter phage and the Bronx box. *Journal of Clinical Microbiology* **37**(4): 1144-1149.
- Rodriguez A.A., Grunberg K.A. and Taleisnik E.L. (2002) Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. *Plant Physiology* **129**(4): 1627-32.
- Rogers T.B., Inesi G., Wade R. and Lederer W. J. (1995) Use of thapsigargin to study Ca^{2+} homeostasis in cardiac cells. *Bioscience Reports* **15**(5): 341-349.
- Rouhier N. and Jacquot J.P. (2005) The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* **38**(11): 1413-21.
- Sanderson J.T., Aarts J.M., Brouwer A., Froese K.L., Denison M.S. and Giesy J.P. (1996) Comparison of Ah receptor-mediated luciferase and ethoxyresorufin-O-deethylase induction in H4IIE cells: implications for their use as bioanalytical tools for the detection of polyhalogenated aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology* **137**(2): 316-25.
- Satoh H., Delbridge L.M., Blatter L.A. and Bers D.M. (1996) Surface: volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. *Biophysical Journal* **70**(3): 1494-504.

- Scandalios J.G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**(7): 995-1014.
- Schneider S. W., Pagel P., Rotsch C., Danker T., Oberleithner H., Radmacher M. and Schwab A. (2000) Volume dynamics in migrating epithelial cells measured with atomic force microscopy. *Pflugers Archiv* **439**(3): 297-303.
- Schopfer P., Liskay A., Bechtold M., Frahry G. and Wagner A. (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* **214**(6): 821-8.
- Schultz J.R., Ellerby L.M., Gralla E.B., Valentine J.S. and Clarke C.F. (1996) Autoxidation of ubiquinol-6 is independent of superoxide dismutase. *Biochemistry* **35**(21): 6595-603.
- Schwamborn J.C., Fiore R., Bagnard D., Kappler J., Kaltschmidt C. and Puschel A.W. (2004) Semaphorin 3A stimulates neurite extension and regulates gene expression in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**(30): 30923-6.
- Sherwood L. (2010) Human physiology: From cells to systems. *Brooks/Cole*
- Shinjyo N. and Kita K. (2007) Relationship between reactive oxygen species and heme metabolism during the differentiation of Neuro2a cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **358**(1): 130-5.
- Somers L.A., Hanchar H.J., Colliver T.L., Wittenberg N., Cans A., Arbault S., Amatore C. and Ewing A.G. (2004) The effects of vesicular volume on secretion through the fusion pore in exocytotic release from PC12 cells. *Journal of Neuroscience* **24**(2): 303-9.
- Song M.I., Bier F.F. and Scheller F.W. (1995) A method to detect superoxide radicals using Teflon membrane and superoxide dismutase. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **38**: 419-422.
- Stenger D.A., Gross G.W., Keefer E.W., Shaffer K.M., Andreadis J.D., Ma W. and Pancrazio J.J. (2001) Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors. *Trends in Biotechnology* **19**(8): 304-9.
- Stomp A.M. (2005) The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing. *Biotechnology Annual Review* **11**: 69-99.

- Su B., Mitra S., Gregg H., Flavahan S., Chotani M.A., Clark K.R., Goldschmidt-Clermont P.J. and Flavahan N.A. (2001) Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Circulation Research* **89**(1): 39-46.
- Suh Y. A., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K. and Lambeth J.D. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**(6748): 79-82.
- Sun Y., St Clair D.K., Xu Y., Crooks P.A. and St Clair W.H. (2010) A NADPH oxidase-dependent redox signaling pathway mediates the selective radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells. *Cancer Research* **70**(7): 2880-90.
- Tang B., Wang Y. and Chen Z.Z. (2002) Catalytic spectrofluorimetric determination of superoxide anion radical and superoxide dismutase activity using N,N-dimethylaniline as the substrate for horseradish peroxidase (HRP). *Spectrochimica Acta A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **58**(12): 2557-62.
- Tarpey, M.M. and Fridovich I. (2001) Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circulation Research* **89**(3): 224-36.
- Tarpey M.M., Wink D.A. and Grisham M.B. (2004) Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **286**(3): R431-44.
- Teissie J., Golzio M. and Rols M.P. (2005) Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1724**(3): 270-280.
- Thastrup O., Cullen P.J., Drobak B.K., Hanley M.R. and Dawson A.P. (1990) Thapsigargin, a Tumor Promoter, Discharges Intracellular Ca²⁺ Stores by Specific-Inhibition of the Endoplasmic-Reticulum Ca²⁺-Atpase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(7): 2466-2470.
- Toussaint O., Raes M. and Remacle J. (1991) Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a

- sequence of defined stages. *Mechanisms of Ageing and Development* **61**(1): 45-64.
- Umeki S., Sumi M., Niki Y. and Soejima R. (1987) Concentrations of superoxide dismutase and superoxide anion in blood of patients with respiratory infections and compromised immune systems. *Clinical Chemistry* **33**(12): 2230-3.
- Valacchi G. and Davis P.A. (2008) Oxidants in Biology. A question of balance. *Springer*
- Valero T. Studies on neural differentiation and monitoring with novel biosensor tools. Institute of Microsystem Technology, *University of Freiburg*.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M. and Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **39**(1): 44-84.
- Van den Bogert C., Muus P., Haanen C., Pennings A., Melis T.E. and Kroon A.M. (1988) Mitochondrial biogenesis and mitochondrial activity during the progression of the cell cycle of human leukemic cells. *Experimental Cell Research* **178**(1): 143-53.
- Vanden Hoek T.L., Becker L.B., Shao Z., Li C. and Schumacker P.T. (1998) Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 18092-18098.
- Van der Lelie D., Regniers L., Borremans B., Provoost A. and Verschaeve L. (1997) The VITOTOX(R) test, an SOS bioluminescence *Salmonella typhimurium* test to measure genotoxicity kinetics. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **389**(2-3): 279-290.
- Varelas V., Sanvicens N., Marco M. and Kintzios S. (2010) Development of a cellular biosensor for the detection of 2, 4, 6- trichloroanisole (TCA). *Talanta* **84**: 936-940.
- Very A.A. and Davies J.M. (2000) Hyperpolarization-activated calcium channels at the tip of *Arabidopsis* root hairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **97**(17): 9801-6.

- Vieira H.L., Alves P.M. and Vercelli A. (2011) Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species. *Progress in Neurobiology* **93**(3): 444-55.
- Wang S., Ramachandran A. and Ja S.J. (2009) Integrated microring resonator biosensors for monitoring cell growth and detection of toxic chemicals in water. *Biosensors & Bioelectronics* **24**(10): 3061-6.
- Wang W. (1990) Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research* **52**(1): 7-22.
- Wang X., Wang Z., Yao Y., Li J., Zhang X., Li C., Cheng Y., Ding G., Liu L. and Ding Z. (2011) Essential role of ERK activation in neurite outgrowth induced by alpha-lipoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* **1813**(5): 827-38.
- Wegener J., Keese C.R. and Giaever I. (2000) Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Experimental Cell Research* **259**(1): 158-66.
- Welsch R., Medina J., Giuliano G., Beyer P. and Von Lintig J. (2003) Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**(3): 523-34.
- Whelan R.J. and Zare R.N. (2003) Single-cell immunosensors for protein detection. *Biosensors & Bioelectronics* **19**(4): 331-336.
- Wiest J., Stadthagen T., Schmidhuber M., Brischwein M., Ressler J., Raeder U. and Grothe H. (2006) Intelligent mobile lab for metabolics in environmental monitoring. *Analytical Letters* **39**: 1759–1771.
- Wolf B., Kraus M., Brischwein B., Ehret R., Baumann W. and Lehmann M. (1998) Biofunctional hybrid structures-cell-silicon hybrids for applications in biomedicine and bioinformatics. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **46**: 215–225.
- Wolf P., Hartl F., Brischwein M. and Wolf B. (2011) Determination of dynamic doxorubicin-EC50 value in an automated high-content workstation for cellular assays. *Toxicology In Vitro* **25**(8): 1889-94.
- Wu H., Ichikawa S., Tani C., Zhu B., Tada M., Shimoishi Y., Murata Y. and Nakamura Y. (2009) Docosahexaenoic acid induces ERK1/2 activation and neuritogenesis

- via intracellular reactive oxygen species production in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1791**(1): 8-16.
- Xanthoudakis S., G. Miao, F. Wang, Y. C. Pan and T. Curran (1992) Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO Journal* **11**(9): 3323-35.
- Xi B., Yu N., Wang X., Xu X. and Abassi Y.A. (2008) The application of cell-based label-free technology in drug discovery. *Journal of Biotechnology* **3**(4): 484-95.
- Xin M.G., Zhang J., Block E.R. and Patel J.M. (2003) Senescence-enhanced oxidative stress is associated with deficiency of mitochondrial cytochrome C oxidase in vascular endothelial cells. *Mechanisms of Ageing and Development* **124**(8-9): 911-9.
- Yamazaki T., Kawai C., Yamauchi A. and Kuribayashi F. (2011) A highly sensitive chemiluminescence assay for superoxide detection and chronic granulomatous disease diagnosis. *Tropical Medicine & Health* **39**(2): 41-5.
- Yang M., Nazhat N.B., Jiang X., Kelsey S.M., Blake D.R., Newland A.C. and Morris C.J. (1996) Adriamycin stimulates proliferation of human lymphoblastic leukaemic cells via a mechanism of hydrogen peroxide (H₂O₂) production. *British Journal of Haematology* **95**(2): 339-44.
- Yao D., Vlessidis A.G., Evmiridis N.P., Zhou Y., Xu S. and Zhou H. (2002). Novel chemiluminescence method for detection of superoxide anion and its application to dry - cured meat. *Analytica Chimica Acta* **467**: 145–153.
- Yu Q. and Rengel Z. (1999) Micronutrient deficiency influences plant growth and activities of superoxide dismutases in narrow-leaved lupins. *Annals of Botany* **83**: 175-182.
- Yukioka T., Tanaka H., Ikegami K. and Shimazaki S. (1996) Free radicals and surgical stress. *Nihon Geka Gakkai Zasshi* **97**(9): 716-20.
- Zanetti M., d'Uscio L.V., Peterson T.E., Katusic Z.S. and O'Brien T. (2005) Analysis of superoxide anion production in tissue. *Methods in Molecular Medicine* **108**: 65-72.
- Zeira M., Tosi P.F., Mouneimne Y., Lazarte J., Sneed L., Volsky D.J. and Nicolau C. (1991) Full-Length Cd4 Electroinserted in the Erythrocyte-Membrane as a Long-Lived Inhibitor of Infection by Human-Immunodeficiency-Virus.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(10): 4409-4413.
- Ziauddin J. and Sabatini D.M. (2001) Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature* **411**(6833): 107-110.
- Zuo L., Pasniciuc S., Wright V.P., Merola A.J. and Clanton T.L. (2003) Sources for superoxide release: lessons from blockade of electron transport, NADPH oxidase, and anion channels in diaphragm. *Antioxidants & Redox Signaling* **5**(5): 667-75.
- Καραμπουρνιώτης Γ. (2003) Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών. Οι λειτουργίες των φυτών κάτω από αντίξοες συνθήκες. *Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ*
- Κλώνης Ι. (1997) Ενζυμική Βιοτεχνολογία. Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης.
- Μαρινοπούλου Ι. (2005) Ανάπτυξη κυτταρικού βιοαισθητήρα για την μέτρηση του υπεροξειδίου του οξυγόνου και μελέτη της κυτταροδιαίρεσης και φυσιολογικών παραμέτρων συσχετιζόμενων με αυτήν, *Μεταπτυχιακή μελέτη Γ.Π.Α.*