

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 cena)**
- **pokud jsou zachovány životní podmínky - spontánní obnova využívané enzymové aktivity**



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 (BSK₅)
 - biosensor - O₂ 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



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 CO₂ nebo amoniak, je možné použití mediátorů přenosu elektronů (ferrikyanid)
- peroxid vodíku obvykle není produkován (toxický pro buňky)



Tkáňové řezy

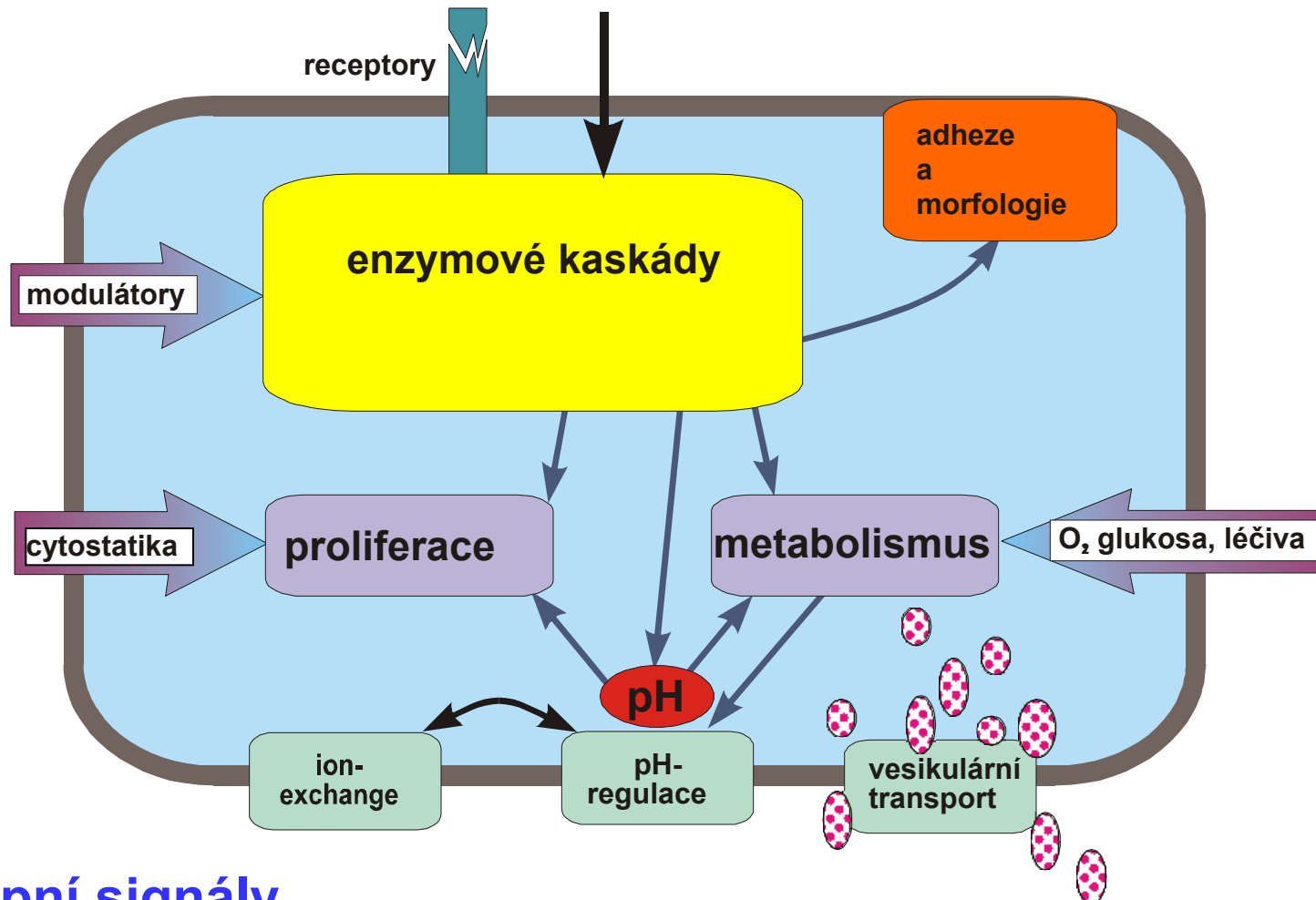
- tenký řez vhodné části rostliny se uchytí pomocí síťky před vlastní sensor



Buněčný systém - komplexnost

vstupní signály

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

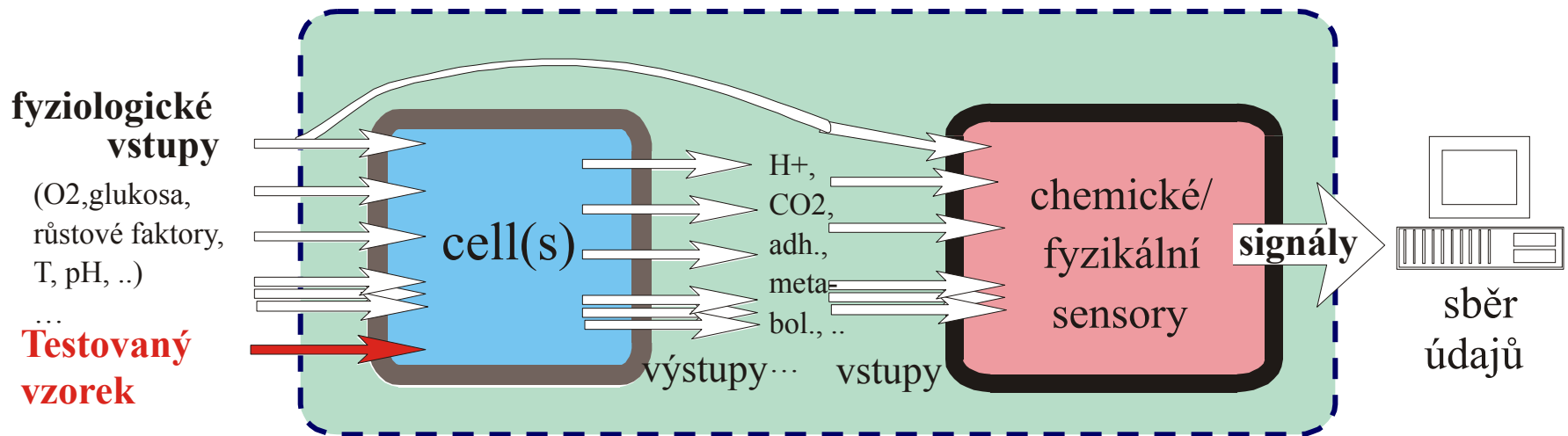


výstupní signály

pH, ionty (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻), regulační látky (NO, glutamát, ...), obranné (ROS - peroxid vodíku, superoxid. radikál), adheze, morfologie, CO₂, membr. potenciál, ...



Buněčný biosensor

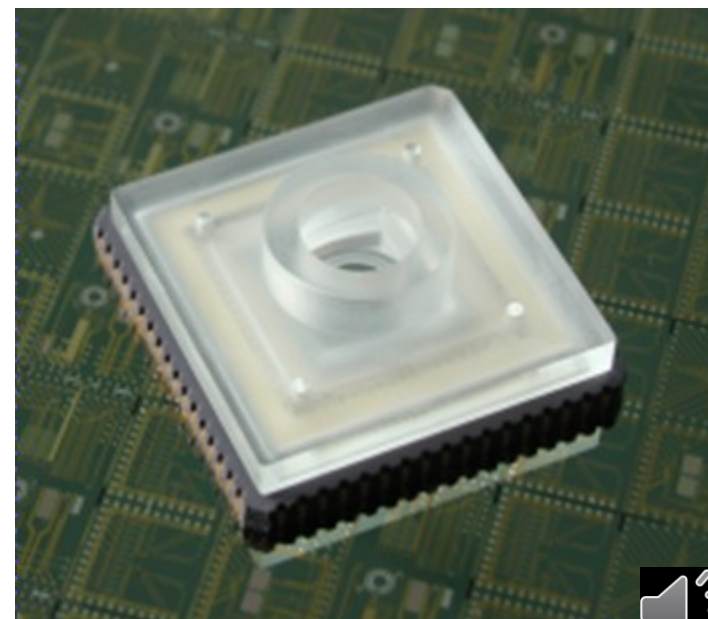
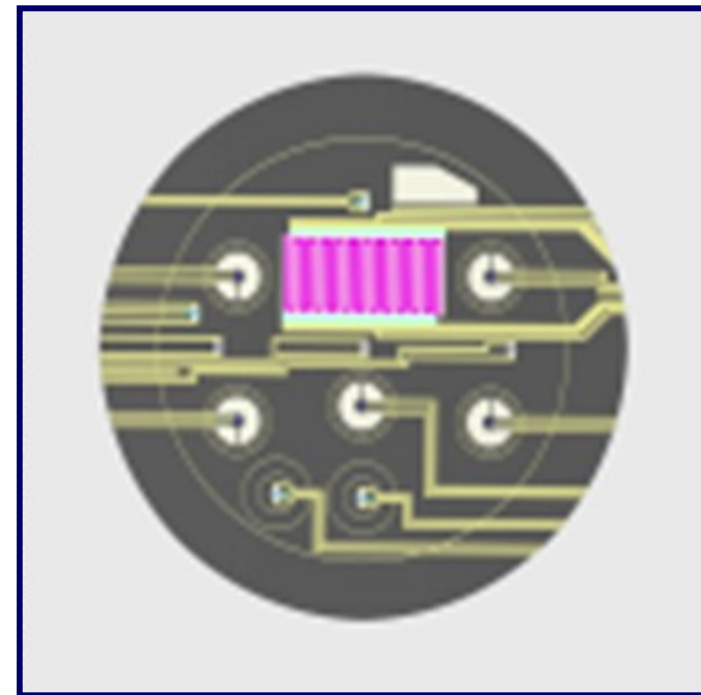


- přiblížení se in vivo stavu (sterilita, zajištění přísunu živin, biokompatibilita, ...)
- neinvazivní, on-line záznam
- multiparametrický charakter
- **čím více parametrů se podaří sledovat paralelně a současně, tím lépe se porozumí složitým buněčným odezvám**



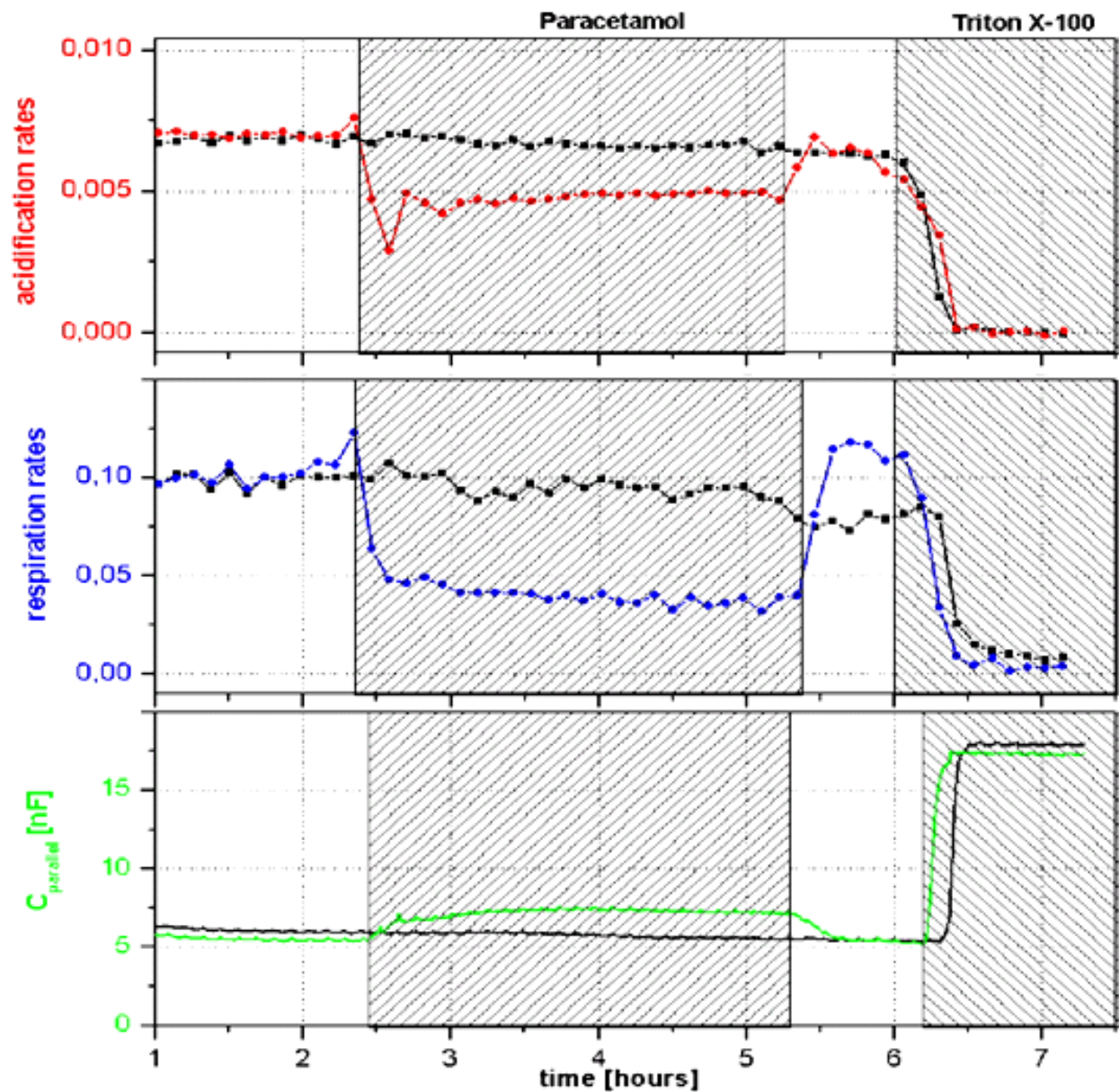
Měřicí systém

- 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



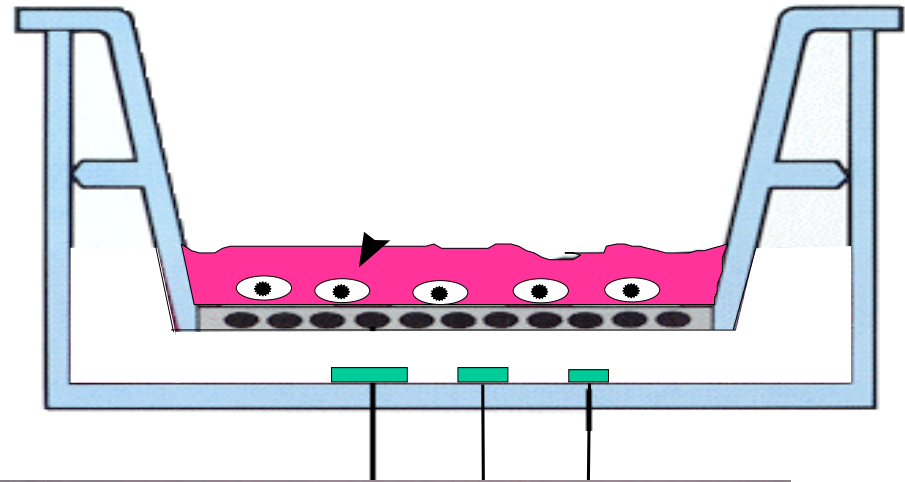
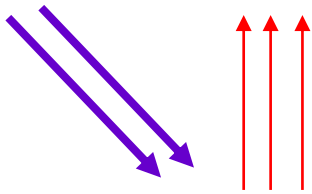
- Acidifikace
- Respirace
- Adheze

- vliv paracetamolu na kulturu fibroblastů

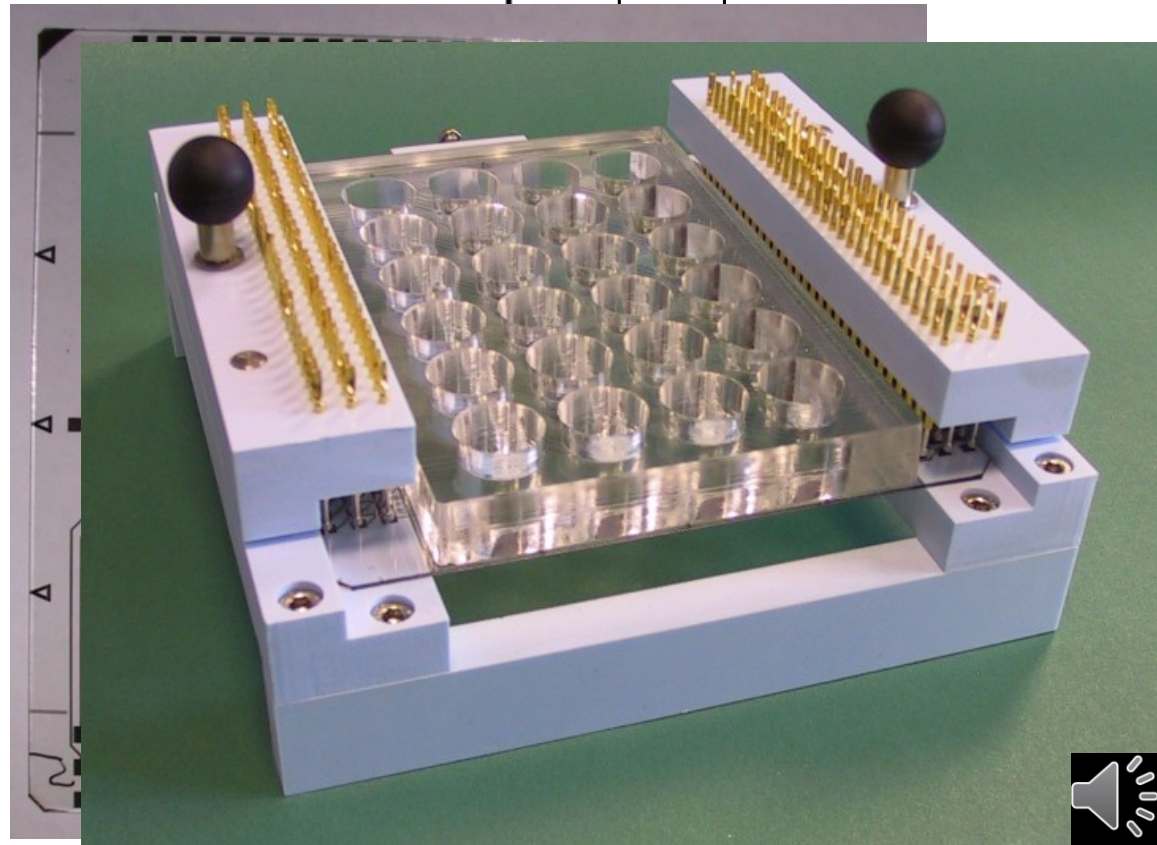
- Triton X-100 detergent



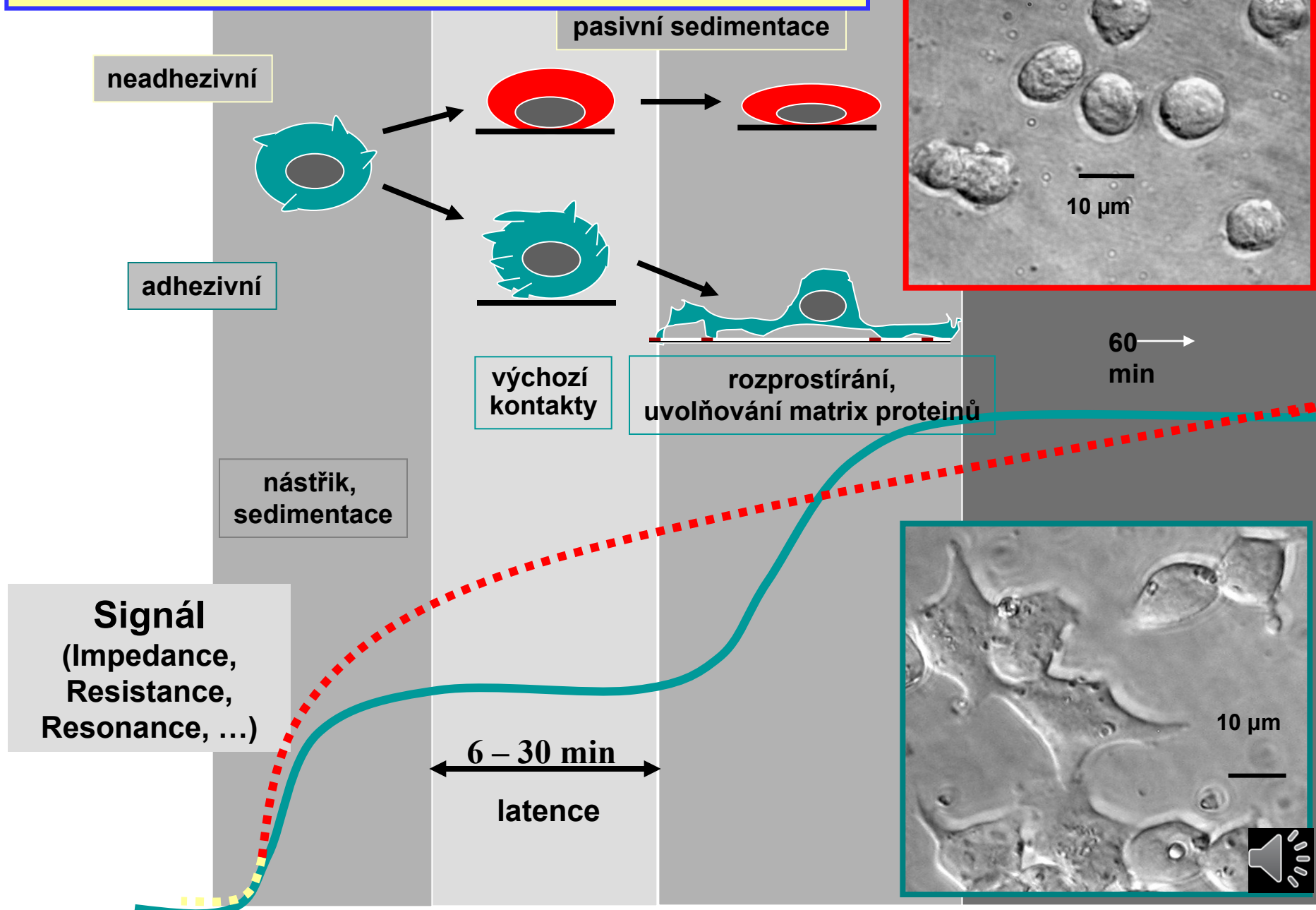
Konfigurace

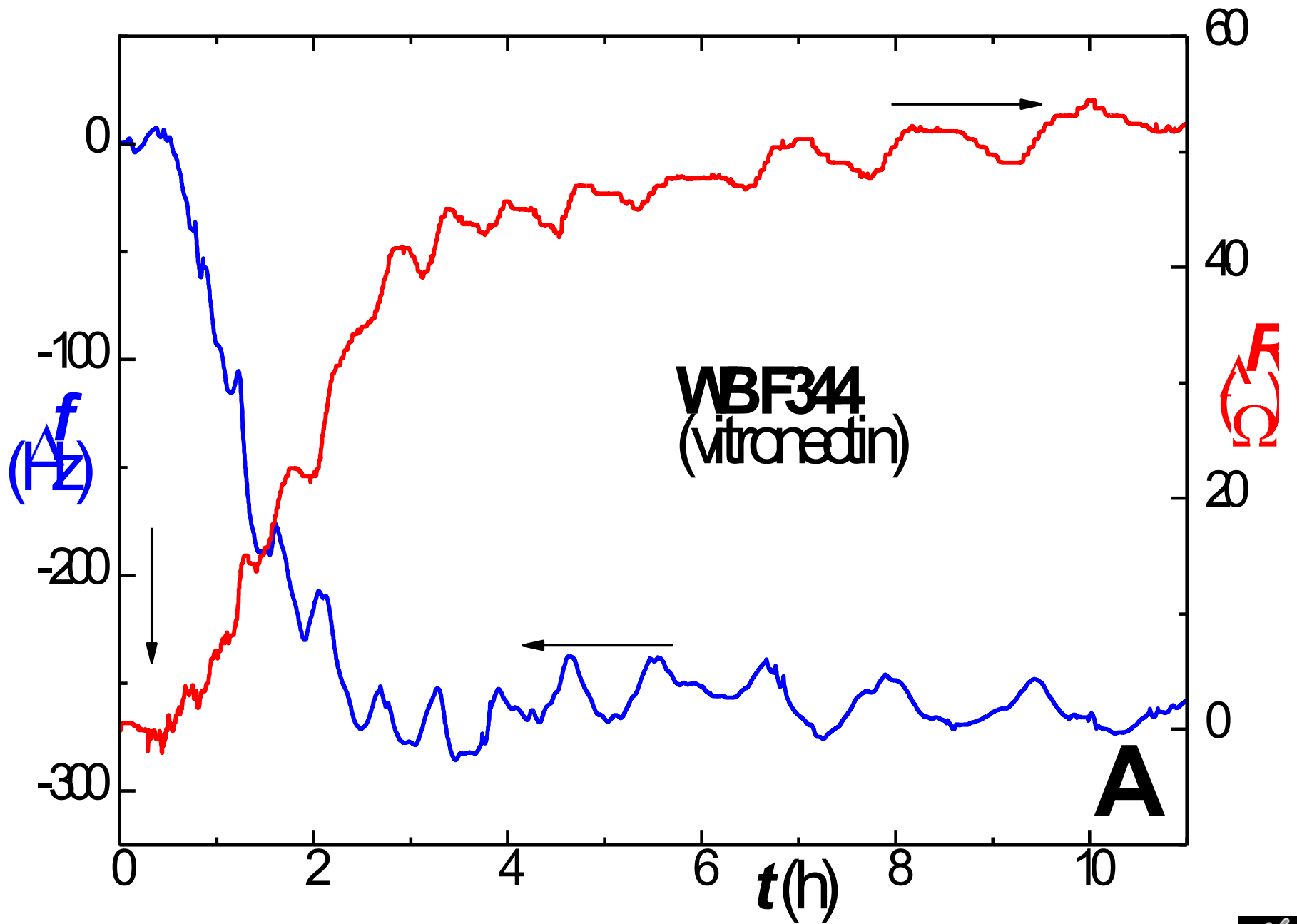


- kompaktní systém, buňky kultivovány přímo na povrchu (elektrochemických) sensorů, vhodné kombinovat i s fluorescenčním měřením
- buňky separovány od měřících sensorů pomocí vhodné membrány (kultivace na membránových insertech)



Kontakt buněk s povrchem





CO₂ incubator



Adheze – impedanční měření

- firma Roche – systém exCELLigence
- změna impedance Z v reálném čase



Microelectrode array
fabricated in the
bottom of the well



electrodes
without cells



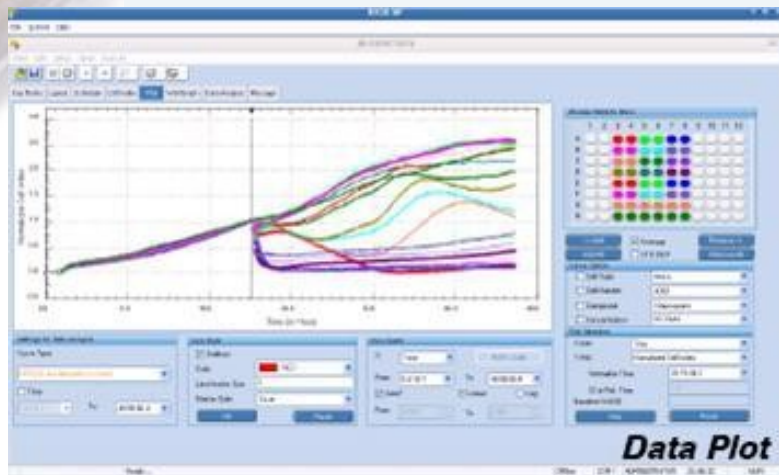
electrodes with
cells attached



$$Z = Z_0$$

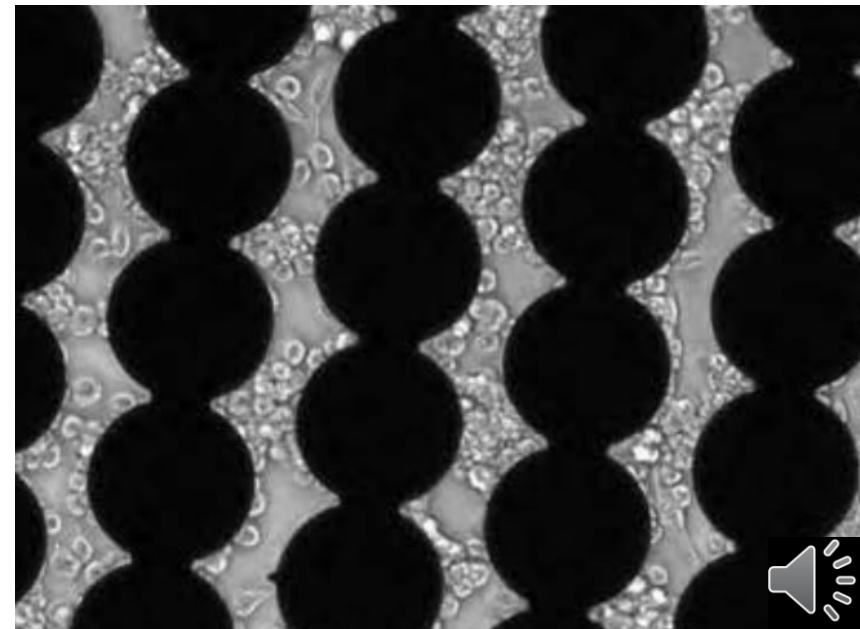
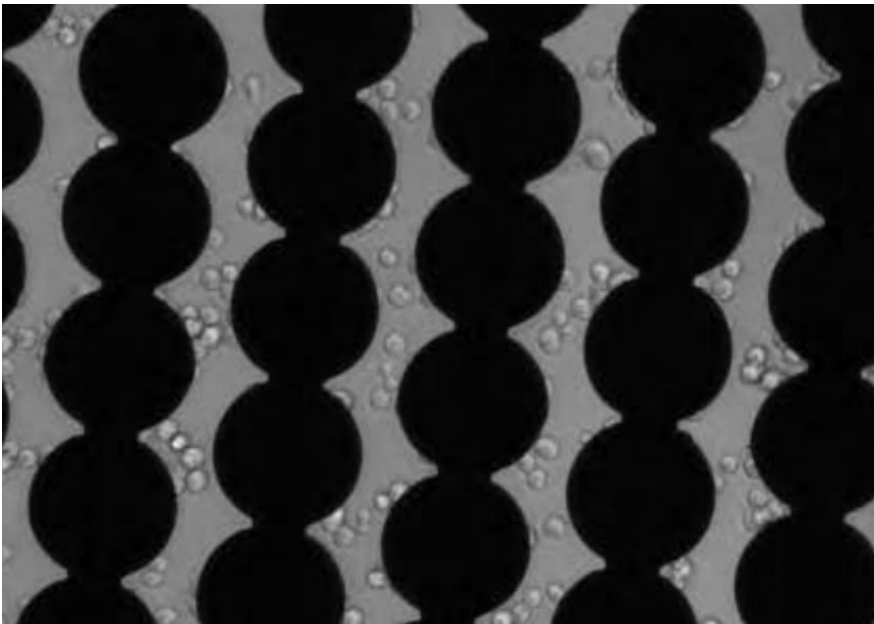
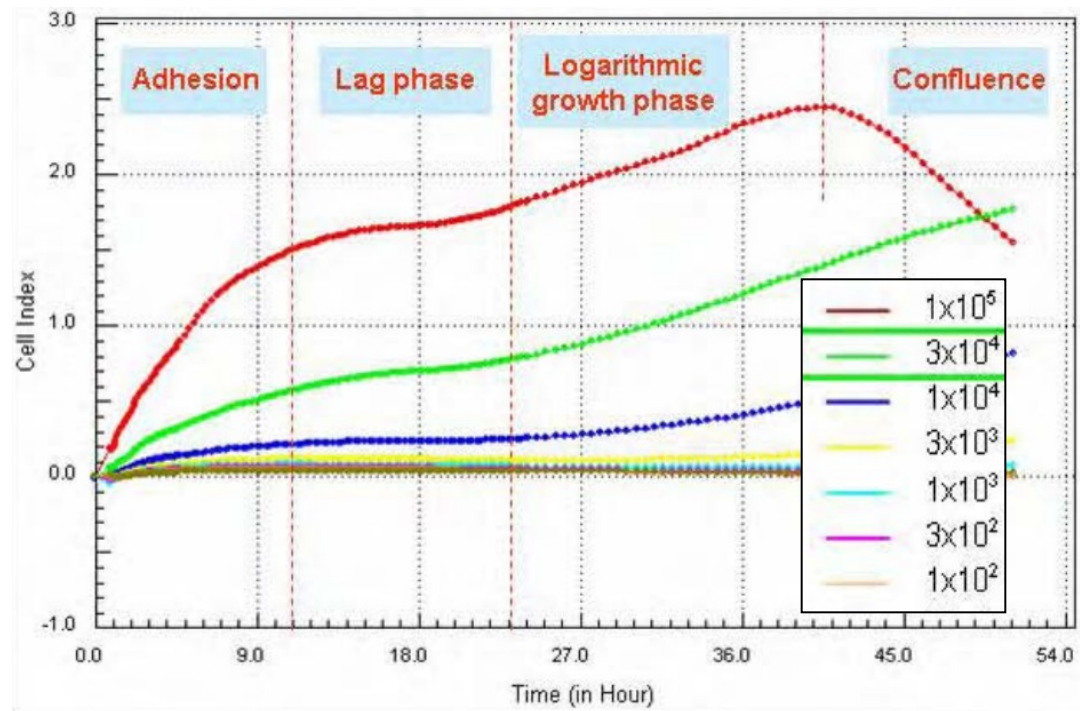


$$Z = Z_{\text{cell}}$$



Vazba buněk

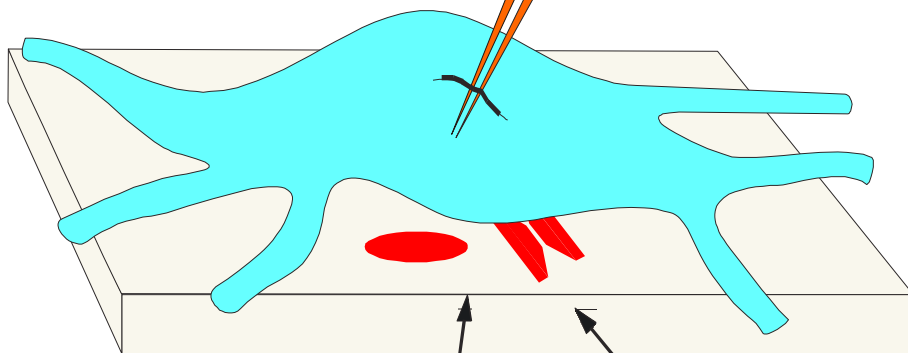
- jednotlivé fáze
- paralelní sledování mikroskopem



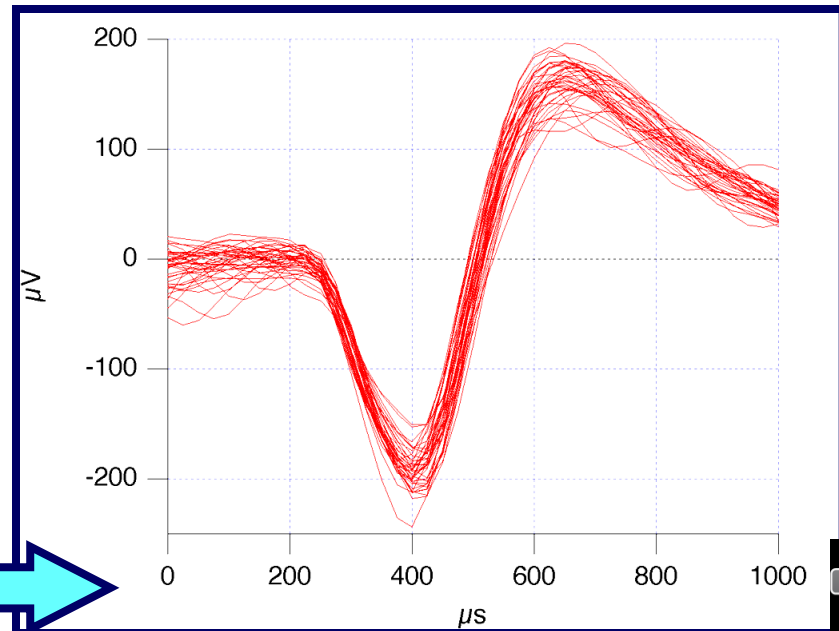
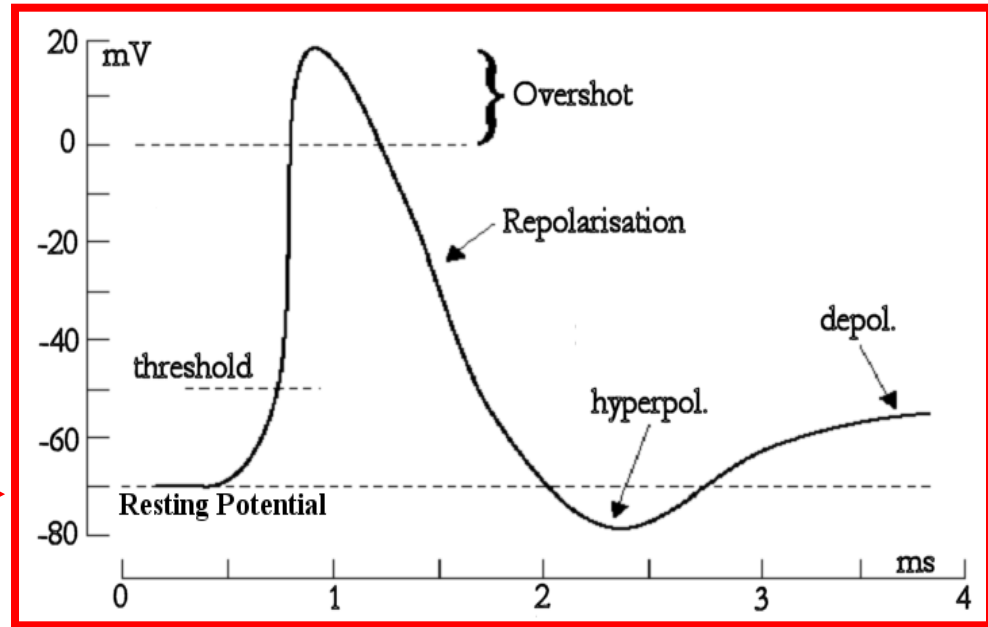
Neurony

■ buňky s elektrickou aktivitou

intracelulární
záznam



extracelulární
záznam



Neuročip

- Akční potenciál
- 8x CPFET
a 64x microelda
- pH – 2x ISFET
- teplota – dioda

- integrovaná
elektronika – filtry,
zesilovače,
multiplexer, I²C
sběrnice, stimulační
obvody



Měřicí systém



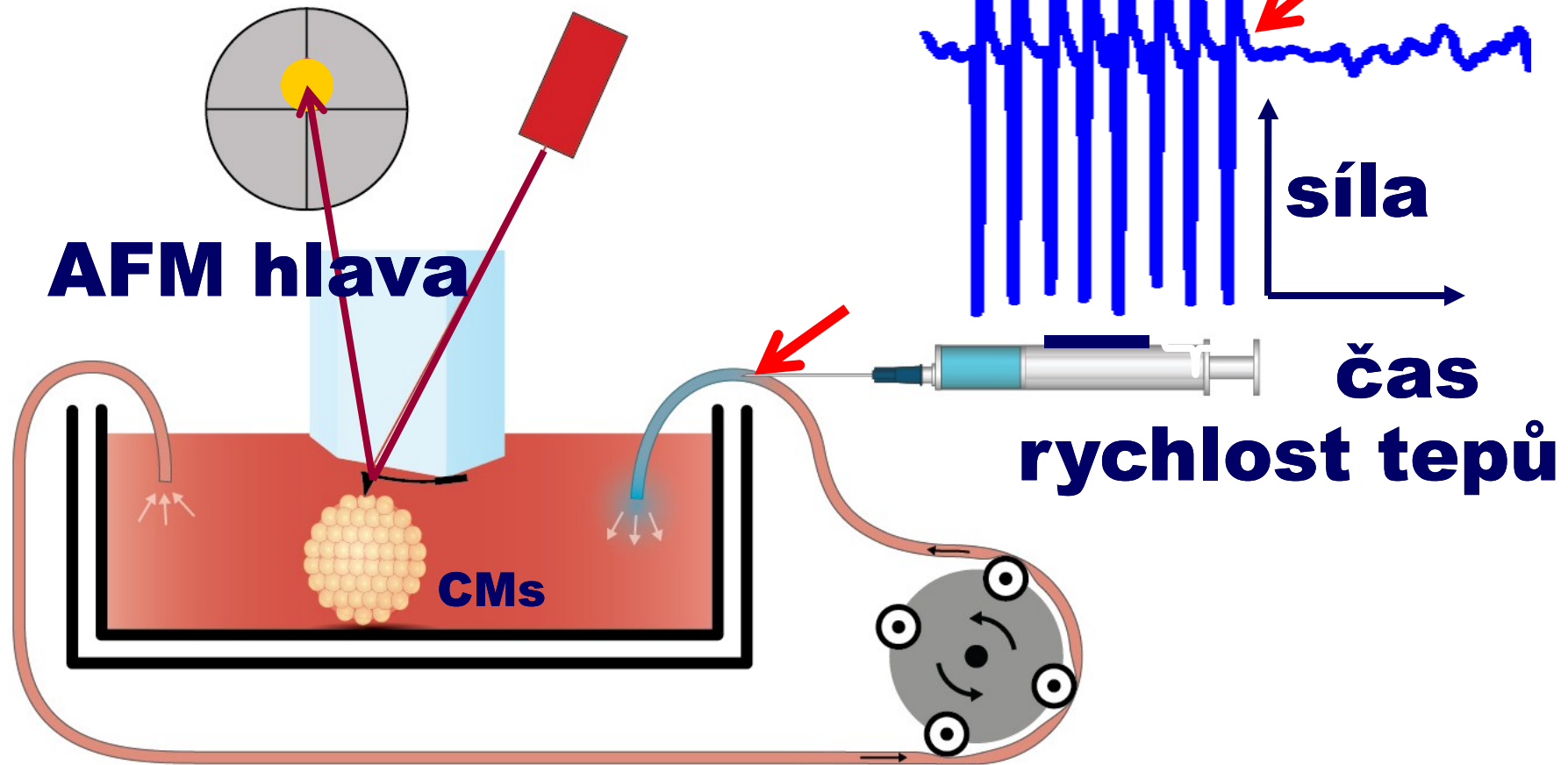
Buněčné biosensory

- **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**



Nano-biosensing s kardiomyocyty (CM)



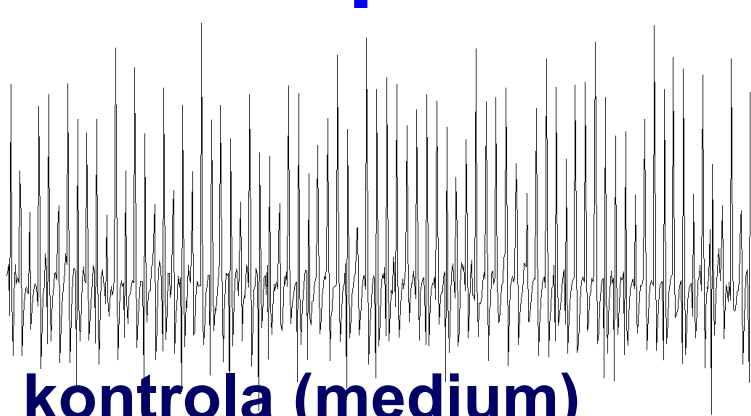
- sledování tepání kardiomyocytů je snadné (mikroskop, video)
- nanomechanický převodník – kantilevr z AFM systému – síla tepů - mechanokardiogram
- efekty testovaných látek v reálném čase
- klinický buněčný model – studium srdečních poruch: Duchennova svalová dystrofie, arytmie, Fabryho nemoc, ...



Výchylka katilevru v čase pro různé testované látky

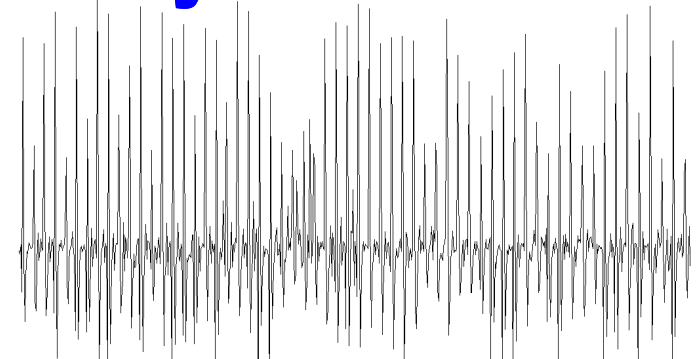
A

kontrola (medium)



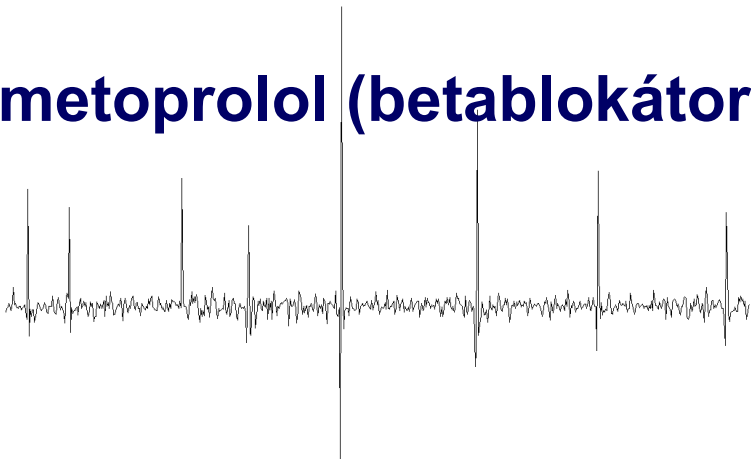
C

isoproterenol (aktivátor)



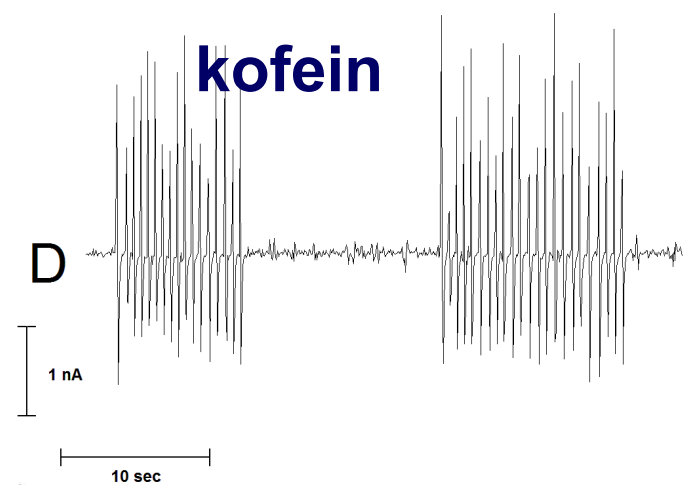
metoprolol (betablokátor)

B

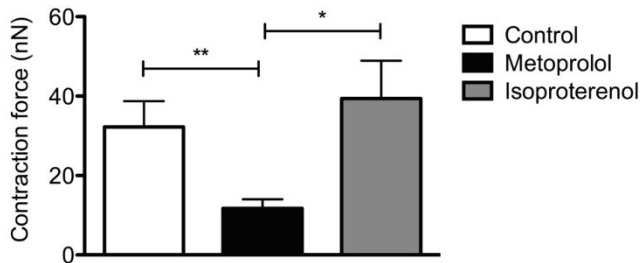


kofein

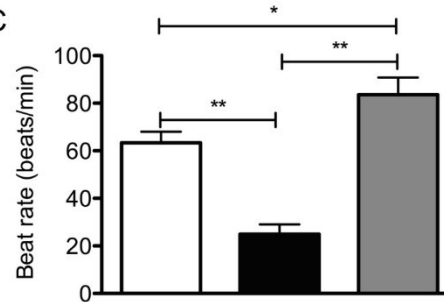
D



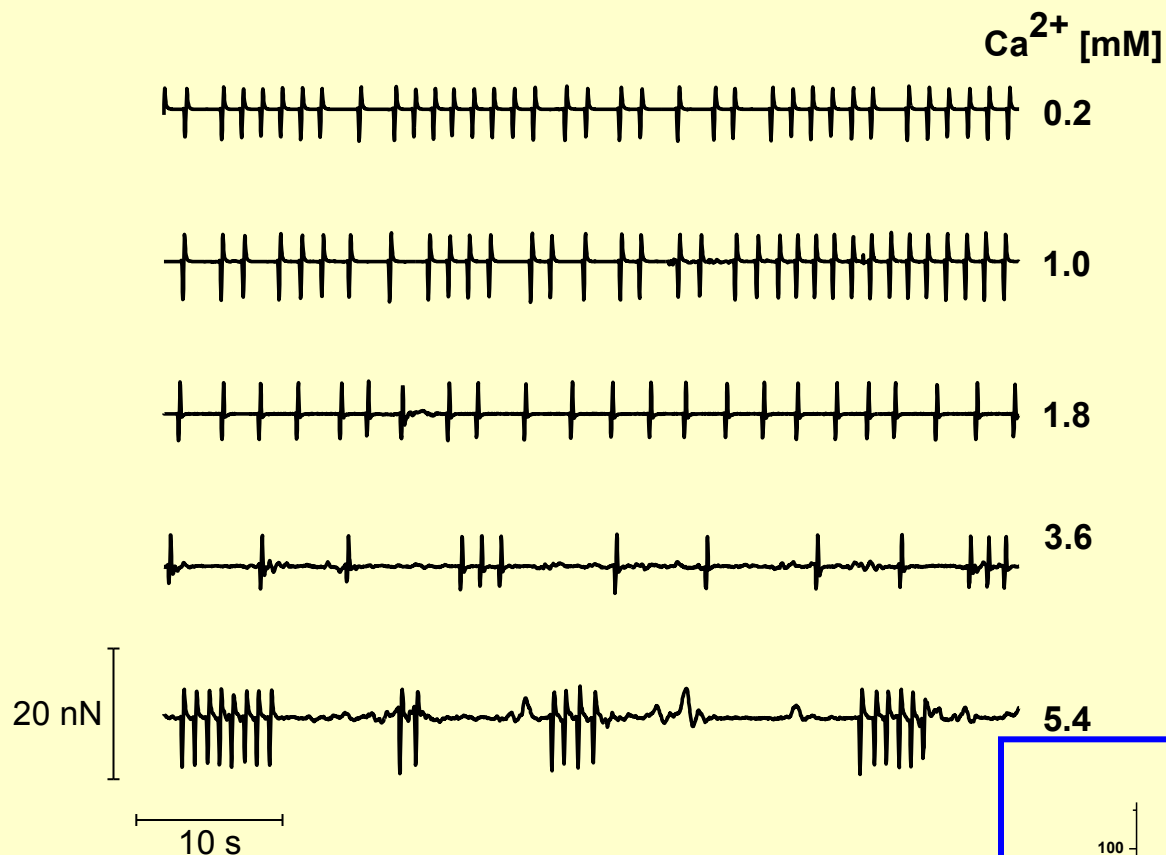
B



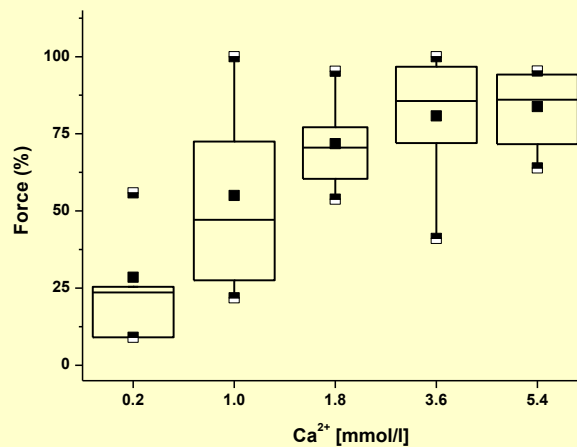
C



Vliv vápníku

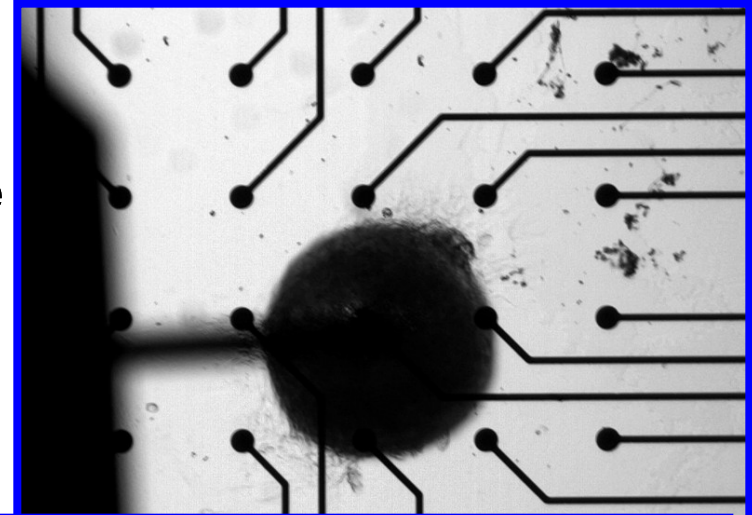


‘heart on chip’

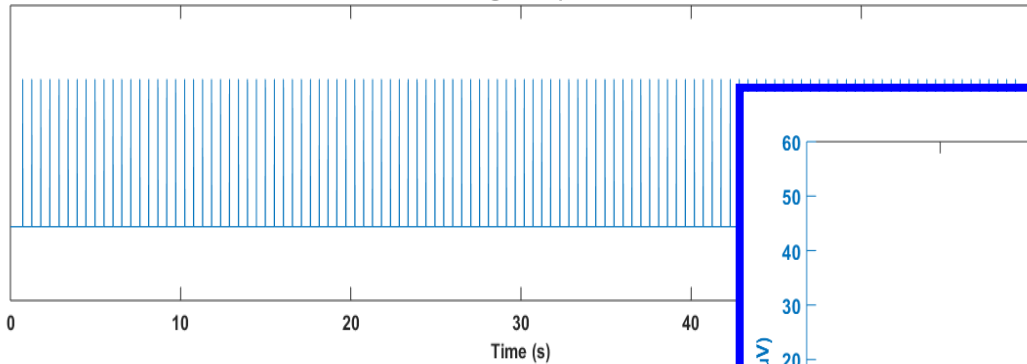


Síla a elektrický potenciál

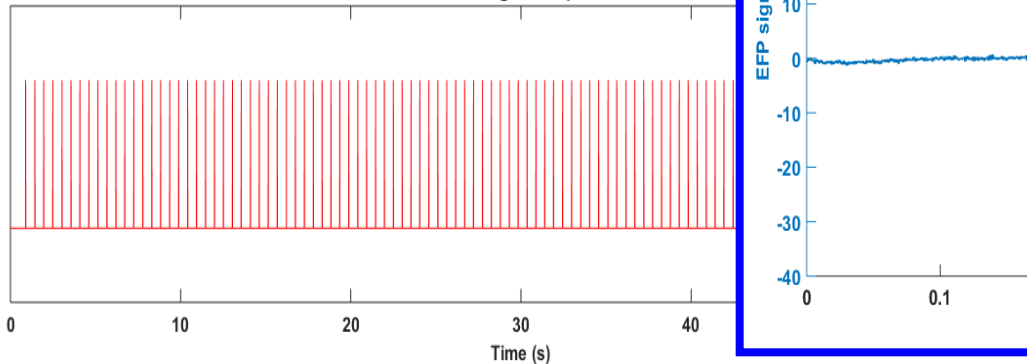
- CMs zachyceny na povrchu pole mikroelektrod
- synchronní záznam síly tepu a iniciace změnou el. potenciálu



Firing rasterplot



Beating rasterplot



Averaged EFP and Cell height signals

