

## Buňky a biosensory



- buňky jako biorekogniční element
- studium vlastností buněk pomocí biosensorových technologií

## Buněčný systém

- buňky jsou schopné velmi citlivě reagovat na různé podněty z okolí, zejména na přítomnost různých chemikálií
- biologický a biomedicínský výzkum
- farmaceutický vývoj nových léčiv
- detekce nových nebo neznámých toxických látek v podezřelých vzorcích – pokud nemáme k dispozici (nebo neznáme) konvenční biorekogniční molekuly (enzym, protilátka, DNA, ...)
- hlavní motivace = jaký je účinek testované látky na živý organismus

## Výhody buněčných sensorů

- biochemická složka v aktivním životním stavu - jedná se o mikrobiální, rostlinné nebo živočišné buňky nebo jejich subcelulární elementy (organely) nebo celé tkáně či orgány
- biokomponenta je v přirozeném prostředí - příznivé pro její aktivitu a stabilitu
- místo jediného enzymu lze použít celé metabolické reakční sekvence, optimalizované přirozenou cestou
- nejsou nutné izolační a purifikační kroky (nízká cema)
- pokud jsou zachovány životní podmínky - spontánní obnova využívané enzymové aktivity

## Mikrobiální sensory

- bakterie, sinice či kvasinky, imobilizované buď na povrchu převodníku (membránový typ) nebo ve formě předřazeného reaktoru
- problém - existence řady enzymových systémů v buňce; zlepšení selektivity:
  - indukce = přidavek potenciálního analytu = substrátu vyvolá zvýšenou tvorbu komponent metabolické dráhy
  - inhibice = potlačí se funkce nežádoucích aktivit
- imobilizace
  - zachycení buněk přefiltrováním přes vhodnou membránu ve formě „pasty“ nebo filmu uvnitř pórů membrány (filtrační papír, polyamid, celulóza). Dynamické vlastnosti výsledného sensoru budou záviset na tloušťce a porositě membrány a vlastnostech buněčné stěny mikroba.
  - stabilnější je zachycení buněk uvnitř gelu při jeho tvorbě. Nelze použít příliš drastické podmínky - agar, kolagen, želatinu, polyakrylamid nebo polyvinylalkohol.
  - kovalentní vazba buněk nevhodná - dojde ke zničení buněčné stěny.
- mikrobiální složku je nejčastěji možné spojit s kyslíkovou elektrodou, dále pak se sensory pro CO<sub>2</sub> nebo amoniak, je možné použití mediátorů přenosu elektronů (ferrikyanid)
- peroxid vodíku obvykle není produkován (toxický pro buňky)

## Mikrobiální sensory

- historicky - měření metabolitů (glukosa a další sacharidy, laktát) - dnes již překonáno
- speciální kmeny *Pseudomonas* - exotické aktivity, možnost detekovat aromatické uhlovodíky (benzen) i vysloveně toxické látky - fenol (dezinfekční prostředek)
- stanovení BSK (BOD, biochemical oxygen demand) - míra znečištění (odpadních) vod organickými polutanty
  - klasické měření trvá 5 dnů (BSK<sub>5</sub>)
  - biosensor - O<sub>2</sub> sensor s imobilizovaným mikroblem (*Trichosporon cutaneum*, *Bacillus subtilis* a *licheniformis*)
  - měří se rychlost respirace po přidavku vzorku, potřebná doba je přitom pouze několik minut
  - kalibračními substráty jsou obvykle směs glukosy a kyseliny glutamové

## Tkáňové řezy

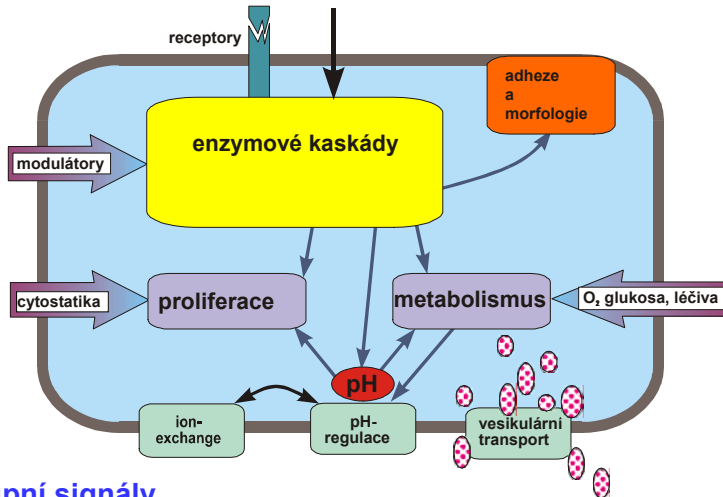
- tenký řez vhodné části rostliny se uchytí pomocí síťky před vlastní sensor

Rostlina (použitá část)	Enzym	Analyt
žampion (plodnice)	tyrosináza	fenoly
brambor (hlíza)	tyrosináza	fenoly
banán (dužina) (banantroda)	tyrosináza	dopamin
okurek, tykev (řez plodu, šťáva)	askorbát oxidáza	vitamin C
okurek		cystein
křen	peroxidáza	peroxid vodíku
sója	ureáza	močovina
chryzantémy (okvětní lístky)		aminokyseliny

## Buněčný systém - komplexnost

### vstupní signály

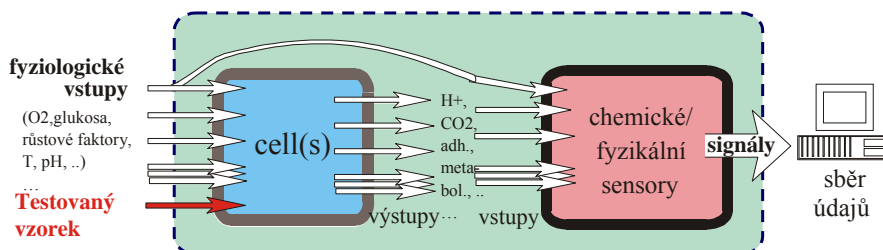
růstové faktory, antigeny/protilátky, hormony, adhezní faktory, teplota, pH, ...



### výstupní signály

pH, ionty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), regulační látky (NO, glutamát, ...), obranné (ROS - peroxid vodíku, superoxid. radikál), adheze, morfologie,  $\text{CO}_2$ , membr. potenciál, ...

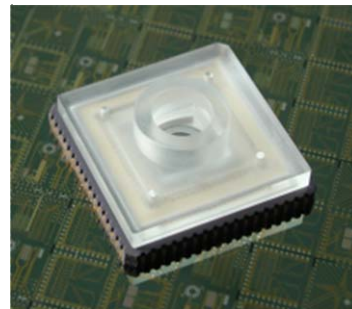
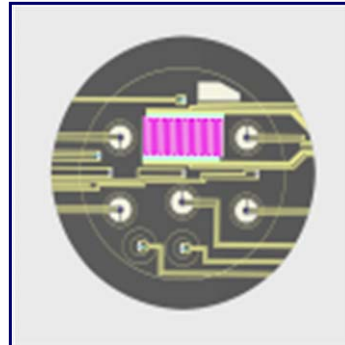
## Buněčný biosensor



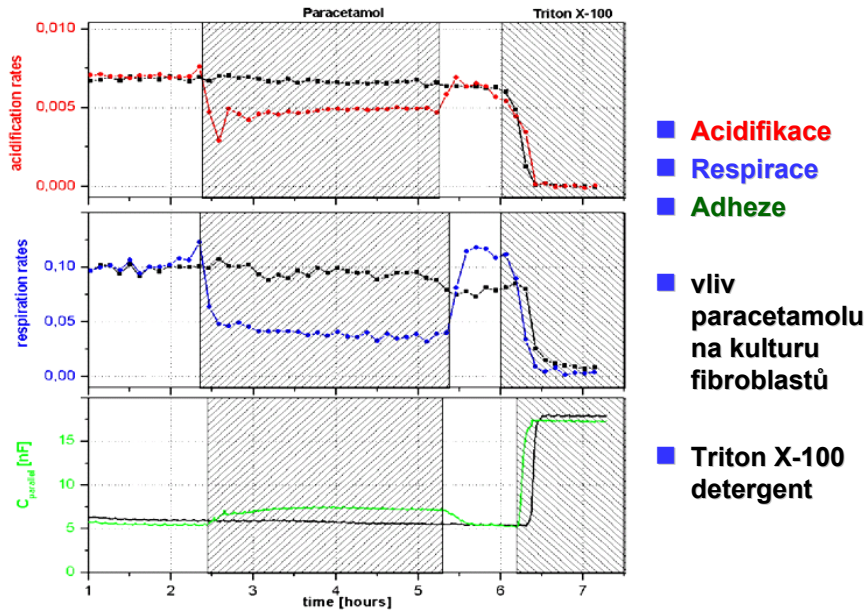
- přiblížení se in vivo stavu (sterilita, zajištění přísunu živin, biokompatibilita, ...)
- neinvazivní, on-line záznam
- **multiparametrický charakter**
- **čím více parametrů se podaří sledovat paralelně a současně, tím lépe se porozumí složitým buněčným odezvám**

## Měřicí systém

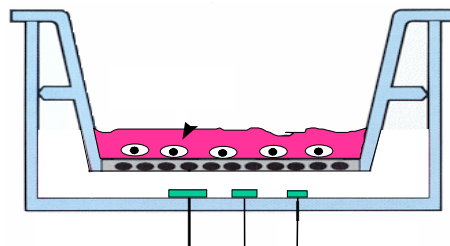
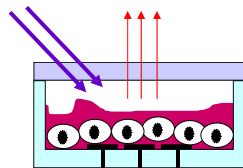
- acidifikace – pH ISFET
  - kyslík – Clarkův sensor
  - adheze – IDE (impedance)
  - ionty – ISFETy
  - teplota – Pt100
  - bioelektrické děje – mikroelektrody
- 
- CMOS technologie – miniaturizace, standardizace, kombinace sensorů a vyhodnocovací elektroniky na témž čipu – integrace, paralelizace



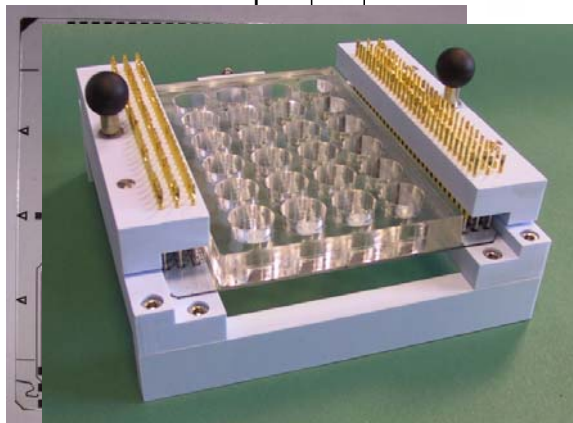
## Ukázka záznamu z biočipu

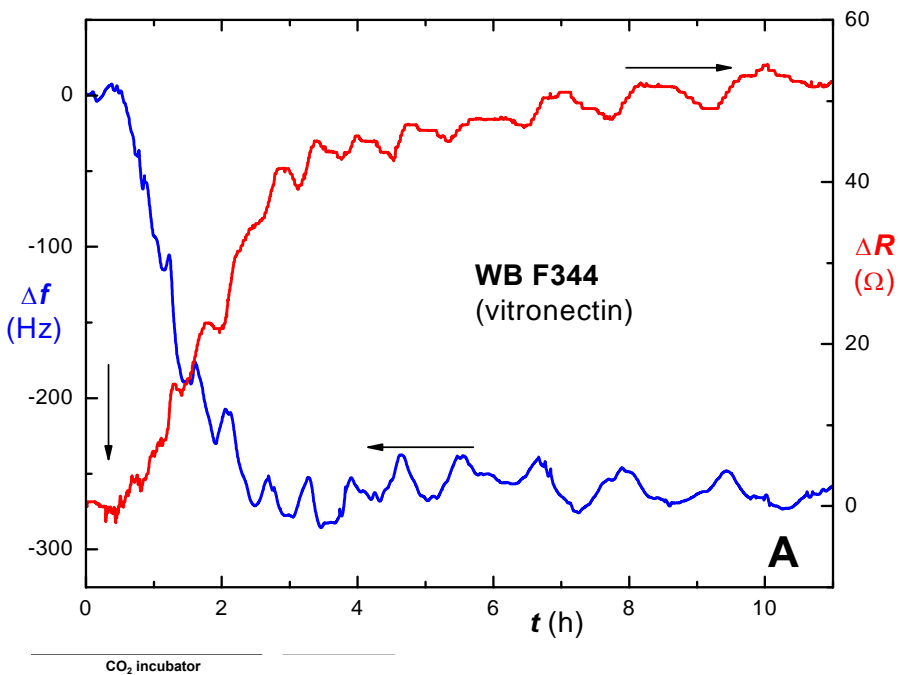
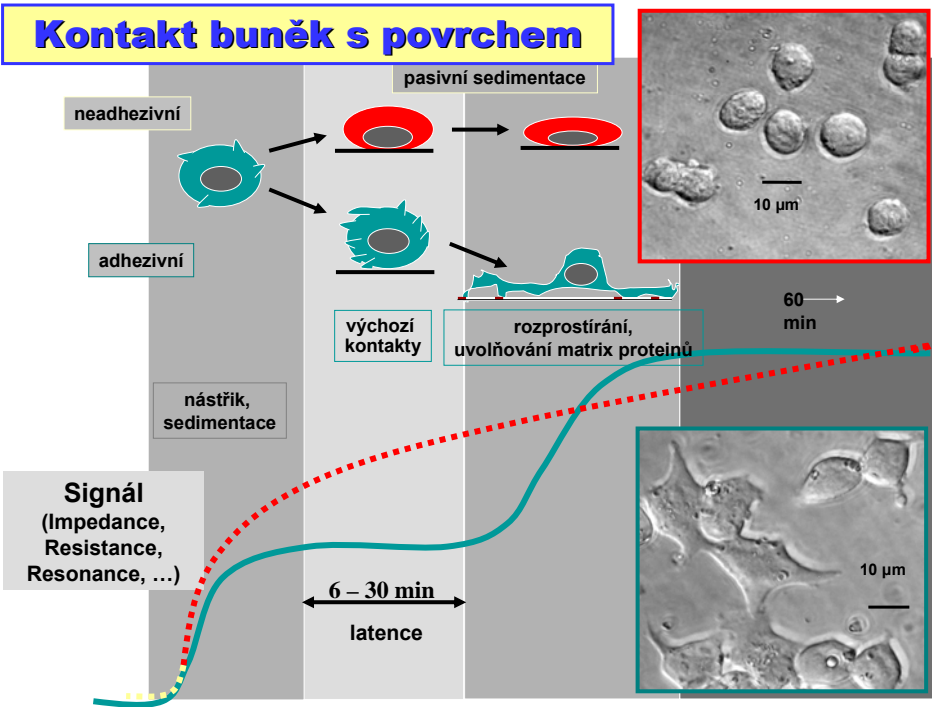


## Konfigurace



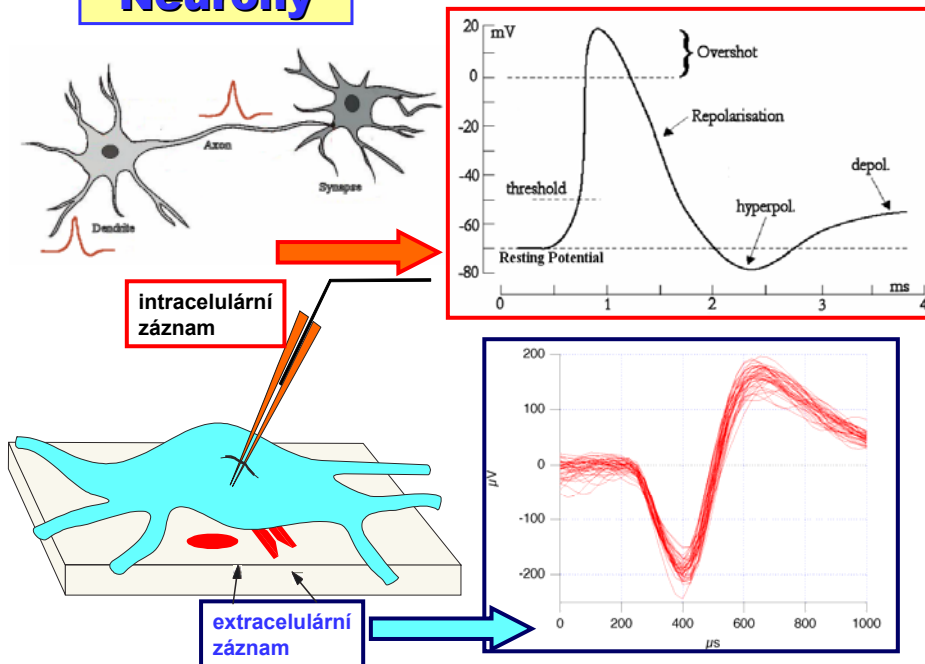
- kompaktní systém, buňky kultivovány přímo na povrchu (elektrochemických) sensorů, vhodné kombinovat i s fluorescenčním měřením
- buňky separovány od měřících sensorů pomocí vhodné membrány (kultivace na membránových insertech)





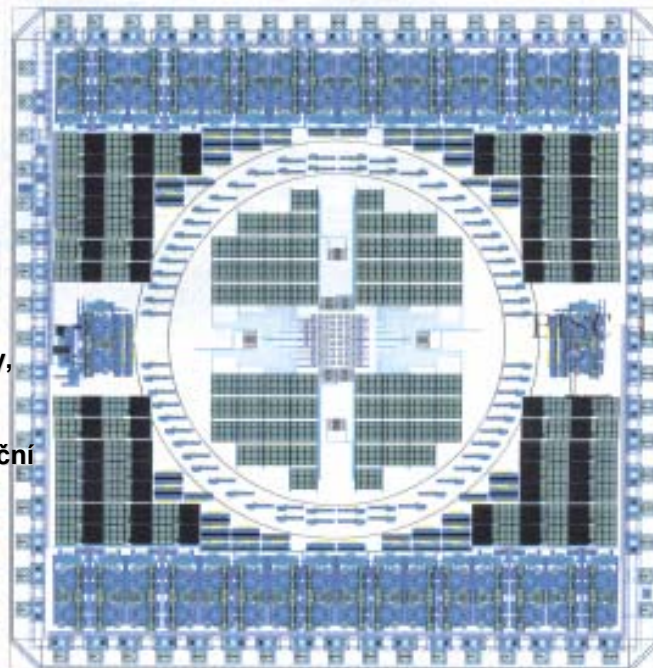


## Neurony



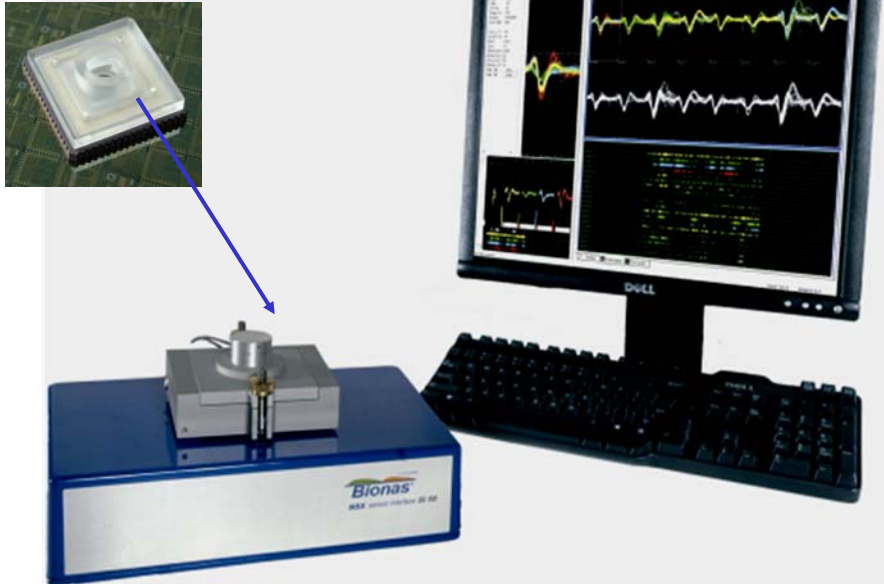
## Neuročip

- Akční potenciál - 8x CPFET a 64x microelda
- pH – 2x ISFET
- teplota – dioda
- integrovaná elektronika – filtry, zesilovače, multiplexer, I<sup>2</sup>C sběrnice, stimulační obvody





## Měřicí systém



## Buněčné biosensory

- značný potenciál do budoucna v oblasti výzkumu (šíření nervových vzruchů, umělá paměť, rozpoznávací a vyhodnocovací funkce, „učení“, ...)
- náhrada testů toxicity nových či podezřelých látek - dosud se provádí pomocí experimentálních zvířat
- vyhledávání a testování nových druhů léčiv
  
- komplikace
  - velmi komplexní systém, náchylný na poškození, není snadné udržovat v optimálním stavu
  - obtížné uchovávání a transport (musí se připravit in situ)
  - komplexní odezvy, informace bývá skryta v napohled chaotických datech - úloha chemometrie a software