



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ
ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ
ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ,
ΒΙΟΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ**

DACHUN YAO

**Τμήμα Χημείας
Σχολή Θετικών Επιστημών
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2001

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Τομέα Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά την περίοδο 1997-2001.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον Επιβλέποντα Καθηγητή μου, Καθηγητή Δρ. Νικόλαο Π. Ευμοιρίδη για την ευγενική καθοδήγηση και τη συνεχή ενθάρρυνση σε όλη τη διάρκεια της εργασίας μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Δρ. Μαρία Σακαρέλλου και τον Καθηγητή Δρ. Κωνσταντίνο Δραίνα (μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής μου) για την ευγενική υποστήριξή τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους του Εργαστηρίου λέκτορα Δρ. Αθανάσιο Βλεσσίδα, Δρ. Κωνσταντίνο Τριανταφυλλίδη, δ. Μελίνα Κώττη, κ. Βασίλειο Τσιατούρα, κ. Θεόδωρο Κατράνα και κ. Kang Dai για την άριστη συνεργασία και τις εποικοδομητικές συζητήσεις που είχα μαζί τους.

Ευχαριστώ επίσης τους κ.κ. Αριστείδη Καλλιμάνη και Haimou Zhang, καθώς και όλους τους συναδέλφους από το Εργαστήριο Βιοχημείας για την τεχνική υποστήριξη που μου παρείχαν όταν πραγματοποίησα πειράματα αλληλουχίας DNA στο Εργαστήριο τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την γυναίκα μου κα. Li Tao και όλα τα μέλη της οικογένειάς μου για την ευγενική τους υποστήριξη και την ενθάρρυνσή τους κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να αναφερθώ στο Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών της Ελλάδας (ΙΚΥ) για την χορήγηση υποτροφίας την περίοδο 1998-2001.

Dachun Yao

Ιωάννινα 20 Ιουνίου 2001

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	ΓΕΝΙΚΑ	1
1.2	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΧΗΜΕΙΟ- ΚΑΙ ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ	3
1.3	DNA ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	20
1.4	ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ	47
1.5	ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	67
1.6	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	69
2	ΣΧΕΔΙΑΣΗ-ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ-ΤΕΧΝΙΚΕΣ-ΜΕΘΟΔΟΙ	79
2.1	ΥΛΙΚΑ	79
2.2	ΣΥΣΚΕΥΕΣ	84
2.3	ΜΕΘΟΔΟΙ	89
2.4	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ – ΝΟ	97
2.5	ΣΥΝΘΕΤΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ	98
2.6	ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ	103
2.7	ΑΝΙΧΕΥΤΙΚΟΙ ΚΑΘΕΤΗΡΕΣ (PROBES)	111
2.8	ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	113
2.9	ΠΡΟΤΥΠΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	116
2.10	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΟΡΓΑΝΩΝ	118
2.11	ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ	118
3.	ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ FIA/ΧΦ-ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	120
3.1	ΓΕΝΙΚΑ	121
3.2.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΝΟ-ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΕΠΙ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΡΟΗΣ ΠΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΚΑΝΑΛΙ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΠΟΛΥ ΚΑΝΑΛΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΡΟΗΣ/ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΤΟΥΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	127
3.3	ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΠΟΡΦΥΡΙΝΙΚΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΕΤΑΙ ΑΠΟ ΚΑΝΑΛΙ ΡΟΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΠΟΛΥ ΚΑΝΑΛΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΡΟΗΣ/ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΤΟΥΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	145
3.4	ΜΕΜΒΡΑΝΟΕΙΔΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΠΤΗΣ ΓΙΑ ΕΛΕΥΘΕΡΟ-ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΝΟ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΣΥΣΚΕΥΗ ΠΟΛΥΚΑΝΑΛΙΚΗΣ ΡΟΗΣ/ΧΦ-ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	161
3.5.	ΜΙΑ ΝΕΑ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΟΥ ΝΟ IN VIVO ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΔΙΑΠΙΔΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ	178
3.6	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ ΚΑΙ ΧΟΛΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΝΕΥΡΙΚΟ ΙΣΤΟ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΩΝ ΜΕ ΣΥΝΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΑ	196
3.7	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	212
4.	ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	221
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	225
	ABSTRACT	228



**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

Ιωάννινα 25-06-2001

Δ/ΝΣΗ : Παν/πολη
ΤΗΛΕΦΩΝΟ : (0651) 97195
ΦΑΞ : (0651) 97006
ΠΛΗΡ/ΡΙΕΣ : Σ. Βαμβέτσου

Αρ.Πρωτ.: 1808

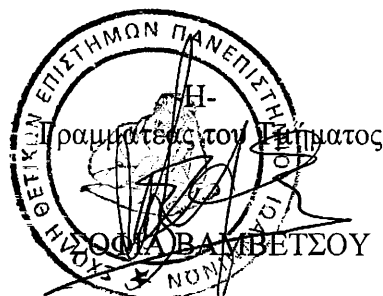
Προς
Τους κ.κ.

- +1. Νικ. Ευμοιρίδη, καθηγητή Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων (ως επιβλέπων)
- +2. Μαρία Σακαρέλλου, καθηγήτρια Τμήμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαν.
- +3. Κων/νο Δραΐνα, καθηγητή, Τμήμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαν.
- ✓ 4. Κων/νο Σεφεριάδη, καθηγητή Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαν.
- 5. Αντ. Καλοκαιρινό, αναπλ. καθ. Τμήμ. Χημείας Παν/μίου Αθηνών
- +6. Αλέξ. Τσελέπη, αναπλ. καθηγητή, Τμήμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαν. &
- +7. Βασ. Τσίκαρη, αναπλ. καθ. Τμήμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

ΘΕΜΑ : « Δημόσια παρουσίαση διδακτορικής διατριβής από τον υποψήφιο κ. Dachun Yao.»

Σας γνωρίζουμε ότι την Παρασκευή 29-06-01 και ώρα 13:00 μ.μ. στην αίθουσα X3-230 (αίθουσα σεμιναρίων) θα γίνει παρουσίαση της διδακτορικής διατριβής από τον υποψήφιο κ. Dachun Yao.

Παρακαλούμε να παραβρεθείτε.



Κοινοποίηση:

- κ. Yao Dachun
- Τομείς
- Σύλλογο Μ.Σ.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Μια γενική εισαγωγή της χήμειο- και βιοφωταύγειας περιγράφεται με στόχο την ανίχνευση ενώσεων που χρησιμοποιούνται σαν βιοϊατρικοί δείκτες.

Η Χήμειο- και Βιοφωταύγεια χρησιμοποιήθηκαν ευρύτατα για την ανάλυση των πρωτεϊνών, DNA, RNA, ενζύμων, υποστρωμάτων, παρεμποδιστών, μεταλλοϊόντων, βιομάζας και άλλων. Στην ανασκόπηση αυτή αναπτύσσονται διάφορες συμπεριφορές σχετικά με την ανίχνευση του μονοξειδίου του αζώτου, του DNA, των πρωτεϊνών, της εύρεσης της αλληλουχίας του DNA και άλλων τεχνικών για περαιτέρω εφαρμογές. Το άρθρο αυτό αποτελείται από 4 κεφάλαια.

Το Κεφάλαιο 1 επικεντρώνεται στις τεχνικές χήμειο- και βιοφωταύγειας. τεχνικές της βιοφωταύγειας αναφέρονται κυρίως στο σύστημα Luciferase/Luciferin και την εφαρμογή των στον προσδιορισμό της κρεατινίνο-κινάσης. Οι τεχνικές χήμειοφωταύγειας βασίζονται κατά κύριο λόγο στα αντιδραστήρια λουμινόλη, εστέρες της ακριδίνης, και στα ένζυμα της horseradish (καρότο) περοξειδάσης και αλκαλικής φωσφατάσης. Ακόμη, ανασκοπούνται οι σχετικές τεχνικές αποτύπωσης φωτογραφίας σε φωτογραφικό φιλμ και οι τεχνικές χήμειο- και βιοφωταύγειας.

Το Κεφάλαιο 2 εστιάζεται κατά κύριο λόγο στις τεχνικές ανίχνευσης των πρωτεϊνών και του DNA. Περιγράφονται μέθοδοι ανίχνευσης πρωτεϊνών και απτενίων με διαφορετικούς ανοσοπροσδιορισμούς και κυρίως με τεχνικές χήμειο- και βιοφωταύγειας. Ακόμη, αναφέρονται λεπτομέρειες για τις μεθόδους προκατεργασίας και μεθόδους ανίχνευσης με όλα τα είδη τεχνικών υβριδισμού. Τέλος, ανασκοπούνται οι σχετικές βοηθητικές τεχνικές όπως ο καθαρισμός των ενζύμων, των αντισωμάτων, οι μέθοδοι σήμανσης του DNA, οι μέθοδοι ακινητοποίησης των πρωτεϊνών και του DNA.

Το Κεφάλαιο 3 αναφέρεται στις γενικές γνώσεις για το Μονοξείδιο του Αζώτου που είναι ένα είδος πολύ σημαντικό στον ανθρώπινο οργανισμό. Περιγράφονται όλες οι ιδιότητες του μονοξειδίου του αζώτου και οι διαφορετικές συμπεριφορές σε διάφορες συνθήκες περιλαμβάνοντας τις *in vivo* και τις *in vitro*. Ανασκοπούνται οι διαφορετικές μέθοδοι παρασκευής του NO στο εργαστήριο και στους έμβιους οργανισμούς, ιδιαίτερα οι λεπτομέρειες της μεθόδου παρασκευής με χρήση του ενζύμου NOS (nitric oxide synthase). Τέλος, περιγράφονται οι διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού του NO, ειδικότερα με την χρήση χήμειοφωταύγειας.

1.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΧΗΜΕΙΟ- ΚΑΙ ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

Οι τεχνικές της χήμειο- και βιοφωταύγειας ανεπτύχθησαν πολύ γρήγορα (σε 20 χρόνια) λόγω των πλεονεκτημάτων τους. Η δυνατότης της εφαρμογής των στα πεδία της Κλινικής Χημείας, Βιοχημείας, Αναλυτικής Χημείας, Ανοσολογικής Μοριακής Βιολογίας έχει σημαντικά προωθήσει την ανάπτυξη των τεχνικών αυτών. Οι χημείο- και βιοφωταυγείς αντιδράσεις έχουν επιτελέσει την μετάβαση της εργαστηριακής περιέργειας σε πυρήνα τεχνολογίας. [1]

Στην αντίδραση χημειοφωταύγειας, η παραγόμενη χημική ενέργεια λόγω της διάσπασης ασθενούς δεσμού παράγει ενδιάμεσες διεγερμένες καταστάσεις που αποδιεγείρονται στην βασική κατάσταση με εκπομπή φωτός. Η βιοφωταύγεια είναι ειδική περίπτωση χημειοφωταύγειας που εμφανίζεται στην φύση, κατά την οποία η εκπομπή φωτός διευκολύνεται με την δράση ενζύμου (όπως η Luciferase) και μιας φωτοπρωτεΐνης. Για την χημειοφωταύγεια, το ποσοστό εκπομπής (κβαντική απόδοση) ποικίλει μεταξύ 1-10 % (π.χ. λουμινόλη 1%, ισολουμινόλη 10%), αλλά στην βιοφωταύγεια είναι ψηλότερη από την χημειοφωταύγεια διότι είναι φυσικό σύστημα και βρίσκεται στην περιοχή 10-30% (π.χ. Luciferase/Luciferin 30%).

Πλεονεκτήματα: Τελευταία, οι εφαρμογές της Χήμειο- και Βιοφωταύγειας έγιναν πολυπληθείς λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων τους.

A. Υψηλή Ευαισθησία: Οι προσδιορισμοί με Χήμειο- και Βιοφωταύγεια έχουν μεγάλη ευαισθησία σε σχέση με άλλες μεθόδους ανίχνευσης όπως αυτής της ELISA (προσδιορισμός ανοσοπροσοροφητή με δεμένο ένζυμο, φθορισμομετρικού ή χρωματομετρικού προσδιορισμού). Η ευαισθησία των συγκρίνεται με προσδιορισμούς σήμανσης με ραδιοϊσότοπα (όπως της RIA ανοσοπροσδιορισμός με ραδιενεργά). Για παράδειγμα, στον βιοφωταυγή προσδιορισμό των βοηθητικών ενώσεων της χολής στον ορό του αίματος είναι 0,5 pmol, στον χημειοφωταυγή προσδιορισμό του DNA με την χρήση των ακριδινεστέρων είναι 1 amol, στον χημειοφωταυγή προσδιορισμό της αλκαλικής φωσφατάσης με χρήση της διοξετάνης είναι 0,001 amol. Αυτή η ευαισθησία είναι συγκρίσιμη ή υψηλότερη από την μέθοδο της ραδιενέργειας. Για την επίτευξη της υψηλής αυτής ευαισθησίας απαιτείται υψηλή καθαρότης των αντιδραστηρίων χημείο- και βιοφωταύγειας, διαφορετικά θα υπάρχει υψηλό υπόβαθρο. Για τον λόγο αυτό θα πρέπει να επιτευχθεί υψηλού βαθμού καθαρότης και πλήρης διαχωρισμός από προσμίξεις στα αντιδραστήρια.

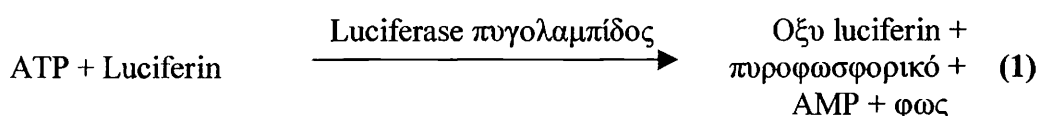
Η αντίδραση χήμειο- και βιοφωταύγειας ακολουθεί τις ακόλουθες στρατηγικές:

- (α) Τα αντιδραστήρια Χήμειο- και Βιοφωταύγειας γίνονται στοιχεία σήμανσης και ανιχνεύονται με την παρουσία κατάλληλων υποστρωμάτων, όπως η λουσιφεράση, οι ακριδινεστέρες, η λουμινόλη, η aequorin κ.τ.λ.
- (β) Η αντίδραση της Χήμειο- και Βιοφωταύγειας διεγείρεται με την παρουσία κατάλληλου ενζύμου όπως η αλκαλική φωσφατάση (AP), η horseradish περοξειδάση (HRP), η ξανθινοξειδάση κ.τ.λ.
- (γ) Ο συνπαράγοντας (co-factor) και τα σχετικά (haptens) της Χήμειο- και Βιοφωταύγειας χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση. Τα ATP, NAD χρησιμοποιούνται ευρύτατα στις βιοφωταύγειες αντιδράσεις σαν (cofactors) συνπαράγοντες.

Τα haptens όπως η διγοξίνη χρησιμοποιήθηκαν στην ενζυμική (όπως AP, HRP) σήμανση που μπορεί να οδηγήσει σε πολύ υψηλές ευαισθησίες στους προσδιορισμούς της ανάλυσης του DNA. Με την χρήση της υψηλής συγγένειας μεταξύ βιοτίνης και αβιδίνης τα αντιδραστήρια Χήμειο- και Βιοφωταύγειας έμμεσα μπόρεσαν να γίνουν στοιχεία σήμανσης. Στην περίπτωση αυτή η ευαισθησία ήταν πολύ μεγαλύτερη από την απ' ευθείας σήμανση λόγω της ενισχυτικής δράσης του συστήματος βιοτίνης-αβιδίνης. Ακόμη, η μελέτη της σύνθεσης κατάλληλων παραγώγων των αντιδραστηρίων Χήμειο- και Βιοφωταύγειας καθώς και υποστρωμάτων έδωσε μεγάλη βοήθεια στην επιλογή του συστήματος αντίδρασης για πιο εύκολο χειρισμό και υψηλότερη ευαισθησία, όπως τα παράγωγα της λουσιφερίνης (luciferin), των ακριδινεστέρων, της διοξετάνης και διαφορετικών υποστρωμάτων της AP π.χ. AMPPD, CSPD και άλλων.

1.2.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΤΗΣ ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

Συστήματα (Λουσιφεράσης-Λουσιφερίνης) Luciferase-Luciferins [2]. Η αρχική έρευνα στο φαινόμενο της εκπομπής φωτός ξεκίνησε από την διερεύνηση της αντίδρασης της πυγολαμπίδας. Η αντίδραση της πυγολαμπίδας βασίζεται στην ακόλουθο αρχή:



Με το σύστημα αυτό, το ATP μπορεί να ανιχνευθεί με ευαισθησία και έχει όριο ανιχνευσιμότητας τοamol. Αυτό το είδος της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ευρέως για την ανίχνευση μεγάλου αριθμού παρόμοιων υλικών με χρήση διαφόρων

δραστικότητας εάν συνακινήτοποιηθεί υπερβολικά μεγάλη ποσότητα ενζύμου η δραστικότης θα διαφοροποιηθεί. Εάν πρόκειται για δύο ένζυμα, πιθανώς να μην υπάρχει εμφανής επίδραση αλλά εάν έχουμε τρία ή περισσότερα διαφορετικά ένζυμα, θα χάσουν κάποιο μέρος της δραστικότητάς τους.

Περαιτέρω εφαρμογές ανεπτύχθησαν με την χρήση του συστήματος luciferase/luciferin [2] ως ακολούθως:

A. Ταχεία βιοϊατρική παρακολούθηση με βάση τους βιοφωταυγείς ATP-προσδιορισμούς, στις κάτωθι περιπτώσεις.

(α) Ταχείες μικροβιολογικές δοκιμές: η απελευθέρωση του ATP από τα κύτταρα και ο προσδιορισμός της με χρήση του συστήματος luciferase-luciferin πυγολαμπίδας είναι μια απλή και εύκολη μέθοδος για την ανίχνευση και καταμέτρηση κυττάρων. Για παράδειγμα το γονίδιο lux που κωδικοποιεί πρωτεΐνες αναγκαίες για φωταύγεια στα vibrio fischeri μπορεί να εισαχθεί σε βακτηριοφάγους, που μπορούν να προσβάλλουν το κύτταρο και να το κάνουν να εκπέμπει φως το είδος αυτό της προσβολής είναι εξειδικευμένο στο δεδομένο στίγμα και μετρώντας την εκπομπή φωτός που είναι απ' ευθείας ανάλογη του αριθμού των προσβληθέντων κυττάρων, μπορούμε να έχουμε μια άποψη για τον χαρακτήρα των κυττάρων.

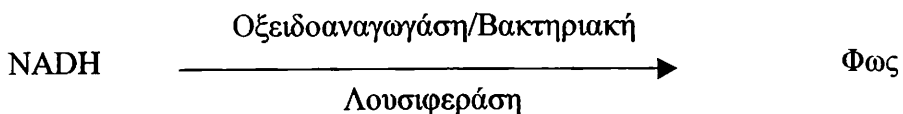
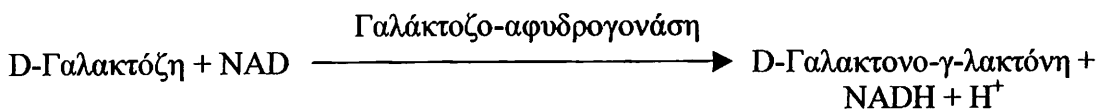
(β) Βιοδείκτης ενός ειδικού όγκου, όπως ο καρκίνος των ωοθηκών: η συγκέντρωση του ATP στον ιστό θα έχει κάποια διαφοροποίηση από τον κανονικό ιστό και με την διαπίστωση της διαφοροποίησης της συγκέντρωσης ATP, είναι δυνατόν να βρεθεί εάν ο οργανισμός είναι επηρεπής σε εμφάνιση καρκίνου: αυτό είναι πολύ χρήσιμο και μια πολύ αποτελεσματική μέθοδος για την πρόληψη ενός ειδικού καρκίνου.

(γ) Δείκτης περιβαλλοντικής ρύπανσης. Το σοβαρό πρόβλημα της ρύπανσης ιδίως του νερού έχει μεγάλη επίδραση σε κάποια φυτά που είναι ευαίσθητα στην ρύπανση του νερού. Εξετάζοντας την διαφοροποίηση της συγκέντρωσης ATP σε διαφορετικά τμήματα του φυτού, μπορούμε να αντιληφθούμε τον βαθμό της ρύπανσης.

(δ) Κλινικά διαγνωστικά κάποιων μυϊκών ασθενειών.

B. Η luciferase πυγολαμπίδος σαν γονίδιο αναφοράς [9]. Το γονίδιο της λουσιφεράσης (luciferase) της πυγολαμπίδος διερευνήθηκε περαιτέρω κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε στο Escherichia coli [4]. Επιπροσθέτως, το

2-νιτροφαινόλη
(4)



Δ. Προσδιορισμός απτενίων, πρωτεϊνών και DNA [10-15, 18]. Η Luciferase προσδένεται στα απτένια ή πρωτεΐνες και ανιχνεύουμε τις ενώσεις αυτές και τα σχετικά αντισώματα ή αντιγόνα με την χρήση βιοφωταυγούς ανοσοπροσδιορισμού. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε επίσης για την τεχνική (στυμπίσματος) blotting των πρωτεϊνών. Η λουσιφεράση προσδένεται στο DNA σαν σηματοδότης του DNA για την ανάλυση του DNA υβριδισμού.

Για την λουσιφερίνη διατίθενται σειρές από σχετικά παράγωγα λουσιφερίνης στην 6-θέση με θειικά, φωσφορικά, γαλακτοσίτη, αργινίνη, L-φαινυλαλανίνη και εστέρες. Αυτό το είδος των παραγώγων δεν μπορεί να αντιδράσει με την λουσιφεράση, αλλά παρουσία φωσφατάσης, όπως αλκαλικής φωσφατάσης ο υποκαταστάτης στην 6-θέση ελευθερώνεται και η φυσική λουσιφερίνη αναγεννάται. Βάσει της ιδιότητας αυτής, το παράγωγο, D-luciferin- O-phosphate χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης και με την χρήση της μεθόδου συνακτινοποίησης με λουσιφεράση-οξειδοαναγωγή, ο βιοφωταυγής ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός επιτυγχάνεται και η ευαισθησία βελτιώνεται αισθητά.

Aequorin. Η aequorin είναι βιοφωταυγής πρωτεΐνη και συνίσταται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα (απο-aequorin), coelenterate luciferin και δεμένο οξυγόνο. Η aequorin παράγει μπλε φως κατά την πρόσδεση Ca^{2+} . Το σχετικό γονίδιο κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε με τεχνικές ανασυνδυασμού του DNA. Το γονίδιο της απο-aequorin συνενώθηκε με γονίδιο IgG μεγάλης αλυσίδας, και το συντηχθέν γονίδιο εκφράζει μια συντηχθείσα πρωτεΐνη που κρατά τις ιδιότητες αμφοτέρων της απο-aequorin και της IgG αλυσίδας. Σαν άλλο βιοφωταυγές αντιδραστήριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν αντιδραστήριο σηματοδότησης με σκοπό τον ανοσοπροσδιορισμό [20].

της φαγοκύτωσης και opsonization, (δ) ποιοτική πιστοποίηση του ορρού για opson, (ε) προσδιορισμός των ανοσοσυμπλόκων και μεμβρανοαντιγόνων.

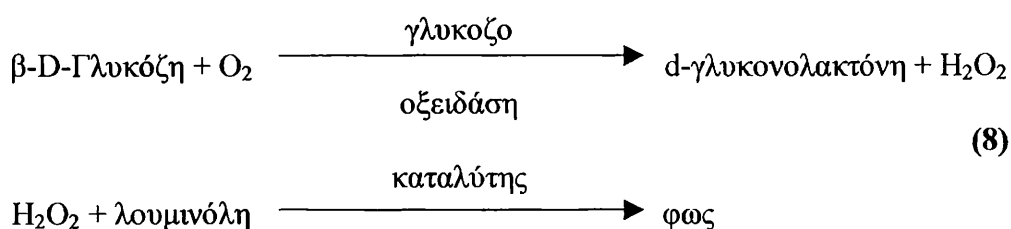
Προσδιορισμός της Κρεατινοκινάσης με βιοφωταύγεια: Οι καρδιακές ασθένειες γίνονται όλο και περισσότερο δημοφιλείς στην σύγχρονη εποχή με την βελτίωση της οικονομίας και του βιοτικού επιπέδου όχι μόνο στις ανεπτυγμένες χώρες αλλά κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες. Το οξύ μυοκαρδιακό έμφραγμα (AMI) είναι ένα είδος των πολύ σημαντικών ασθενειών που σχετίζονται με τα καρδιακά προβλήματα. Ένα είδος απλής και ταχείας κλινικής διάγνωσης και ανίχνευσης είναι απαραίτητο για το είδος αυτών των ασθενειών [25, 26]. Η διάγνωση της AMI εθιμοτυπικά βασίζεται στο triad χαρακτηριστικό πόνο στο στήθος και στις ειδικές ανωμαλίες που εμφανίζονται στα ηλεκτροκαρδιογραφήματα (ECG). Όμως, οι διαφορές του πόνου στο στήθος δεν είναι διακριτές με αποτέλεσμα να περιορίζεται η επιτυχής διάγνωση, ενώ οι μεταβολές στο ECG έχουν ποικίλους βαθμούς ευαισθησίας και εξειδίκευσης. Η διάγνωση της ζημιάς στο μυοκάρδιο σε ασθενείς με πόνο στο στήθος μπορεί να βασιστεί σε μετρήσεις βιοδεικτών. Νέοι προσδιορισμοί βιοδεικτών όπως η μυογλοβίνη, τροπονίνη T [32-35], και ισοένζυμο MB μάζας της κρεατινοκινάσης (CK-MB μάζας) [24, 31, 41] είναι ευαίσθητοι για την διάγνωση της AMI, αλλά γι' αυτό το είδος των μεθόδων ανίχνευσης, συχνά χρησιμοποιούν την μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού που είναι πολύπλοκος και απαιτεί πολύ χρόνο για την συλλογή του δείγματος και την ανίχνευση. Δεν είναι εύκολο να επιτευχθεί ένα είδος απλής και ταχείας μεθόδου ανίχνευσης in vivo. Οι πιο πάνω μέθοδοι έχουν τα πλεονεκτήματά τους και τα μειονεκτήματά τους [28].

Η Κρεατινοκινάση (CK) συνίσταται από δύο υπομονάδες, τις M και B. Εμφανίζεται σε διαφορετικούς ιστούς σαν το ισοένζυμο MM (τύπου μυός), BB (τύπου εγκεφάλου) και MB (τύπου υβριδίου) [27]. Η ζημιά στον ιστό του μυός είναι κυρίαρχα λόγω της αύξησης της CK-MM, ενώ το αυξημένο επίπεδο του ισοένζυμου BB εμφανίζεται σε σπάνιες περιπτώσεις. Στον ορρό από ασθενείς που πάσχουν από AMI, το κλάσμα MB στην συνολική CK-δραστικότητα είναι σημαντικό. Η κρεατινοκινάση MB (CK-MB) [29, 30] είναι ένα είδος συμβατικού βιοδείκτη για την AMI, η δραστηρότητάς της CK-MB θα είναι εμφανώς αυξημένη μετά την έναρξη του στηθόπονου. Γι' αυτό ο προσδιορισμός της CK-MB είναι υψηλής διαγνωστικής αξίας για την AMI.

συνυπάρχει τρίτο συστατικό. Το τρίτο συστατικό δρα είτε σαν καταλύτης ή σαν συνοξειδωτικό ή με αμφότερον τους τρόπους [36-40].

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την κινητική της αντίδρασης όπως:

- A. Επίδραση του pH: Η εκπομπή φωτός αυξάνεται εμφανώς με την αύξηση του pH και είναι μηδαμινή σε $\text{pH} < 7$. Με βάση αυτήν την συμπεριφορά, το σύστημα της λουμινόλης μπορεί να εκπέμψει ισχυρό φως σε σχετικά υψηλό pH. Θεμελιώθηκε, λοιπόν, ένας μηχανισμός για την χημειοφωταύγεια της λουμινόλης που παρέχεται σε υδατικά αλκαλικά διαλύματα κατά την ηλεκτρόλυση για τον προσδιορισμό ίχνων Cu (II).
- B. Επιλογή του καταλύτη/συνοξειδωτικού είναι κρίσιμος παράμετρος για αναλυτικούς σκοπούς. Ο λόγος καταλύτη / συνοξειδωτικού επηρεάζει την δράση της χφ-αντίδρασης, της χφ-αποτελεσματικότητας, της τάξης της αντίδρασης και της στοιχειομετρίας. Οι χημικοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν σαν καταλύτες της και σαν συνοξειδωτικά είναι:
- (α) Η αιμίνη χρησιμοποιήθηκε σαν καταλύτης / συνοξειδωτικό για τις θεμελιώδεις μελέτες της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης. Δεν είναι πολύ διαλυτή και είναι ακριβή. (β) Τα οξειδωτικά, όπως τα οξειδωμένα μεταλλοϊόντα (π.χ. Fe (III), $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, φεροσίνη, Co (II)), οι οξειδωτικές ενώσεις (π.χ. NaIO_4) είναι επίσης αποτελεσματικά αντιδραστήρια για την αντίδραση της λουμινόλης. (γ) Τα κατάλληλα ένζυμα όπως η μικροπεροξειδάση, η περοξειδάση καρότου· η περοξειδάση καρότου θεωρήθηκε σαν πολύ αποτελεσματικό ένζυμο στην αντίδραση της λουμινόλης, ιδιαίτερα επί της παρουσίας κάποιου κατάλληλου ενισχυτή όπως της π-ιωδοφαινόλης, π-φαινυλοφαινόλης και π-υδροξυκιναμωμικού οξέος. Αυτό το σύστημα χρησιμοποιήθηκε ευρέως για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και του DNA.
- Γ. Εφαρμογές: Σύμφωνα με την πιο πάνω αντίδραση, το H_2O_2 είναι ένα είδος απαραίτητου συνπαράγοντα για την αντίδραση της λουμινόλης. Χρησιμοποιώντας το σύστημα αυτό, η γλυκόζη μπορεί να ανιχνευθεί με την ακόλουθη αντίδραση.



εκπληρωθεί σε 30 λεπτά. Συνοπτικά, οι ΑΕ και τα κατάλληλα παράγωγα, σαν ένα είδος χημειοφωταυγών αντιδραστηρίων έχουν σαν πλεονεκτήματα στον προσδιορισμό πρωτεϊνών και DNA την υψηλή ευαισθησία, την ταχύτατη σήμανση ενώ είναι ταχείς και απλές στον χειρισμό της ανάλυσης.

Πρόσφατα, νέα σειρά παραγώγων ΑΕ συνετέθη [48]. Αυτά τα παράγωγα δείχνουν σημαντικές διαφορές επιτρέπουν δύο ή περισσότερα παράγωγα να προσδιορισθούν συγχρόνως σε μοναδικό αντιδραστήρα. Πολλά από τα παράγωγα αυτά έχουν προσδεθεί με ομοιοπολικό δεσμό σε νουκλεϊνικά οξέα-ιχνηθέτες (probes) και περαιτέρω έχουν χαρακτηριστεί ως προς τις ιδιότητες χημειοφωταύγειας καθώς και ως προς την υδρόλυση του εστερικού δεσμού σε μονής και διπλής κορδέλας σχηματισμούς. Επίσης δείχνουν υψηλή ευαισθησία και διακριτικότητα στον προσδιορισμό του DNA.

Αλκαλική φωσφατάση: Αλκαλική φωσφατάση (AP) χρησιμοποιήθηκε στον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και του DNA λόγω της υψηλής ευαισθησίας του σε μερικά ειδικά υποστρώματα. Το AP προσδιορίζεται συχνά με χρωματομετρία, με την χρήση π-νιτροφαινυλοφωσφορικών εστέρων σε αλκαλικές συνθήκες παρουσία ένωσης αποδοχής φωσφορικών όπως της 2-αμινο-2-μέθυλο-1-προπανόλης. Μεταγενέστερα, περιγράφηκαν πιο ευαίσθητοι Βιο- και Χημειοφωταυγείς προσδιορισμοί για το ένζυμο αυτό [50-54]. Ο ΒΦ προσδιορισμός της αλκαλικής φωσφατάσης βασίζεται στην αποσφωσφορυλίωση της D-λουσιφερίνη-Ο-φωσφορική της πυγολαμπίδας. Η AP κόβει την φωσφορική ομάδα για να ελευθερώσει την D-λουσιφερίνη, η οποία αντίθετα με την φωσφορική, είναι το υπόστρωμα για την αντίδραση ΒΦ με λουσιφεράση της πυγολαμπίδας.

Για τον ΧΦ προσδιορισμό, μια σειρά υποστρωμάτων, όπως AMPPD, CSPD, (χημική ονομασία) διοξετάνη και τα παράγωγά της ανεπτύχθησαν. Για τον ΧΦ-ανοσοπροσδιορισμό (CLIA) των απτεϊνών και πρωτεϊνών, η AP προσδέεται απ' ευθείας στις ενώσεις αυτές. Για να βελτιώσουμε την ευαισθησία στον προσδιορισμό του DNA, η AP προσαρτήθηκε έμμεσα παρουσία βιοτίνης-αβιδίνης ή διγοξίνης-διγοξίνη αντίσωμα. Με αυτά τα δύο συστήματα η ευαισθησία αυξήθηκε σημαντικά. Η AP χρησιμοποιήθηκε επίσης στην εύρεση της αλληλουχίας DNA, με την τεχνική του southern blotting και western blotting. Σήμερα εφαρμόζονται πολλοί ΧΦ-προσδιορισμοί μέσω της AP. Η πιο ευαίσθητη και περισσότερο διερευνηθείσα αντίδραση περιλαμβάνει ένα αδαμάντυλο 1,2-διοξέτανο αρυλοφωσφορικό εστέρα

πολλά ΧΦ και ΒΦ συστήματα. Το HRP καταλύει των φωταυγή οξείδωση ενός μεγάλου αριθμού υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένου κυκλικών υδραζιδίων, παραγώγων φαινόλης και συστατικών συστημάτων βιοφωταύγειας. Ικανοποιητικά υποστρώματα περιλαμβάνουν την λουμινόλη και παρεμφερή μόρια, πυρογαλλόλη, πουρπουρογαλλίνη ή λουσιφερίνες από τους μικροοργανισμούς του *rholas dactylous*, την πυγολαμπίδα, η *cyrpidina*. Αυτές οι αντιδράσεις διαφέρουν ευρύτατα στα όρια ανιχνευσιμότητας, στην εξειδίκευση, την διαθεσιμότητα αντιδραστηρίου, το μέγεθος και την κινητική της εκπομπής φωτός και αυτό περιορίζει την εφαρμογή τους [55-57].

Τα ακόλουθα ΧΦ συστήματα που περιλαμβάνουν HRP χρησιμοποιήθηκαν παρουσία διαφορετικών ενισχυτών (α) λουμινόλη-περβορικό-περοξειδάση, (b) Πουρπουρογαλλίνη-H₂O₂-περοξειδάση, (c) Πυρογαλλόλη- H₂O₂-περοξειδάση, (d) Λουμινόλη-H₂O₂-περοξειδάση. Το σύστημα Λουμινόλης-H₂O₂-περοξειδάση χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα σε όλα τα είδη ανίχνευσης με την παρουσία αποτελεσματικών ενισχυτών, όπως της π-ιωδοφαινόλης, π-φαινυλοφαινόλης, π-υδροξυκινναμωμικού οξέος, 6-υδροξυβενζοθειαζόλης κ.ο.κ. Σε μια ενισχυμένη ΧΦ αντίδραση, αυτές οι ενώσεις αυξάνουν την ένταση της εκπομπής φωτός πολλές τάξεις μεγέθους και μειώνουν την εκπομπή φωτός υποβάθρου της λουμινόλης-H₂O₂ (τυφλό). Αυτό οδηγεί σε δραματική αύξηση του λόγου σήματος / θορύβου για την ανίχνευση του HRP που καταλήγει σε ενίσχυση σήματος πολλών χιλιάδων-φορών σε σχέση με την απουσία του ενισχυτή.

Προς το παρόν, το ενισχυμένο ΧΦ σύστημα Λουμινόλης-H₂O₂-περοξειδάσης εφαρμόστηκε ευρύτατα για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών και DNA. Ειδικά όταν το HRP συζεύγνυται με βιοτίνη-στρεπταβιδίνη ή διγοξίνη-αντιδιγοξίνη σύστημα ενίσχυσης, η ευαισθησία βελτιώνεται σημαντικά στον υβριδισμικό προσδιορισμό του DNA.

Ξανθινοξειδάση: Η ξανθινοξειδάση καταλύει την φωταυγή οξείδωση της λουμινόλης: Η αντίδραση ενισχύεται με Fe-EDTA σύμπλοκο. Η ξανθίνη οξειδώνεται σε υποξανθίνη και παράγει H₂O₂ παρουσία ξανθινοξειδάσης και O₂. Αυτή η αντίδραση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ανιχνεύσει την ξανθινοξειδάση που προσδέεται σε ποικιλία αντιγόνων και αντισωμάτων. Για την αντίδραση αυτή, η εκπομπή φωτός είναι μακράς διάρκειας, τυπικά διαρκεί μερικές μέρες [58, 59].

στην χρήση των συσκευών σύζευξης φορτίου (CCD) για την αποτύπωση του ειδώλου της εκπομπής φωτός από πλάκες μικροτιλοδότησης, μεμβράνες και άλλες σειρές φωτεινών δοχείων αντίδρασης. Ψυχόμενες, χαμηλού θορύβου CCD φωτογραφικές μηχανές είναι ιδιαίτερα κατάλληλες για χαμηλής έντασης είδωλα λόγω της ευαισθησίας τους, της γραμμικής απόκρισης ως προς τα προσπίπτοντα φωτόνια και την ευρεία δυναμική περιοχή. Οι CCD χρησιμοποιήθηκαν για απ' ευθείας ψηφιακή μεταφορά ειδώλου των τεχνικών Southern και dot-blots, της διαπίστωσης αλληλουχίας DNA κ.ο.κ. Οι εφαρμογές έχουν γενικά εστιασθεί στην επίτευξη υψηλής ευαισθησίας και ποσοτικής πληροφόρησης [71].

1.2.4. Εφαρμογή των τεχνικών ΒΦ και ΧΦ

Η ΒΦ και ΧΦ σαν ένα είδος ακολουθώντας την ταχεία ανάπτυξη των νέων μη-ισοτοπικών τεχνικών ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκε σχεδόν σε όλα τα πεδία ανίχνευσης, ειδικά στα πεδία προσδιορισμού των βιοϊατρικών ενώσεων. Εξαίρεση αποτελεί η ανάλυση πρωτεϊνών, απτενίων, DNA, βιομάζας όπως κρεατινοκινάσης, μονοξειδίου του αζώτου, διαπίστωση της αλληλουχίας DNA. Πρόσφατα, αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούνται επίσης σ' ένα μεγάλο αριθμό νέων πεδίων έρευνας [72-75] όπως:

(α) Φωταγούς προσδιορισμού καναλικού οξυγόνου [65-67]. Η αρχή αυτής της τεχνικής βασίζεται στους ανοσοπροσδιορισμούς του καναλισμού του ενζύμου.

(β) Τεχνικές ηλεκτροχημειοφωταύγειας για την ανάλυση του DNA και ανοσοπροσδιορισμό [96-98].

(γ) Χημειοφωταυγείς προσδιορισμούς υβριδισμικής-σύνδεσης [93-95].

(δ) Η σύζευξη των τεχνικών χημειοφωταύγειας και επιτόπου υβριδισμού και ανοσοϊστοχημείας [68-70]. (ε) Απ' ευθείας υπολογιστική ανάλυση της ΧΦ αντίδρασης όπως στον ανοσοπροσδιορισμό, και διαπίστωση της αλληλουχίας DNA.

ειδών μεθόδων μη-ισοτοπικής σήμανσης. Υπάρχουν τάσεις να αντικατασταθεί η RIA με μη-ισοτοπικές μεθόδους.

Φθορισμοανοδοπροσδιορισμοί (FIA). Κάνοντας χρήση όλων των φθορισμοχρωμικών ενώσεων, όπως η ισοθειακυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) συζευγμένη στο αντίσωμα (ή αντιγόνο / απτένιο) σαν σηματοδοτικός ιχνηθέτης, ανιχνεύθηκε το ανάλογο αντιγόνο (ή αντιγόνο / απτένιο) χρησιμοποιώντας ανοσοχημικό προσδιορισμό. Εκτός του FITC χρησιμοποιούνται συχνά τα ακόλουθα φθορίζοντα σηματοδοτικά αντιδραστήρια: Hoechst 33258, R- Φυκοερυθρίνη (PE), Ροδαμίνη (TRITC), Κβαντο Κόκκινο TM, Κόκκινο του Τέξας, Cy3, κ.ο.κ. [42-44].

Στον προσδιορισμό με την αναλυτική τεχνική RIA συχνά χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες μέθοδοι ανίχνευσης.

- (α) Απ' ευθείας ανοδοπροσδιορισμός. Άμεση σήμανση μιας διασποράς ανθρώπινων και ζωικών κυττάρων χρησιμοποιώντας φθορισμοχρωμικό συζυγές σαν αρχικό αντίσωμα.
- (β) Έμμεσο Ανοδοφθορισμό. Έμμεση σήμανση μιας διασποράς ανθρώπινων ή ζωικών κυττάρων με χρήση φθορισμοχρωμικών συζυγών σαν δεύτερο αντίσωμα.
- (γ) ΑΝΑ-έμμεσο Ανοδοφθορισμό. Κατά την άμεσο σήμανση των στερεωμένων κυττάρων ήπατος με ακετόνη με την χρήση ανθρώπινων anti-πυρηνικών αντισωμάτων (ΑΝΑ) σαν αρχικό αντίσωμα και φθορισμοχρωμικό συζυγές σαν δεύτερο αντίσωμα.
- (δ) Ανοδοϊστολογία. Έμμεση ανοδοϊστοχημική σήμανση σε τμήματα ιστών στερεωμένων με φορμαλίνη, διαστρωμένα σε παραφίνη.
- (ε) Dot ανοδοδεμένο προσδιορισμό. Απ' ευθείας κηλίδωση των σφαιριδίων αγαρόζης των dot blots.
- (στ) Ανοδοφθορισμικό προσδιορισμό τεμαχιδίου. Απ' ευθείας κηλίδωση των σφαιριδίων αγαρόζης συζευγμένων στο αντιγόνο.

Η FIA είναι ένα είδος απλής συσκευής ροής που παρέχει μεθόδους προσδιορισμού αναλυομένης μεγάλης επαναληψιμότητας. Επί του παρόντος, πολλά σχετικά εμπορικά συνδυασμένα αντιδραστήρια (kits) προσφέρονται στην αγορά. Γενικά, η ευαισθησία είναι αρκετά καλή για κανονική ανίχνευση, αλλά η ευαισθησία είναι μικρότερη της RIA. Ακόμη, η υψηλή δαπάνη του φθορισμομέτρου περιορίζει την ευρεία εφαρμογή της.

με την χρήση αβιδίνης-καροτοπεροξειδάσης και OPD σαν υπόστρωμα για να σιγουρευθεί η ανοσοδραστικότητα.

Ο κολλοειδής χρυσός είναι ηλεκτρονικά πυκνή μαρκαδώρας που μπορεί να συμπλεχθεί με ανοσογλοβουλίνες με ισχυρή μη-ομοιοπολική αλληλεπίδραση. Συζυγή Χρυσόν-αντίσωμα χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αντιγόνου και δεν απαιτούν πρόσθετο αντιδραστήριο εκτός εάν απαιτείται ενίσχυση μέσω αργύρου για να αυξήσει την ευαισθησία. Η φερριτίνη, λόγω του υψηλού μοριακού βάρους και της περιεκτικότητας σε σίδηρο είναι πυκνός ηλεκτρονικά μαρκαδώρας που μπορεί να προσδεθεί ομοιοπολικά στις ανοσογλοβουλίνες. Συζυγή φερριτίνης-αντισώματος χρησιμοποιούνται σαν ιχνηθέτες στην ηλεκτρονική μικροσκοπία για να ανιχνεύσουμε και να εντοπίσουμε κυτταρικά ή ιστικά αντιγόνα. Τέλος η μέθοδος FIA είναι άνετη στην ανάλυση των πρωτεϊνών και απτενίων. Ένας μεγάλος αριθμός κατάλληλων συνδυασμένων αντιδραστηρίων (kits) κυκλοφορούν στην αγορά, αλλά η ευαισθησία είναι μικρότερη της RIA [90-92].

Χημειοφωταυγείς Ανοσοπροσδιορισμοί (CLIA). Η CLIA είναι ένα είδος νέων τεχνικών που βασίζεται στις μεθόδους EIA και χρησιμοποιούν τα αντίστοιχα αντιδραστήρια χημειοφωταύγειας (όπως λουμινόλη, ακριδινεστέρα) για σήμανση σε αντικατάσταση του αντίστοιχου ενζύμου (όπως το HRP, AP) στο EIA ή χρησιμοποιούν το ίδιο ένζυμο (όπως το HRP, AP) με EIA, αλλά χρησιμοποιούν διαφορετικό σχετικό χημειοφωταυγές υπόστρωμα για την ανίχνευση. Για παράδειγμα, χρησιμοποιούν λουμινόλη σαν υπόστρωμα του HRP-ενζύμου σήμανσης για την ΧΦ ανίχνευση. Με χρήση της CLIA, η ευαισθησία βελτιώνεται αισθητά, η συνολική αναλυτική μέθοδος τελειώνει γρήγορα και είναι εύκολη και απλή.

Στην CLIA ο μεγάλος αριθμός χημειοφωταυγών αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκε για το είδος αυτής της ανίχνευσης ήταν: (α) τα χημειοφωταυγή αντιδραστήρια, όπως η λουμινόλη, η ισολουμινόλη, ο ακριδινικός εστέρας, η 1,2-διοξετάνη, η aequorin που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν απ' ευθείας αντιδραστήρια σήμανσης, (β) τα σχετικά ένζυμα όπως το HRP, το AP, η λουσιφεράση, η ξανθινοξειδάση που χρησιμοποιούνται επίσης για την ανίχνευση, και (γ) μερικοί σχετικοί συνπαράγοντες ή απτένια, που επίσης, χρησιμοποιήθηκαν για την απ' ευθείας σήμανση όπως βιοτίνη, ATP, NAD κ.ο.κ.

Ανταγωνιστικός Ανοσοπροσδιορισμός: Για την ανίχνευση πρωτεϊνών, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι αυτή του ανοσοπροσδιορισμού τύπου-Sandwich. Ο ανταγωνιστικός ανοσοπροσδιορισμός χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα για τον προσδιορισμό των απτενίων όπως οι ορμόνες, τα στεροειδή κ.ο.κ. Επειδή τα απτένια έχουν πολύ μικρό μοριακό βάρος ο ανοσοπροσδιορισμός τύπου-Sandwich δεν είναι χρήσιμος. Για παράδειγμα για να ανιχνεύσουμε το T_3 , μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε μέθοδο ανταγωνιστικής CLIA. Στην μεθοδολογία της σήμανσης, εάν χρησιμοποιήσουμε HRP σαν αντιδραστήριο σήμανσης, επειδή το T_3 είναι σχετικά πολύ μικρό, το πολύ μεγάλο μόριο HRP θα τυλίξει το T_3 και έτσι το T_3 θα χάσει την δραστηριότητά του· γι' αυτό μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την μέθοδο της γλουταραλδεύδης στην μέθοδο σήμανσης. Με την μέθοδο αυτή τα πέντε άτομα άνθρακος της γλουταραλδεύδης παρεμβάλλονται μεταξύ του T_3 και την HRP και το T_3 δεν χάνει την δραστηριότητά του.

Ομογενής Ανοσοπροσδιορισμός: Στον ετερογενή ανοσοπροσδιορισμό καταναλώνουμε μεγάλο χρόνο για τον διαχωρισμό των συζευγμένων από τα ασύζευκτα μέρη, και μας δημιουργεί πολλούς μελάδες. Για να αποφύγουμε το πρόβλημα αυτό μεγάλο μέρος της έρευνας εστιάστηκε στην ανάπτυξη ομογενούς ανοσοπροσδιορισμού. Αυτή η μέθοδος εκμηδενίζει την ανάγκη να διαχωρίσουμε τα δεμένα από τα ελεύθερα μέρη της αναλυομένης (και τα στάδια έκπλυσης) και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη εάν είναι ικανοποιητική για τα απτένια και τις πρωτεΐνες και αρκετά ευαίσθητη για να επιτρέπει την ποσοτικοποίηση όλων των γνωστών αναλυόμενων.

A. Χημειοφωταύγεια του οξυγόνου με καναλικό ανοσοπροσδιορισμό (LOCL) [65-67].

Με βάση την αρχή του ενζυμικού καναλικού ανοσοπροσδιορισμού, η μέθοδος LOCL θεμελιώθηκε για τον ομογενή ανοσοπροσδιορισμό που έχει υψηλή ευαισθησία. Με την χρήση δύο διαφορετικών υποκαταστατών - ή δεικτών - επιτυγχάνεται κάλυψη τεμαχιδίων πολυστυρενίου σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τις συνήθεις που χρησιμοποιούνται στην latex agglutination τεχνική. Συνήθως σχηματίζονται ζεύγη τεμαχιδίων αντί μεγάλα συσσωματώματα και η φωτοχημικά πυροδοτούμενη χημειοφωταύγεια αντικαθιστά την νεφελομετρική ή θολωσιμετρική ανίχνευση. Το ένα σωματίδιο του ζεύγους έχει διαλυτοποιημένο τον

μαγνητικά ακινητοποιημένα ανοσοτεμαχίδια σε μεταλλάκτη στερεάς φάσης με την χρήση μαγνητικού πεδίου [89]. Τέλος, για την ανάλυση πρωτεϊνών και απτενίων, η υψηλή ευαισθησία του ομογενούς ανοσοπροσδιορισμού χημειοφωταύγειας είναι η καλύτερη επιλογή. Απαιτείται, όμως, περισσότερη έρευνα για την τεχνική αυτή.

1.3.2. Συμπληρωματικές τεχνικές για πρωτεΐνες και ένζυμα

Καθαρισμός ενζύμου

1. Μέθοδοι προκαταρκτικού καθαρισμού

Η υψηλή καθαρότης του ενζύμου είναι πολύ σημαντική στην αναλυτική μεθοδολογία. Ένας προκαταρκτικός καθαρισμός συχνά περιλαμβάνεται στην διαδικασία της εκχύλισης του ενζύμου. Κάποιος βαθμός της κλασμάτωσης του κυτταρικού περιεχομένου εκτελείται προ της εκχύλισης, ώστε μόνο ένζυμα που βρίσκονται στο αυτό υποκυτταρικό διαμέρισμα με το σχετικό ένζυμο, να εκχυλίζονται. Επίσης, η σύσταση του εκχυλιστικού μέσου επιλέγεται έτσι ώστε το ένζυμο ενδιαφέροντος να είναι διαλυτό ενώ τα άλλα να μην είναι.

Τα εκχυλισθέντα νουκλεϊνικά οξέα μπορούν να καταβυθιστούν δια της επεξεργασίας με βασικές ενώσεις όπως στρεπτομυκίνη ή πρωταμίνη ή με $MnCl_2$ ή με $MgCl_2$. Όλα τα ιζήματα όπως κυτταρικές ακαθαρσίες, τότε, απομακρύνονται με φυγοκέντρηση και πετιούνται. Το επόμενο στάδιο καθαρισμού είναι η καταβύθιση του ενζύμου που μας ενδιαφέρει από το διάλυμα, διαχωρίζοντάς το από μόνο- και ολίγο-σακχαρίτες, νουκλεοτίδια, ελεύθερα αμινοξέα κ.ο.κ., καθώς και από πολλές άλλες πρωτεΐνες που παραμένουν στο διάλυμα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με αλλαγή του pH και της συγκέντρωσης του οργανικού διαλύτη ή του άλατος του μέσου.

2. Μέθοδοι περαιτέρω καθαρισμού. Το ακάθαρμο εκχύλισμα, με το μερικός καθαρισμένο ένζυμο επεξεργάζεται κατά ποικίλους τρόπους για να αυξηθεί η καθαρότης του ως ακολούθως:

(α) Με προσροφητικές πηκτές (π.χ. $Zn(OH)_2$) για την απομάκρυνση των χρωστικών. Ένα μίγμα ενζύμων μπορεί επίσης να προσροφηθεί σε κατάλληλη πηκτή (π.χ. υδροξείδιο του αλουμινίου) και κατόπιν να κλασματωθεί εκλούμενο με

πολυμερούς-υποκαταστάτη παρασκευασμένο για καθαρισμό ενός ενζύμου περιορίζεται αποκλειστικά σ' αυτήν την ειδική εφαρμογή.

(ζ) Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης έδωσε μεγάλη πρόοδο στον καθαρισμό των πρωτεϊνών. Η χρήση στηλών ανοξειδωτου χάλυβα και υψηλής ποιότητας, καθώς και ανθεκτικών πληρωτικών υλικών μεγέθους τεμαχιδίων 10 μm, ή λιγότερο επέτρεψε να επιτευχθούν διαχωρισμοί παρόμοιοι με αυτούς της συνήθους χαμηλής πίεσης χρωματογραφίας αλλά σε χρόνο μερικών λεπτών αντί ωρών.

Καθαρισμός αντισωμάτων.

Στην μεθοδολογία της ανάλυσης πρωτεϊνών, η υψηλή καθαρότης των αντισωμάτων είναι αναγκαία για υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση. Η καθαρότης των αντισωμάτων επιτυγχάνεται με δύο τρόπους.

(α) Διαχωρισμό του Ig κλάσματος από μίγμα πρωτεϊνών

(β) Διαχωρισμός του πλήθους των αντισωμάτων που προσαρτώνται εξειδικευμένα σ' ένα αντιγόνο, από τα άλλα Igs ή άλλες πρωτεΐνες. Ο διαχωρισμός αυτός εκτελείται με ανοσοχημική μέθοδο βασισμένη στην χρήση ενός αδιάλυτου αντιγόνου (ανοσοπροσοροφητή) που προσδένει εξειδικευμένα αντισώματα που βρίσκονται στο μέσο (ορός, ασκίτες, υπερκείμενο καλλιέργειας)

1. Χημικές μέθοδοι

Εξαλάτωση πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες θα καταβυθιστούν όταν η ιονική ισχύς του μέσου αυξηθεί με την προσθήκη ορισμένων αλάτων. Το συνήθως χρησιμοποιούμενο άλας είναι το θειικό αμμώνιο. Το θειικό νάτριο χρησιμοποιείται επίσης, αλλά έχει το μειονέκτημα να κρυσταλλώνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται και γι' αυτό πρέπει η εξαλάτωση να γίνει στους 20°C.

Χρήση της χρωματογραφίας ιονανταλλαγής: Ανταλλάκτες όπως DEAE-κυτταρίνη χρησιμοποιείται για να καθαρίσουμε τα IgGs. Όλες οι πρωτεΐνες στον ορό προσκολλούνται στην DEAE-κυτταρίνη, αλλά το IgG κλάσμα θα εκλουσθεί από την στήλη με την αύξηση της ιονικής ισχύος του ρυθμιστικού διαλύματος. Στην

(b) Η παπαίνη παράγει μονοσθενή κλάσματα Fab (M.B. = 52000) και Fc κλάσματα (M.B. = 50000)

1.3.3. DNA ΚΑΙ RNA ΑΝΑΛΥΣΗ

Παρασκευή και Ανάλυση του DNA

Η εφαρμογή των τεχνικών της μοριακής βιολογίας στην ανάλυση των πολύπλοκων γονιδιωμάτων (genomes) εξαρτάται από την ικανότητα να παράγουμε καθαρό, υψηλού-μοριακού βάρους-DNA. Για αναλυτικές και παρασκευαστικές εργασίες χρησιμοποιήθηκε ο διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση πηκτής [76, 83-85].

Καθαρισμός και Συγκέντρωση (συμπύκνωση) του DNA. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για καθαρισμό και συγκέντρωση των παρασκευασμάτων του DNA είναι η εκχύλιση με φαινόλη και η καταβύθιση με αιθανόλη. Η ισοπροπανόλη μπορεί επίσης, να χρησιμοποιηθεί για να καταβυθίσει το DNA. Για την μέθοδο εκχύλισης με φαινόλη, η φαινόλη πρέπει να επαναποσταχθεί πριν την χρήση της διότι τα προϊόντα οξείδωσης της φαινόλης μπορούν να προσβάλλουν και να δημιουργήσουν διασπάσεις δεσμών στις αλυσίδες των νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιώντας βουτανόλη, το DNA συγκεντρώνεται. Η υπολειματική φαινόλη, χλωροφόρμιο ή βουτανόλη απομακρύνεται με εκχύλιση με αιθέρα. Επιπλέον, αιώρημα γυάλινων σφαιριδίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ταχύ και αποτελεσματικό καθαρισμό του DNA από την μόλυνση με πρωτεΐνες, RNA, ή οργανικούς διαλύτες.

Ηλεκτροφόρηση πηκτής: Η ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης συχνά χρησιμοποιείται για την απομόνωση και καθαρισμό μεγάλων τμημάτων απόσπασης DNA. Πηκτές διήθησης αγαρόζης παρασκευάζονται και χρησιμοποιούνται σαν συνήθεις πηκτές αγαρόζης, αλλά διαχωρίζουν τα μικρά DNA τμήματα όπως και οι (μη-μετουσίωσης) πολυακρυλαμιδικές πηκτές. Η τεχνική πηκτής ηλεκτροφόρησης με χρήση παλμικού πεδίου χρησιμοποιείται για να διαχωρισθούν πολύ υψηλού μοριακού βάρους DNA. Η (μη-μετωσιώνουσα) ηλεκτροφόρηση της πολυακρυλαμιδικής πηκτής συχνά χρησιμοποιείται για διαχωρισμούς και καθαρισμό μεγάλων ποσοτήτων, μικρών, διπλού κλώνου τμημάτων του DNA (< 1000 bp) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κλωνοποίηση, διαπίστωση αλληλουχίας του DNA και σήμανση. Ακόμη, οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται για καθαρισμό των ολιγονουκλεοτιδίων.

ανοσοφθορισμικές τεχνικές επίσης παρέχουν ευαίσθητες εναλλακτικές μεθόδους για πολλές εφαρμογές μοριακής βιολογίας [82, 91, 91].

Προσδιορισμός του DNA μέσω χημειοφωταυγής-ανίχνευσης. Με την χρήση χημειοφωταυγών αντιδραστηρίων, και παρασκευή των αντίστοιχων ιχνηθετών, το DNA ανιχνεύεται με μέτρηση της εκπομπής φωτός. Με την μέθοδο αυτή ένα μοναδικό-αντίτυπο γονιδίου από 1 μg ή ακόμα λιγότερο του ανθρώπινου γονιδιώματος του DNA είναι αρκετό για να ανιχνευθεί. Προς το παρόν, ένας μεγάλος αριθμός σχετικών αντιδραστηρίων σε kits κυκλοφορούν στην αγορά [45-47].

- 1) Χημειοφωταυγής ανίχνευση των βιοτυνυλιωμένων ιχνηθετών: Το σύστημα βιοτίνης/αβιδίνης ή στρεπταβιδίνης είναι πολύ ευαίσθητο. Με χρήση διαφορετικού συζευγμένου με αβιδίνη χημειοφωταυγούς ενζύμου, όπως AP ή HRP υπό την παρουσία σχετικού χημειοφωταυγούς υποστρώματος, ο υβριδισθείς στόχος DNA ανιχνεύεται με έντονη ευαισθησία. Για το AP, χρησιμοποιούνται CSPD, AMPPD, 1,2-διοξετάνη σαν υποστρώματα. Για την HRP, η λουμινόλη, το H₂O₂ και αντίστοιχος ενισχυτής όπως η π-ιωδοφαινόλη χρησιμοποιείται για τον ενισχυμένο χημειοφωταυγή υβριδισμικό προσδιορισμό. Ακόμη, η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας χρησιμοποιείται επίσης για τον βιοφωταυγή υβριδισμικό προσδιορισμό.
- 2) Χημειοφωταυγής ανίχνευση των σημασμένων με διγοξίνη ιχνηθετών. Το σύστημα διγοξίνης χρησιμοποιεί ένα αντιδιγοξίνο αντίσωμα συζευγμένο με το σχετικό ένζυμο χημειοφωταύγειας (όπως AP, HRP, λουσιφεράση)· το αντίσωμα αναγνωρίζει την διγοξίνη-dUTP που έχει ενσωματωθεί στον ιχνηθέτη.
- 3) Χημειοφωταυγής ανίχνευση μέσω ιχνηθετών σημασμένων με ακριδινεστέρες. Κατ' αρχήν συντίθενται τα σχετικά ολιγονουκλεοτίδια. Η χημική σήμανση των DNA-ιχνηθετών με ακριδινεστέρα επιτυγχάνεται με αντίδραση των αρμών σύνδεσης της αλκυλαμίνης που εισήχθη με σύνθεση και ένα N-υδρομυδο ηλεκτρικό εστέρα ενός μεθυλο-ακριδινο-φαινυλεστέρα. Με χρήση του υβριδισμικού προσδιορισμού (HPA) και διαφορεική υδρόλυση, επιτυγχάνεται ένα είδος απλού, γρήγορου, ομογενούς υβριδισμικού προσδιορισμού με μεγάλη ευαισθησία.

ριβονουκλεάση. Διαλύματα που περιέχουν Tris δεν μπορούν να επεξεργασθούν αποτελεσματικά με DEPC διότι το Tris αντιδρά με το DEPC και το αδρανοποιεί. Τα γυάλινα σκεύη θα πρέπει να θερμανθούν στους 300°C για 4 ώρες. Τα πλαστικά σκεύη πρέπει να ξεπλυθούν με γλωροφόρμιο.

Παρασκευή κυτταροπλασματικού RNA από καλλιέργειες κυττάρων ιστού.

Τα κύτταρα καλλιέργειας ιστού λύνονται με άλας νατρίου της Ν-λαυρυλοσαρκοσίνη και πωτεινάσης Κ. Εκχυλίζονται με χρήση φαινόλης/ γλωροφόρμιο/ ισοαμυλικής αλκοόλης. Το διάλυμα RNA επεξεργάζεται με διαιθυλοπυροκαρβονικό (DEPC). Το DNA που μολύνει το παρασκεύασμα απομακρύνεται με την χρήση DNάσης (που είναι ελεύθερη RNάση) και με παρεμποδιστή της placentar ριβονουκλεάσης ή με σύμπλοκο βαναδυλοριβονουκλεάσης.

Μέθοδοι γουανιδίνης για παρασκευή συνολικού RNA. Το RNA καθαρίζεται με χρήση διαλύματος γουανιδίνης - ιόντος και γλωριούχου καισίου (CsCl). Το παραγόμενο RNA με την χρήση της μεθόδου αυτής είναι αρκετά καθαρό για northern, S1 ή SP6 ανάλυση, ενώ η επεξεργασία με διάλυμα DEPC κρίνεται απαραίτητη για να παρεμποδίσει την δράση της RNάσης.

Φαινόλο/ SDS μέθοδος για την παρασκευή φυτικού RNA. Στην μέθοδο αυτή τα κύτταρα λύνονται με φαινόλη και SDS που παράγει καθαρό, πλήρους-μήκους RNA από μεγάλες ποσότητες φυτικών κυττάρων και δίνει καλά αποτελέσματα με πολλά κύτταρα θηλαστικών και ιστών. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παράγει RNA από ποικιλία ευκαριωτικών ιστών.

Παρασκευή βακτηριακού RNA. Με την χρήση χώνευσης με πρωτεάση, ακόλουθη οργανική εκχύλιση για την απομάκρυνση πρωτεϊνών και περαιτέρω χώνευση με νουκλεάση για να απομακρυνθεί το DNA, εκχυλίστηκε το RNA από τα αρνητικά και θετικά κατά gram βακτήρια. Το παραχθέν RNA από την μεθοδολογία αυτή έχει υψηλή ποιότητα και είναι κατάλληλο για northern blotting, S1 χαρτογράφηση και επέκταση του primer.

Παρασκευή του πολύ(A)⁺RNA. Το παραχθέν RNA από τα ευκαριωτικά κύτταρα περιέχει αρχικά ριβοσομικά-RNA και μεταφορικά-RNA. Πολλές τεχνικές απαιτούν

Ηλεκτροχημειοφωταύγεια (ECL). Επιδείχθηκε αρχικά σε προσδιορισμούς προϊόντων PCR με χρήση [4-(N-ηλεκτρίφυλο-οξυκαρβονυλπροπυλο)-4'-μεθυλο-2,2'-διυριδινό] ρουθίνιο (II) διεξαφθοροφωσφορικό άλας σαν σηματοδότη. Αυτός ο σηματοδότης, επιτρέπει την γρήγορη ποσοτικοποίηση και ανίχνευση των PCR-ενισχυθέντων προϊόντων από ογκογόνα, ιούς και κλωνοποιημένα γονίδια.

Ανίχνευση του mRNA με χρήση RT-PCR και ECL. Για την μέτρηση χρησιμοποιείται ηλεκτροχημειοφωταυγής μέθοδος ανίχνευσης και βιοτινυλιωμένα μετά-PCR cDNA δείγματα υβριδισμένα με ιχνηθέτη ολιγονουκλεοτίδιο μαρκαρισμένο με τρις (2,2'-διυριδινό) ρουθίνιο (II) (TBR) σύμπλοκο που παγιδεύονται στην συνέχεια σε δυνασφαιρίδια καλυμμένα με στρεπταβιδίνη. Με την χρήση διαφορετικού συστήματος η φωταύγεια που εκπέμπεται από το TBR-χηλικό των παγιδευθέντων ειδικών μετά-PCR προϊόντων προσδιορίζεται.

Τεχνικές σήμανσης για τους ιχνηθέτες DNA.

1. Τεχνικές ραδιοϊσοτοπικής σηματοδότησης του DNA.

-Θ [α - 32 P] χρησιμοποιείται συχνά για την ραδιοσήμανσης και ανίχνευση. Επειδή η μέθοδος ραδιοσήμανσης και ανίχνευσης έχει το μειονέκτημα της επικινδυνότητας στον ανθρώπινο οργανισμό, οι τεχνικές αυτές πρόκειται να αντικατασταθούν από μεθόδους μη-ισοτοπικής σήμανσης και μεθόδους ανίχνευσης, και ειδικότερα με μεθόδους σήμανσης με χημειοφωταυγή αντιδραστήρια και αντίστοιχης ανίχνευσης.

Παρασκευή ομοιόμορφης σήμανσης δίκλωνων DNA-ιχνηθετών. Για το είδος αυτό των ιχνηθετών, η μέθοδος σήμανσης μπορεί να εκτελεσθεί με την χρήση της “παραπλανητικής” (nick) μετάφρασης και μεθόδου τυχαίας-primer σήμανσης.

Μαρκάρισμα DNA στο άκρο του. Τερματικό μαρκάρισμα τμήματος DNA διπλού κλώνου για την παρασκευή DNA ιχνηθετών είναι χρήσιμο σ' έναν αριθμό εφαρμογών. Τα DNA μόρια μπορούν να μαρκαρισθούν είτε στο 3' ή στο 5' τέρμα με ποικιλία ενζυματικών αντιδράσεων. Για το μαρκάρισμα του 3'-τέρματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρεις διαφορετικές μέθοδοι που εξαρτώνται από τον ιχνηθέτη και την ειδική ραδιοενεργότητα που απαιτείται: (α) E. coli DNA πολυμεράση I (Klenow

2. DNA μη-ισοτοπικές τεχνικές σήμανσης.

~~Πολλές προσεγγίσεις περιγραφηκαν για την σήμανση των νουκλεονικών οξέων με μη-ραδιενεργά υβριδισμικά πρωτόκολα. Τα μόρια “μάρκες” μπορούν να προσδεθούν σε διαφορετικές θέσεις του ιχνηθέτη νουκλεϊνικού οξέος, αλλά για να επιτευχθεί ειδικός υβριδισμός μεταξύ του τροποποιημένου ιχνηθέτη και του στόχου DNA / RNA είναι σημαντικό η διεργασία της τροποποίησης να μην επηρεάζει την δομή του ιχνηθέτη σε βαθμό που η προσκόλληση να μην είναι αποτελεσματική. Επιπλέον ο σηματοδότης πρέπει να είναι γερά προσδεμένος στον ιχνηθέτη νουκλεϊνικό οξύ ώστε να αντέξει τα διάφορα στάδια σταθεροποίησης και της denaturation αφυσικοποίησης. Όταν η ομάδα μάρκα είναι απτένιο, το μόριο θα πρέπει να εκτίθεται ικανοποιητικά για να δώσει υψηλή συγγένεια (αντίσωμα) πρόσδεσης που είναι αναγκαία για υψηλή ευαισθησία και όπου η ομάδα μάρκα είναι ένζυμο, η ενζυματική δραστηριότητα θα πρέπει να διατηρείται κατά την ζεύξη στον ιχνηθέτη και υπό συνθήκας υβριδισμού [45, 55, 61, 63, 91, 99].~~

Τα διάφορα μη-ισοτοπικά συστήματα δύνανται να ταξινομηθούν σαν άμεσα ή έμμεσα. Στα άμεσα συστήματα οι ομάδες πληροφόρησης ζεύγνυνται απ' ευθείας με τους ιχνηθέτες. Συχνά χρησιμοποιούμενες άμεσες ομάδες σηματοδότησης είναι φθορισμικές, χρωστικές, όπως η φλουορεσκίνη και ροδαμίνη, και ένζυμα μάρκες, όπως η αλκαλική φωσφατάση (AP) ή η καρτοπεροξειδάση (HRP) συνδυασμένη με χημειοφωταυγή ανίχνευση ή με ενίσχυση μέσω αργύρου. Σε αντίθεση με τα άμεσα συστήματα, οι ομάδες σηματοδότησης στα έμμεσα συστήματα προσδένονται έμμεσα μέσω πρόσθετης (μη-ομοιοπολικής) αλληλεπίδρασης μεταξύ μιας ομάδας τροποποίησης του ιχνηθέτη και ενός παγκόσμιου indirector μορίου το οποίο αναγνωρίζει εξειδικευμένα και προσδένεται στον τροποποιημένο ιχνηθέτη. Έτσι, ένα έμμεσο σύστημα απαιτεί πρώτα αλλαγή του εξειδικευμένου για την αναλυόμενη ιχνηθέτη, με την εισαγωγή μιας ιδιαίτερης ομάδας τροποποίησης. Δύο κύριες προσεγγίσεις της σήμανσης του ιχνηθέτη διακρίνονται:

2.1. Χημική σήμανση των ιχνηθετών νουκλεϊνικών οξέων.

A. RNA σήμανση στο 3' τέρμα. Εκλεκτική οξειδωση με υπερϊωδικά στο cis-διολόν 3' τέρμα των RNAs οδηγεί στον σχηματισμό μιας δραστηκής διαλδεύδης, που αντιδρά με τις νουκλεόφιλες αμινοενώσεις, όπως οι αμίνες, τα σεμικαρβαζίδια, οι

περοξειδάση και η αλκαλική φωσφατάση έχουν συζευχθεί με μόρια μάρκες απ' ευθείας σε μονής λωρίδας DNA ιχνηθέτη.

H. Χημική τροποποίηση των ογινονουκλεοτιδίων. Τα ολιγονουκλεοτίδια μπορούν να σημανθούν εκλεκτικά στο 5'-τέρμα μέσω συνδετικού αρμού με χημική δραστική ομάδα. Η τερματική φωσφορική ομάδα φέρεται να αντιδράσει με υδατοδιαλυτό καρβοδιμίδιο σε ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου για να δώσει ένα 5'-φωσφορο ιμιδαζολίδιο. Ακόμη, τα βιοτινο-moieties (ήμισυ) μπορούν να ζευχθούν επίσης με το 5'-τέρμα των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων. Αυτό συμβαίνει με χημική σύζευξη ενός ουρύδουλο ομάδος residue (υπόλοιπου) και ακόλουθη στρατηγική παρόμοια της σύζευξης προς τις γειτονικές G-H ομάδες στο 3' τέρμα.

Το residue (υπόλοιπο) οξειδώνεται με υπεριοδικά, αντιδρά με βιότινο υδραζίδιο και σταθεροποιείται με αναγωγή με νατριοβοριουδρίδιο. Τέλος, η χημική τροποποίηση επιτρέπει μεγάλες ποσότητες ιχνηθέτου νουκλεϊνικού οξέος να τροποποιηθούν και αυτές οι χημικές αντιδράσεις, όταν προτυποποιηθούν είναι πολύ επαναλήψιμες.

2.2. Ενζυματική σήμανση των ιχνηθετών νουκλεϊνικών οξέων.

A. Τα διάφορα συστήματα σήμανσης. Ανάμεσα στα έμμεσα μη-ισοτοπικά συστήματα, τα πιο σημαντικά είναι η διγοξίνη (DIG), η βιοτίνη (bio) και η φλουορεσκεΐνη (fluor).

(α) Το σύστημα διγοξίνης. Το σύστημα DIG βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ DIG, ένα χημικό παράγωγο της αγκλικίνης της cardenolides διγοξίνης και lanatoside C που χρησιμοποιείται για να τροποποιήσει το προσδεμένο συστατικό και ενός υψηλής συγγένειας DIG-εξειδικευμένου αντισώματος σαν συστατικό ανίχνευσης. Με το DIG-σύστημα, η εξειδικευμένη ανίχνευση του DNA και RNA είναι δυνατή σε ποσότητες μικρότερες του pg.

(β) Το σύστημα βιοτίνης. Η ενζυματική σύνθεση των Latenized πολυνουκλεοτιδίων σαν ιχνηθέτες υβριδισμού περιγράφηκαν πρώτα χρησιμοποιώντας ανάλογα τις dUTP και UTP που περιέχουν μόριο

τυχαίο τρόπο διαμέσου ενζυματικής προσθήκης σημανθέντων νουκλεοτιδίων. Οι ιχνηθέτες που παράγονται με τυχαία σήμανση συνίστανται σε μεγάλο ποσοστό από μικρά κλάσματα συγκρινόμενα με αυτά που παρασκευάζονται με την προηγούμενη μέθοδο.

- (γ) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η τεχνολογία PCR εισήχθη για τον επιτόπου υβριδισμό με στόχο την επίτευξη ειδικών ανθρώπινων ιχνηθετών από rodent x ανθρώπινες υβριδικές γραμμές κυττάρων που περιέχουν ένα ανθρώπινο χρωμόσωμα ή τεχνικά χρωμοσώματα σταριού (YACs) με ανθρώπινα ένθετα (inserts) μέχρι 800 kb.
- (δ) Primed επιτόπου σήμανση (PRINS). Η μεθοδολογία PRINS είναι μια γρήγορη και απλή τεχνική βασισμένη στην ενσωμάτωση τροποποιημένων με (βιοτίνη, διγοξίνη FITC) dNTPS σε DNA που συντίθεται επιτόπου με ολιγονουκλεοτίδια ή μετουσιωμένα αφυσικοποιημένα τμήματα κλωνοποιημένου DNA για primer. Επιτρέπει την εξειδικευμένη αλληλουχίας ανίχνευση των επαναλαμβανόμενων DNA αλληλουχιών.
- (ε) Αντιγραφή στο εργαστήριο. Μονόκλωνοι RNA ιχνηθέτες παρασκευάζονται με εργαστηριακή αντιγραφή χρησιμοποιώντας πλασμίδια που περιέχουν βακτηριοφάγου - RNA-πολυμεράσης - εξειδικευμένους ενισχυτές. Οι μονόκλωνοι ιχνηθέτες έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν μπορούν να επανακολληθούν σε διάλυμα.

(στ) Σήμανση ολιγονουκλεοτιδίου:

- i. 3'-σήμανση. Πολλές μέθοδοι έχουν περιγραφεί για ενζυματική σήμανση στο 3'-τέρμα των ολιγονουκλεοτιδίων. Εν γένει, περιλαμβάνουν την ενζυματική ενσωμάτωση των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων.
- ii. 5'-σηματοδότηση. Ολιγονουκλεοτίδια μπορούν να συντεθούν που να περιέχουν μια αλειφατική αμινομάδα στο 5'-τέρμα. Πολλά αμινοτροποποιημένα νουκλεοτίδια παρασκευάστηκαν για κατάλληλη χημική ενσωμάτωση στους DNA ιχνηθέτες. Το ένζυμο αλκαλική

η αλκυλίωση των φαινολικών, σουλφιδρυλικών ή ελεύθερων αμινομάδων με δραστικές ομάδες στον φορέα. Μια άλλη ευρέως χρησιμοποιηθείσα μέθοδος για την ακινητοποίηση του ενζύμου αναπτύχθηκε που χρησιμοποιεί τα αντιδραστήρια βρωμοκυανικό (CNBr). Ένα ένζυμο που κατέχει μια προσβάσιμη σουλφιδρυλική ομάδα που δεν είναι απαραίτητη για να προσδώσει δραστικότητα μπορεί να συνδεθεί σε παρόμοια ομάδα σε φορέα για σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας.

Παγίδευση ενός ενζύμου επιτυγχάνεται συχνά εντός του σκελετού μιας πολυμερισθείσης πηκτής. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται πιο συχνά. Εναλλακτικά ένα ένζυμο μπορεί να παγιδευτεί εντός της ημιπερατής μεμβράνης μιας μικροκάψουλας. Μια άλλη τεχνική καψουλοποίησης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση του ενζύμου είναι ο σχηματισμός λιποσωμάτων.

Ακινητοποίηση με διασύνδεση μορίων ενζύμου συχνά επέρχεται με την δράση της γλουταραλδεύδης όπου οι δύο αλδεϋδικές ομάδες σχηματίζουν βάσεις του Schiff με τις ελεύθερες αμινομάδες.

Ιδιότητες των ακινητοποιημένων ενζύμων. Οι ιδιότητες ενός ακινητοποιημένου ενζύμου μπορεί να είναι διαφορετικές από εκείνες του ίδιου ενζύμου στο διάλυμα και αμφότερες εξαρτώνται από την μέθοδο ακινητοποίησης και την φύση του αδιάλυτου φορέα. Η σταθερότης ενός ενζύμου στην θέρμανση και την αποθήκευση μπορεί να μεταβάλλεται. Το βέλτιστο pH μπορεί να μεταβληθεί μέχρι και 2 μονάδες. Το φαινόμενο K_m μπορεί επίσης να επηρεασθεί από το ηλεκτροστατικό πεδίο του φορέα και μπορεί να μειωθεί σημαντικά όταν χρησιμοποιείται φορέας που είναι αντίθετου φορτίου αυτού του υποστρώματος.

Ο συνήθως χρησιμοποιούμενος φορέας για την ανάλυση πρωτεϊνών είναι η σεφαρόζη, η νάλυον μεμβράνη, ο γυάλινος σωλήνας ή το πορώδες γυαλί.

Ακινητοποίηση Νουκλεϊνικών Οξέων [114-116]

Οι τεχνικές ακινητοποίησης νουκλεϊνικών οξέων σε στερεά στηρικτικά υλικά είναι πολύ σημαντικές στην ανάλυση του DNA, RNA ιδιαίτερα μετά την ταχεία ανάπτυξη της έρευνας για βιοαισθητήρες νουκλεϊνικών οξέων.

σχηματισμό φωσφοραμιδικού δεσμού μεταξύ 5' τέρματος φωσφορικής ομάδας και των μικροπηγαδιών. Τα DNA μόρια που είναι προσδεμένα ομοιοπολικά μόνο στο 5' τέρμα είναι ιδανικά για υβριδισμό.

Ομοιοπολική ακινητοποίηση μονόκλωνου DNA σε οπτικές ίνες με την χρήση διάφορων προσδετών.

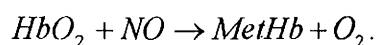
- (α) Συντηγμένης πυριτίας οπτικές ίνες επεξεργάστηκαν με γ-αμινοπροπυλοτριαιθοξυσιλάνιο (APTES) και περαιτέρω επέκταση με 12-νιτροδωδεκανοικό οξύ μέσω σχηματισμού αμιδίου. Το τερματικό νιτρομήμισυ ανήχθει σε αμίνη για να δώσει τον υδρόφοβο spacer (αρμό) μόριο που είναι κατάλληλο για ομοιοπολική προσάρτηση ενός ολιγονουκλεοτιδίου.
- (β) Οι ίνες ενεργοποιούνται με 3-γλυκιδιοξυπροπυλοτριμεθυλοσιλάνιο και προσδέονται ένας υδρόφιλος spacer (διαχωριστικός) αρμός που συνίσταται από 1-17-διαμινο-3,6,9,12,15-πενταοξαδεκαεπτάνιο.

Το ολιγονουκλεοτίδιο (dT20) προσδέεται μετά σε οιονδήποτε από τους δύο τύπους spacer (διαχωριστικούς) αρμούς με φωσφοραμιδικό δεσμό μεταξύ της τερματικής αμίνης του spacer (διαχωριστικού) μορίου και της 5'-φωσφορικής ομάδας του DNA μέσω της μεσολάβησης της αντίδρασης συμπύκνωσης καρβοδιμιδίου.

1.4. ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) παίζει σημαντικό ρόλο σαν ένας σημαντικός βιολογικός δευτερεύον διαβιβαστής σε μεγάλο αριθμό λειτουργιών του ανθρώπινου οργανισμού. Στο καρδιαγγειακό σύστημα σαν χαλαρωτικός παράγων που παράγεται από ενδοθήλια (EDRF) είναι υπεύθυνος για την χαλάρωση του λείου αγγειακού μυός, την πτώση της πίεσης και την αποφυγή της συσπείρωσης των πλάτελετς. Στο κεντρικό και περιφερειακό νευρικό σύστημα, σαν νευροδιαβιβαστής είναι υπεύθυνος για την κυτταρική επικοινωνία. Στο ανοσοποιητικό σύστημα, δρα σαν το κυρίως μόριο αμύνης με ανοσοκύτταρα, ενδοκυτταρικά βακτήρια, κλπ. Ακόμη, παρά την εξαιρετική σημασία του NO στην υγεία των οργανισμών, έχει επίσης συνδεθεί με μεγάλο αριθμό παρενεργειών λόγω της δραστηκής ελεύθερης ρίζας. Τελευταία, αναφέρθηκε ότι είναι συνένοχο για την εμφάνιση ποικίλων ασθενειών όπως σε καρδιακές προσβολές,

Άμεσες επιδράσεις του NO: Άμεσες επιδράσεις περιλαμβάνουν τις αλληλεπιδράσεις του NO με τους χημικούς ή βιολογικούς στόχους. Το NO αντιδρά με τα μέταλλα. Οι αντιδράσεις με τα μεταλλικά κέντρα είναι κρίσιμες για την κατανόηση της βιορυθμιστικής συμπεριφοράς του NO και γι' αυτό το μόριο αυτό μπορεί να είναι σηματοδοτικός παράγων. Η αντίδραση του NO με μερικά σύμπλοκα μεταβατικών στοιχείων έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό μεταλλο-νιτροζυλο adducts (προϊόντων πρόσθεσης). Η ταχύτης των αντιδράσεων αυτών, καθώς και η σταθερότης των σχηματιζόμενων μεταλλο-νιτροζυλο ενώσεων εξαρτάται από την φύση του μετάλλου και των υποκατάστατων του στην σφαίρα ένταξής των. Το NO αντιδρά με τον Fe(II) ιόν και σχηματίζει απλό νιτροζυλο-Fe(II). Οι πρωτεΐνες που περιέχουν αιμίνη είναι σημαντικές στην βιολογία του NO. Για παράδειγμα, η αντίδραση του NO και συνπαραγόντων αιμίνης εντός της πρωτεΐνης είναι σημαντικές στην ρύθμιση της δραστηριότητας της γονιλατοκυκλάσης. Το NO έχει δειχθεί να προσδέεται στην ποίεty αιμίνης της πρωτεΐνης αυτής και να ερεθίζει την μετατροπή του GTP και του cGMP. Μια άλλη σημαντική άμεση αντίδραση του NO είναι η αλληλεπίδρασή του με κυτόχρωμα P₄₅₀. Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι το NO παρεμποδίζει την δράση του P₄₅₀ των θηλαστικών που θεωρείται ότι ρυθμίζει τον μεταβολισμό των ορμονών και υπό μολυσματικές συνθήκες μειώνει τον μεταβολισμό φαρμάκων στο ήπαρ. Ένας κύριος ελεγκτικός μηχανισμός των συγκεντρώσεων NO in vivo είναι η απ' ευθείας αντίδραση το NO με μεταλλοπρωτεΐνες. Το NO αντιδρά με την οξυαιμογλοβίνη (HbO₂) ή οξυμυογλοβίνη, για να σχηματίσει νιτρικά και την μεθαιμογλοβίνη (MetHb) ή την μετμυογλοβίνη. Η αντίδραση που προτάθηκε για την τελευταία αποτελεί τον καίριο μηχανισμό ελέγχου του NO in vivo.



Η αντίδραση της φερρυλαμινο-πρωτεΐνης με το NO είναι σημαντική για την κατανόηση του μηχανισμού προστασίας μέσω του NO από τα δραστικά σωματίδια του οξυγόνου.

Αντιδράσεις με ρίζες: Επειδή το NO έχει το μονήρες ασύζευκτο ηλεκτρόνιο γενικά αντιδρά ταχύτατα με άλλες ρίζες.

Το NO αντιδρά με υδροξυλική ρίζα. $NO + OH \rightarrow HNO_2$

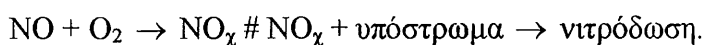
$RS\dot{H} + NO_x \rightarrow RSNO + NO_2^-$. Οι πρωτεΐνες που περιέχουν σουλφυδρύνιο όπως η γλουταθειόνη έχουν υψηλή συγγένεια για το ενδιάμεσο αυτό και σχηματίζουν S-νιτροδοθειόλο πρόσθετα.

Βιοχημικές δράσεις των RNOS. Ένας αριθμός διαφορετικών ενζύμων παρεμποδίζονται από τα NO-παραγόμενα RNOS. Το NO μπορεί να παρεμποδίσει αντιστρεπτά την δραστηριότητα του κυτοχρώματος P₄₅₀ μέσω της ένταξης NO στο συνένζυμο αιμίνης και με την μορφή του NO_x.

Δυο πρωτεΐνες διόρθωσης του DNA απεδείχθη ότι παρεμποδίζονται από ενδιάμεσα στην αυτοξειδωση του NO (NO_x). Η συγγένεια του NO_x να σχηματίσει S-νιτροδοθειόλης σύμπλοκα προϋποθέτει ότι οι πρωτεΐνες που είναι πλούσιες σε θειολικά περιβάλλοντα θα είναι επιδεκτικές μιας τέτοιας αντίδρασης. Μια άλλη τάξη αλληλεπιδρώντων με DNA πρωτεϊνών που έχουν πλούσια θειολικά περιβάλλοντα είναι αυτές με Zn-δακτυλικά μοτίβα. Έχει δειχθεί ότι υπό αερόβιες συνθήκες το NO προκαλεί αποσύνθεση πρωτεϊνών που περιέχουν Zn-δακτυλικά μοτίβα.

Η δραστηριότητα κάποιων ενζύμων παραμένει ανεπηρέαστη από την παρουσία NO και NO_x αλλά τα προϊόντα της δράσης των επηρεάζονται.

Η χημεία νιτρόδωσης της NO/O₂ αντίδρασης μπορεί να παρεμποδισθεί από την παρουσία του υπεροξειδίου που παράγεται από την ξανθινοξειδάση



Τα σχηματιζόμενα RNOS είτε μέσω NO/O₂ ή NO/O₂⁻ αντίδρασης είναι βασικά στην κατανόηση της τοξικολογίας του μονοξειδίου του αζώτου.

Τέλος ο διαχωρισμός των χημικών αντιδράσεων του NO σε άμεσες και έμμεσες παρέχει τον σκελετό για την αξιολόγηση του ρόλου του NO σε διαφορετικές βιολογικές διεργασίες. Η πολυποίκιλη συμπεριφορά προστασίας του NO έναντι της τοξικότητας των ROS που πάλι δημιουργεί τοξικότητα σε άλλους παράγοντες, επιβεβαιώνει την πεποίθηση ότι ο ρόλος του NO σε κάθε περίπτωση πρέπει να αξιολογηθεί προσεκτικά.

Η δράση του Μονοξειδίου του Αζώτου στο ανθρώπινο σώμα. [195, 196, 203–207].

Το Μονοξείδιο του αζώτου απεδείχθη ένας αντιστρεπτός παρεμποδιστής της κυτοχρωμο-C Οξειδάσης (CcO) στην αλυσίδα της μεταφοράς ηλεκτρονίου. Το μονοξείδιο του αζώτου συντίθεται in vivo με τα ένζυμα NO συνθάσες που

συγκόλληση, και χαρακτήρα συσπείρωσης των αιμοπεταλίων [204]. Το μονοξειδίο του αζώτου μπορεί να ρυθμίσει την μικροαγγειακή διαπερατότητα και να παρέχει επιζητούμενες δράσεις εισπνοής σε ασθενείς με οξεία αναπνευστικά σύνδρομα κατάθλιψης [205].

Ο παραγόμενος από ενδοθήλια χαλαρωτικός παράγων (EDRF) είναι οξειδίο του αζώτου [124], και αποκρίνεται στην χαλάρωση του λείου μυός των αγγείων. Παρεμποδίζεται από την αιμογλοβίνη και ενισχύεται από την σουπεροξειδική δισμουτάση [125]. Ο μηχανισμός της παρεμποδιστικής δράσης της φαινιδόνης, της 3-αμινο-1-[μ-(τριφθορομεθυλο)φαίνυλο]-2-πυραζολίνης (BW 755 C) [127], της διθειοθρεϊτόλης, της υδροκινόνης, και της πυρογαλλόλης στην αγγειακή χαλάρωση που επάγεται από την EDRF εξετάσθηκε. Η N^4 - μονομέθυλο L - αργινίνη (MeArg) παρεμποδίζει την έκκριση EDRF από τα ενδοθήλια (EC) και το σχηματισμό NO από L-αργινίνη [126, 128]. Η απελευθέρωση NO μπορεί να εξαναγκαστεί από βραδικινίνη (BK) και ATP, GTP [129]. Ο μηχανισμός της ελευθέρωσης μονοξειδίου του αζώτου (NO) που στηρίζει την αγγειοχαλαρωτική και αντισυσσωματική επίδραση της 3,4-διυδροδιαζυλο 1,2-διοξειδίου (DD) μελετήθηκε [130]. Υδατοδιαλυτά παράγωγα φουροξανίου (Furoxan) συνετέθησαν σαν προφάρμακα NO [131]. Το προφάρμακο δότου NO σχεδιάστηκε και βρέθηκε να δρα επιλεκτικά στο ήπαρ και να μπορεί να επάγει απόπτωση και τοξικότητα στο ήπαρ [132].

1.4.2. Σχηματισμός Μονοξειδίου του Αζώτου και NO – Συνθάσης.

Παραγωγή και σχηματισμός μονοξειδίου του αζώτου.

Παραγωγή αερίου μονοξειδίου του αζώτου [158]. Το μόριο του NO απαιτεί θετική ενέργεια σχηματισμού Gibbs, και δεν μπορεί να παρασκευασθεί άνετα σε υψηλές αποδόσεις με την αντίδραση των μορίων N_2 και O_2 , γι' αυτό η βιομηχανική του παραγωγή επιτελείται μέσω της καταλυτικής οξείδωσης της αμμωνίας. Η αναγωγή του νιτρώδους σε υδατικό διάλυμα από το ιόν ιωδίου επίσης χρησιμοποιείται [133]. Το αέριο NO αντιδρά με O_2 στην αέρια φάση και σχηματίζει NO_2 , γι' αυτό οιαδήποτε σύνθεση και αν χρησιμοποιηθεί πρέπει να γίνει υπό αναερόβιες συνθήκες και το προϊόν να καθαρισθεί προσεκτικά. Το εμπορικό NO που αποθηκεύεται υπό πίεση, περιέχει ακαθαρσίες λόγω της αντίδρασης $3NO \rightarrow N_2O + NO_2$. Για την παρασκευή του με στόχο την μελέτη υδατικών NO συστημάτων είναι σημαντικό ο διαλύτης να αποξυγνωνωθεί εντελώς, επειδή το NO_2 και, το N_2O_3 που σχηματίζονται

νιτροδοενώσεις, S-νιτροδοθειόλες, sydνονιμίμες, φουροζάνια και ανόργανες ενώσεις όπως νιτρώδη και νιτροπρωσικά έχουν διερευνηθεί [134].

Το μονοξειδίο του αζώτου παρασκευάζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα από την L-αργινίνη και τα αγγειακά ενδοθήλια κύτταρα παρουσία NADPH και δισθενή κατιόντα, όπως Ca^{2+} , Mg^{2+} . Περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι η όλη ενζυματική πορεία επιτελείται από την NO-συνθάση (NOS), και η περαιτέρω έρευνα προσανατολίσθηκε στην κατανόηση αυτού του είδους του ενζύμου [135-138].

NO – Συνθάση [NOS]

Η NOS έχει τρεις διαφορετικές ισομορφές που απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν από κύτταρα διαφορετικών οργάνων των ζώντων οργανισμών. Το eNOS προέρχεται από τα ενδοθήλια κύτταρα, ενώ τα nNOS ή bNOS από τα κύτταρα του νευρικού συστήματος όπως του μυελού. Το iNOS επάγεται από το ανοσοποιητικό σύστημα όπως τα μακροφάγα κύτταρα. Παρ' όλες τις διαφορές τους στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης, όλες οι μορφές του ενζύμου έχουν τις ίδιες τέσσερις προσθετικές ομάδες ήτοι το φλαβινο-αδενινο δινουκλεοτίδιο (FAD), φλαβινομονονουκλεοτίδιο (FMN), σίδηρο πρωτοποροφυρίνη (αιμίνη) και τετραϋδροβιοπτερίνη (H₄BP). Η δραστικότητα αυτού του είδους του ενζύμου εξαρτάται από το NADPH και το Ca^{2+} , ενώ απαιτείται, και η Ca-εξαρτώμενη ρυθμιστική πρωτεΐνη, ονομαζόμενη καλμοδουλίνη.

Γενικά χαρακτηριστικά κατάλυσης του ενζύμου NOS. Η NOS είναι ομοδιμερής πρωτεΐνη που παράγει NO καταλύοντας την οξείδωση ενός γουανιδινικού ~~αζώτου~~ αζώτου (5 ηλεκτρόνια) της L-αργινίνης (L-arg). Σημαντική πρόοδος στην δομή και δράση της NOS επετεύχθη με την μέθοδο μοριακής κλωνοποίησης του nNOS ποντικού και την επίλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων της [181].

Τα NOS είναι διμερή ένζυμα που καταλύουν την σταδιακή μετατροπή της L-αργινίνης σε NO και κιτρολίνη παρουσία NADPH και O_2 που δρουν σαν συνυποστρώματα στην αντίδραση. Οι ακόλουθοι συνπαράγοντες ήταν αναγκαίοι για την δραστικότητα του NOS όπως τετραϋδροβιοπτερίνη,θειόλη [γλουταθειόνη ή διθειοθρεϊτόλη (DTT)], FAD, FMN, και πρωτοποροφυρίνη IX (αιμίνη). Όλες οι τέσσερις προσθετικές ομάδες έχουν ρόλους στην μεταφορά ηλεκτρονίου και/ή στα στάδια ενεργοποίησης του οξυγόνου που οδηγούν στην σύνθεση του NO. Έκαστη NOS ισομορφή έχει μία CaM-πρόσδεσης ομοιότυπη (consensus) αλληλουχία,

Περιοχή πρόσδεσης FAD: Για περίπου 50 αμινοξέα από το τέρμα της FMN περιοχής, η ομόλογος αλληλουχία διατηρείται η ίδια σ' όλα τα NOSs αλλά αυτό δεν ισχύει στην κυτόχρωμα P₄₅₀ αναγωγάση (CPR). Η ομόλογος αλληλουχία στην φερρεδοξινο-NADP⁺ αναγωγάση (FNR: PAD-περιέχουσα τετραϋδρογονάση), αρχίζει κατά προσέγγιση 40 αμινοξέα από το τέρμα της FMN περιοχής της CPR και εκτείνεται για 60 αμινοξέα πριν διακοπεί από ένα 117-υπόλοιπο (residue) ένθετο. Η θέση πρόσδεσης της NADPH πυροφωσφορικής στο NOS αποδίδεται σ' ένα διατηρηθέν ομοτυπίας μοτίβο, GXGXGX που έχει θεμελιωθεί ότι συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου με το πυροφωσφορικό στην γλουταθειονοαναγωγάση.

Οι διάφορες ισομορφές του NOS καθарίσθηκαν και αναλύθηκαν για την καλύτερη κατανόηση του είδους αυτών των ενζύμων. Επιπροσθέτως η παρασκευή εκλεκτικών και εξειδικευμένων αντισωμάτων για τα nNOS, eNOS και iNOS διευκολύνει τον χαρακτηρισμό και την μελέτη της δράσης αυτών των πρωτεϊνών. Η ταυτοποίηση του NO σαν βιολογικό παράγοντα και η εύρεση της θέσης του στις NOS-ισομορφές, θα οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση της φυσιολογίας και παθοφυσιολογίας του NOS [182, 183].

Μελέτες διαφόρων παρεμποδιστών του NOS. Μονοξειδίο του αζώτου και L-κιτροουλίνη παράγονται κατά την οξείδωση της L-αργινίνης σε διεργασία δύο σταδίων από τα τρία ισοένζυμα της συνθετάσης του NO, δηλαδή το επαγωγίμο NOS (iNOS), το ενδοθύλιο NOS (eNOS) και το νευρωνικό NOS (nNOS). Επειδή τα τρία ισοένζυμα παράγουν NO σε διαφορετικούς ιστούς για διαφορετικούς λόγους σε υγιείς αλλά και αρρωστημένους οργανισμούς, η εκλεκτική παρεμπόδιση του κατάλληλου ισοενζύμου θα μπορούσε να αποφύγει περιπλοκότητες στην θεραπεία ενός αρρώστου.

Για την δημιουργία εκλεκτικών παρεμποδιστών του NOS απαιτείται η εύκολη προμήθεια όλων των ανθρώπινων ισοενζύμων NOS σε αρκετή ποσότητα. Το iNOS απομονώθηκε από την ομάδα κυττάρων DLD-1 του καρκινώματος του κόλου εντέρου, το eNOS από τον πλακούντα, και το nNOS από τον μυελό. Με την χρήση μεθόδου κινητικού προσδιορισμού καθορισμένης χρονικής στιγμής εξετάσθηκε παρουσία διαφόρων παρεμποδιστών η ταχύτητα παραγωγής ισοκιτροουλίνης (ITC), όπως η ισοθειουρία (ITU). [184]

υδροζινοένωση που περιέχει δύο χημικά ισοδύναμα γουανιδινο-άζωτα. Αρχικά ταυτοποιήθηκε σαν παρεμποδιστής του μη-ενζυματικού σχηματισμού τελικών προϊόντων προχωρημένης γλύκωσης (AGE). Η παρεμποδιστική δράση της iNOS εκτιμήθηκε με εξέταση της επίδρασης της αμινογουανιδίνης στην συσσώρευση νιτρώδους από την RINm5F ομάδα ινσουλινομάτος αρουραίου που ερεθίστηκε με ιντερλευκίνη -1 (IL-1) [187].

Οι μελέτες επικεντρώθηκαν στην επαγωγή του iNOS που προκαλείται από ενδοτοξίνη (όπως τον πολυλιποσακχαρίτη, LPS), λιπoteichoic οξύ (LTA), ή κυτοκίνες εν ζώη οργανισμούς και στο εργαστήριο για την κατανόηση της δράσης. Υπάρχουν τώρα αποδεικτικά στοιχεία ότι η ενεργοποίηση των κυττάρων (π. χ. μακροφάγων) από το LPS (μελετώντας την πρόσδεση του LPS στο CD14 αποδέκτη της επιφάνειας των κυττάρων αυτών) οδηγεί στην δημιουργία πολυάριθμων κυτοκινών (π.χ. IL-1, TNF α , INF γ) ή PAF (παράγοντα ενεργοποίησης πεταλίων) τα οποία από μόνα τους ή σε συνδυασμό προκαλούν την ενεργοποίηση ποικιλίας κυττάρων [188].

Οι πρωτεΐνες της NOS κλωνοποιήθηκαν και εκφράστηκαν. Αποτελεσματικές μέθοδοι έκφρασης των πρωτεϊνών NOS αναπτύσσονται σε μελέτες της υπερέκφρασης και μεταλλαξιγένεσης. Όλες οι ισόμορφες NOS έχουν επιτυχώς μεταφερθεί σε κύτταρα θηλαστικών, όπως ανθρώπινο εμβρυακό νεφρό σε 293 κύτταρο και COS κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε βακυλο ιός για να εκφράσει μεγαλύτερες ποσότητες δραστικών NOS. Η μεταλλαξιγένεση και η ετερόλογος έκφραση του NOS χρησιμοποιούνται για να κόψουν τα ειδικά τμήματα που είναι σημαντικά για αλληλεπίδραση παραγόντων και κατάλυση [189, 191].

Οι τεχνικές για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της ισομορφής NOS ανεπτύχθησαν, και περιλαμβάνουν τις μεθόδους φωσφορυλίωσης, μυριστυλίωσης και παλμιτιδίωσης. Περιγράφονται οι περισσότερες λεπτομέρειες των πειραματικών πρωτοκόλλων για την μελέτη των τροποποιήσεων eNOS. Οι μέθοδοι αυτοί, μπορούν να εφαρμοσθούν σε διερευνήσεις μετα-μεταφραστικών διεργασιών και άλλων NOS ισομορφών [190].

Ιδιότητες των ακινητοποιημένων NOS. Το NOS ακινητοποιήθηκε σε GPG με γλουταραλδεύδη. Το NO παράγεται από την L-αργινίνη παρουσία Ca^{2+} . Το ακινητοποιηθέν NOS εμφανίζει μεγάλη διαφορά από ελεύθερο NOS σ' όλες τις ιδιότητές του, π.χ. η δραστικότης του ακινητοποιημένου NOS είναι ανεξάρτητη της

NO είναι γραμμικά ανάλογο της συγκέντρωσης, το ρεύμα οξειδωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν αναλυτικό σήμα [159]. Διάφοροι αισθητήρες προτάθηκαν για τον προσδιορισμό του NO.

α. Ο πορφυρινικός αισθητήρας βασίζεται στην ηλεκτροχημική οξείδωση του NO πάνω σε αγώγιμο πολυμερική πορφυρίνη. Στον πορφυρινικό αισθητήρα, το NO οξειδώνεται προς πολυμερική μεταλλοπορφυρίνη (n-τύπου ημιαγωγός) επί της οποίας η αντίδραση οξείδωσης συμβαίνει στα 630 mV (πρότυπο ηλεκτρόδιο καλομέλανος (SCF)), 270mV χαμηλότερα από το δυναμικό που απαιτείται για τα μεταλλικά ηλεκτρόδια ή τα ηλεκτρόδια άνθρακος. Η απόδοση σε ρεύμα (αναλυτικό σήμα) της αντίδρασης είναι υψηλή, ακόμη και στο φυσιολογικό pH του 7, 4.

β. Ο καθετήρας Clark βασίζεται σε ηλεκτρόδιο οξυγόνου Clark και λειτουργεί κατά την αμπερομετρική μεθοδολογία. Ο καθετήρας Clark συνίσταται από σύρμα πλατίνας σαν ηλεκτρόδιο εργασίας (άνοδος) και σύρμα αργύρου σαν αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο (κάθοδος). Τα ηλεκτρόδια στηρίζονται σε τριχοειδή σωλήνα γεμάτο με χλωριούχο νάτριο/HCl οξέος που διαχωρίζεται από το διάλυμα της αναλύμενης με διαπερατή σε αέριο μεμβράνη. Ένα σταθερό δυναμικό 0,9v εφαρμόζεται και το ρεύμα (αναλυτικό σήμα) μετρείται από την ηλεκτροχημική οξείδωση του NO στην άνοδο της πλατίνας. Ακόμη, ένα NO-ευαίσθητο ηλεκτρόδιο που καλύπτεται με Ni (TMPP) κατασκευάζεται με ηλεκτροχημική οξείδωση (ανοδοποίηση) που ενισχύει την ευαισθησία του ηλεκτροδίου ενός άνθρακος στην ανίχνευση του NO. Περαιτέρω με χρήση του δευτέρου υλικού, Nafion, στο ηλεκτρόδιο επετεύχθη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για το NO [160].

Χρωματομετρικοί προσδιορισμοί του NO. Οι δραματικές μεταβολές που προκαλούνται στα διαλύματα ABTS (2,2'-αζινο δις-(3-βενζοθειαζόλινο-6-σουλφονικό οξύ) ή SULF (σουλφανιλαμίδιο)/NEDD (N-(1-ναφθυλο)-αιθυλενοδιαμίνη δι – υδροχλωρική) από το NO, χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση εργαστηριακών πειραμάτων που σχετίζονται με χορήγηση ή με λήψη δόσης NO σε ζώντες οργανισμούς. Η μέθοδος της οξείδωσης του σιδηροκυανικού μπορεί να χρησιμοποιηθεί με συγκεντρώσεις NO ψηλότερες των 25 μM, ενώ το ABTS μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις όπως αυτές των 2 μM. Αυτές οι οξειδωτικές μέθοδοι είναι χρήσιμες αλλά παρεμποδίσσεις από αναγωγικές ενώσεις μπορούν να περιορίσουν την χρήση τους. Η μέθοδος SULF/NEDD δεν υπόκειται στα προβλήματα αυτά, και είναι ακριβής σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 5 μM NO. Οι τεχνικές αυτές είναι σχετικά απλές και απαιτούν μόνο ένα φασματοφωτόμετρο

(γ) Μέτρηση των νιτρικών και νιτρωδών με την χρήση νιτρικής αναγωγάσης και αντίδρασης Griess.

Η αντίδραση Griess απεδείχθη εξαιρετικό αναλυτικό εργαλείο. Όταν για τον προσδιορισμό χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με χρήση της νιτρικής αναγωγάσης, είναι ευαίσθητος, ακριβής, ανέξοδος, και προσιτός απ' όλα τα εργαστήρια για την μέτρηση νιτρωδών και νιτρικών σε καλλιέργειες ιστών και σε βιολογικά υγρά. Όταν παρασκευάζονται και χρησιμοποιούνται σωστά, οι νιτρικές αναγωγάσες είναι πολύ αποτελεσματικά αναλυτικά εργαλεία [166].

(δ) Ανάλυση των νιτρικών, νιτρωδών και της δραστικότητας της NOS με αυτοματοποιημένη τεχνική έγχυσης σε ροή (FIA).

Μια αυτοποιημένη τεχνική FIA για την ανάλυση νιτρικών και νιτρωδών του εγκεφάλου και της εφαρμογής του για τον προσδιορισμό της δραστικότητας NOS περιγράφηκε που βασίζεται στην αρχή της αντίδρασης Griess για το διαζωνιακό ιόν [167].

(ε) Μικροτιτλοδοτική ανάλυση για τον προσδιορισμό της κινητικής της NOS αντίδρασης.

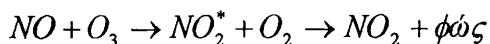
Η παραγωγή του NO συνάγεται από την ταχύτητα της οξείδωσης της σιδηροαίμης από το NO που οδηγεί σε προοδευτική αύξηση στη απορρόφηση, A_{450} . Ο προσδιορισμός NO με χρήση της ικανότητας της σιδηροαίμης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μετρήσουμε ποσοτικά την παραγωγή NO από οιαδήποτε πηγή. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε στον προσδιορισμό του NOS σε ακατέργαστα και καθαρισμένα παρασκευάσματα ενζύμου [168].

Ανίχνευση του NO με χρήση τεχνικής συντονισμού ηλεκτρονικού σπιν (ESR)

(α) Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά με πολλούς ενδοκυτταρικούς στόχους αίμης και μη-αίμης και δημιουργεί ESR-ανιχνευόμενα νιτρωδο-σύμπλοκα. Αυτά τα σύμπλοκα έχουν χαρακτηριστικά φάσματα ESR που μπορούν να ανιχνευθούν σε συνήθειες και χαμηλές θερμοκρασίες. Σιδηρο-διθειοκαρβαμιδικά μπορούν να προστεθούν σαν εξωγενείς παγίδες για να ανιχνεύσουν ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό σχηματισμό του NO. Τα νιτρονυλο-νιτροξείδια αντιδρούν με NO και σχηματίζουν ιμινο-νιτροξείδια. Αυτή η μετατροπή μπορεί να παρακολουθείται

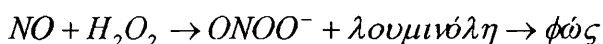
Προσδιορισμός του NO με μέθοδο χημειοφωταύγειας.

(α) Αντίδραση του NO με όζον (O₃) προς σχηματισμό ενεργοποιημένου διοξειδίου του αζώτου (NO₂^{*}) που στην συνέχεια εκπέμπει φωτόνιο κατά την αποδιέγερσή του σε NO₂ (βασική κατάσταση) με εκπομπή φωτονίου προσδιορίζεται με την ένταση χημειοφωταύγειας



Οι μέθοδοι χημειοφωταύγειας που χρησιμοποιήθηκαν για άμεση μέτρηση του σχηματισμού NO είναι γρήγορες και αξιόπιστες. Οι μέθοδοι χημειοφωταύγειας χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του σχηματιζόμενου NO και την έκκρισή του από ενδοθήλια κύτταρα, για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της NOS, για την παραγωγή NO κατά την διάρκεια της μεταμόρφωσης των νιτροαγγειοδιασταλτικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων της τρινιτρογλυκερίνης και του νιτροπρωσικού νατρίου καθώς και για την παραγωγή NO κατά την διάρκεια της φωτοχημικά επαγόμενης διάσπασης του νιτροπρωσικού νατρίου και την στρεπτοζοτοκίνης. Ο χημειοφωταυγής προσδιορισμός χρησιμοποιείται επίσης για να επιβεβαιώσει ότι δίνεται με εισπνοή η επιθυμητή NO δόσης κατά την θεραπεία επίμονων πνευμονικών υπερτάσεων των νεογνών, και των ενήλικων λόγω αναπνευστικού καταθλιπτικού συνδρόμου [161].

(β) Το NO αναφέρεται πως αντιδρά με το H₂O₂ και σχηματίζει περοξυνιτρώδες (ONOO⁻) που είναι ισχυρότερο οξειδωτικό από το H₂O₂ [153]. Η χημειοφωταυγής αντίδραση της λουμινόλης με περοξυνιτρώδες χρησιμοποιείται σαν βάση για την ανίχνευση της παραγωγής NO σε βιολογικά δείγματα.



Το σύστημα λουμινόλης - H₂O₂ είναι ειδικά δραστικό για το NO και οι άλλες αζωτούχες ενώσεις (οργανικά νιτρώδη, οργανικά νιτρικά και θειονιτρωδοενώσεις) ή παραγόμενες από τα ενδοθήλια δεν παρεμποδίζουν. Γενικά ο χημειοφωταυγής προσδιορισμός θεωρείται πως είναι η πιο χρήσιμη μέθοδος για τον λίαν ευαίσθητο και τρέχοντα χρόνου (real time) προσδιορισμό ασταθών ριζών χαμηλών συγκεντρώσεων σε βιολογικά διαλύματα.

Πρόσφατες μέθοδοι προσδιορισμού του NO

1.5. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται στην προσπάθεια να θεμελιωθεί μια μέθοδος για τη εν δυνάμει παρακολούθηση (βιο-ενώσεων) in vivo. Όμως τα βιολογικά υγρά in vivo είναι πολυσυστατικά και οι δραστικές ενώσεις σ' αυτά είναι μεταβατικές και ως εκ τούτου σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις.

Οι αναγκαίες απαιτήσεις για μια επιτυχημένη μέθοδο προς την κατεύθυνση αυτή θα πρέπει να περιλαμβάνει, κατά κύριο λόγο, τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Υψηλή ευαισθησία
- Καλή επαναληψιμότητα
- Απαλλαγμένη από παρεμποδίσεις
- Υψηλή εκλεκτικότητα
- Ευκολία σε αυτοματοποίηση
- Άνετη στον χειρισμό
- Χρήση μικρού όγκου δείγματος

Στο χώρο της Αναλυτικής Χημείας, είναι γενικά αποδεκτό ότι η τεχνική ανάλυσης με έγχυση σε ροή (FIA) είναι η πιο ενδεδειγμένη μέθοδος για παρακολούθηση συγκεντρώσεων αναλυόμενης λόγω της μεγάλης επαναληψιμότητας στην δειγματοληψία και της έγκαιρης ανίχνευσης. Από την άλλη πλευρά η ΧΦ-ανίχνευση είναι μια από τις πιο ευαίσθητες τεχνικές ανίχνευσης που όμως εμφανίζει το φαινόμενο της παρεμπόδισης από πολλές ενώσεις. Το πρόβλημα των παρεμπόδισεων δεν μπορεί να αντιμετωπισθεί εύκολα.

Στην εργασία αυτή, ένας μεμβρανικός δειγματολήπτης με δυνατότητες διήθησης μορίων αλλά και ενζυματικής αντίδρασης σχεδιάστηκε για να αποκλείσει την δίοδο στις παρεμποδίζουσες ενώσεις από τα βιολογικά υγρά με διήθηση αλλά και αντίδραση χωρίς να αποκλείει την διέλευση της αναλυόμενης που είτε υπάρχει στο βιολογικό υγρό σαν συστατικό του ή παράγεται από την ενζυματική αντίδραση. Η παραλαβή του NO από το αίμα με την χρήση δειγματοληπτικού στοιχείου με τέτοια μεμβράνη έδωσε καλά αποτελέσματα όταν η συσκευή σαν σύνολο χρησιμοποιήθηκε στην in vivo παρακολούθηση της μεταβολής του NO με πειραματόζωα σε πραγματικό χρόνο μετά από κατάλληλη αγωγή.

Η σχεδιασθείσα μέθοδος εκπληρεί όλες τις απαιτήσεις. Για παράδειγμα μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί με την χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστού και

1.6. ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Kricka L.J. Clin. Chem. 1991; 37/9: 1472-81
2. Kricka L.J. Anal. Biochem. 1988;175:14-21
3. Hellmer J., Arner P. and Lundin A.. Anal. Biochem. 1989; 177: 132-7
4. Wet J., Wood K.V., Helinski D. R. and Deluca M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985; 82: 7870-3
5. Hanna B. Methods Enzymol. 1986; 133: 22-7
6. Schaeffer J. Methods Enzymol. 1986; 133: 43-51
7. Nicolas J.C., Boussioux A.M. and Paulet A. C. Methods Enzymol. 1986; 133: 209-15
8. Schoelmerich J. and Deluca M. 1986; 133: 215-27
9. Williams T.M., Burlein J.E., Ogden S., Kricka L.J. and Kant J. A. Anal. Biochem. 1989; 176: 28-32
10. Wannlund J., Azari J., Levine L. and Deluca M. Biochem Biophys. Res. Commun. 1980; 96/1:440-6
11. Wood W. G., Braun J. and Hantke U. Methods Enzymol. 1986; 133: 354-65
12. Carrie M.L., Terouanne B., Brochu M., Nicolas J. and Paulet A.C. Anal. Biochem. 1986; 154: 126-31
13. Jablonski E. Anal. Biochem. 1985; 148: 199-206
14. Terouanne B., Carrie M., Nicolas J. and Paulet A.C. Anal. Biochem. 1986; 154: 118-25
15. Baldwin T.O., Holzman T.F and Holzman R.B. Methods Enzymol. 1986; 133: 248-64
16. Dyke K.V. and Dyke C.V. Methods Enzymol. 1986; 133: 493-507
17. Baetselier P.D. and Schram E. Methods Enzymol. 1986; 133: 507-30
18. Gerger R. and Miska W. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1987; 25:31-8
19. Ulitzur S. Methods. Enzymol. 1986; 133: 265-74
20. Prasher D., Mccann R.O. and Cormier M.J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985; 126/3: 1259-68
21. Lundin A. Methods Enzymol. 1978; 57: 56-65
22. Ugarova N.N., Brovko L.Y., Ivanova L.V., Shekhovtsova T.N. and Dolmanova I.F. Anal. Biochem. 1986; 158: 1-5

43. Winn-Deen E.S. and Iovannisci D.M. *Clin. Chem.* 1991; 37/9: 1522-3
44. Parker C.W. and Johnson M.C. *Biochem.* 1967; 6/11: 3417-27
45. Arnold Jr. L.J., Hammond P.W., Wiese W.A. and Nieson N. *Clin. Chem.* 1989; 35/8: 1588-94
46. Week I., Strgess M., Brown R.C. and Woodhead J. S. *Methods Enzymol.* 1986; 133: 366-87
47. Week I., Beheshti I., Mccapra F., Campbell A.K. and Woodhead J. S. *Clin. Chem.* 1983; 29/8: 1474-9
48. Nelson N.C., Cheikh A.B., Matsuda E. and Becker M. M. *Biochem.* 1996; 35: 8429-38
49. Anderson G.W., Zimmerman J.E. and Callahan F.M.. *J. Biol. Chem.* 1964; 86: 1839-42
50. Bronstein I., Voyta J.C., Thorpe G.H.G., Kricka L.J. and Armstrong G. *Clin. Chem.* 1989; 35/7: 1441-6
51. Schaap A.P., Akhavan H. and Romano L.J. *Clin. Chem.* 1989; 35/9: 1863-4
52. Beck S. *Methods Enzymol.* 1992; 216: 143-53
53. Hummelen J.C., Luider T.M. and Wynberg H. *Methods Enzymol.* 1986; 133: 531-57
54. Johannsson A., Ellis D. H., Bates D. L. et al. *J. Immunol. Methods.* 1986; 87: 7-11
55. Pollard-Knight D., Read C.A., Downes M.J. and Howard L.A. *Anal. Biochem.* 1990; 185: 84-9
56. Coyle P.M., Thorpe G.H.G., Kricka L.J. and Whitehead T.P. *Ann. Clin. Biochem.* 1986; 23: 42-6
57. Thorpe G.H.G. and Kricka L.J. *Methods Enzymol.* 1986; 133: 331-53
58. Totter J.R., Medina V.J. and Scoseria J.L. *J. Biol. Chem.* 1960; 235/1: 238-41
59. Baret A., fert V. and Aumaille J. *Anal. Biochem.* 1990; 187: 20-6
60. Barnard G., Bayer E.A., Milchek M., Amir-Zaltsman Y. and Kohen F. *Methods Enzymol.* 1986; 133: 284-9
61. Richterich P. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17:2181-6
62. Bayer E.A., Skutelsky E. and Wilchek M. *Methods Enzymol.* 1979; 62: 308-15
63. Coutlee F., Bobo L., Mayur K., Yolken R.H. and Viscidi R.P. *Anal. Biochem.* 1989; 181: 96-105

89. Sole S., Alegret S., Cespedes F. and Pabregas E. *Anal. Chem.* 1998; 70: 1462-7
90. Gosling J.P. *Clin. Chem.* 1990; 36/8: 1408-27
91. Vary C.P.H., McMahon F.J., Barbone F.P. and Diamond S. *Clin. Chem.* 1986; 32/9: 1696-701
92. Thorpe G.H.G., Kricka L.J., Gillespie E. et al. *Anal. Biochem.* 1985; 145: 96-100
93. Nickerson D.A., Kaiser R., Lappin S., Stewart J. and Hood L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 8923-7
94. Landegren U., kaiser R., Sanders J. and Hood L. *Science.* 1988; 201: 1077-80
95. Martinelli R.A., Arruda J.C. and Dwivedi P. *Clin. Chem.* 1996;42/1: 14-8
96. Kenten J.H., casadei J., Link J. et al. *Clin. Chem.* 1991; 37/9: 1626-32
97. Motmans K., Raus J. and Vandevyver C. *J. Immunol. Methods.* 1996; 190: 107-16
98. O'Connell C.D. and Zweier J.L. *Clin. Chem.* 1998; 44/6: 1161-9
99. Wachter L., Jablonski J. and Rammachandran K.L. *Nucleic Acids Res.* 1986;14/20: 7985-94
100. Vellom D. and Kricka L.J. *Methods. Enzymol.* 1986; 133: 229-37
101. Wienhausen G., Deluca M. *Methods Enzymol.* 1986; 133: 198-208
102. Thompson R.Q., Crouch S.K. *Anal. Chim. Acta.* 1982; 144: 155-63
103. Sundaram P.V., Blumenburg B. and Hinsch W. *Clin. Chem.* 1979; 25/8: 1436-9
104. Roda A., Girotti S and Carrea G. *Methods Enzymol.* 1986; 133: 239-48
105. Thompson R.Q., Crouch S.R. *Anal. Chim. Acta.* 1984; 159: 337-42
106. Jablonski E., Deluca M. *Methods Enzymol.* 1978; 57: 202-14
107. Prodromidis M.I., Stalikas C.D., Tzouwara-Karayanni S.M. and Karayannis M.I. *Talanta.* 1996; 43: 27-33
108. Masoom M., Townshend A. *Anal. Chim. Acta.* 1985; 171: 185-94
109. Masoom M., Townshend A. *Anal. Chim. Acta.* 1984; 166: 111-8
110. Gnanasekaran R., Mottola H.A. *Anal. Chem.* 1985; 57: 1005-9
111. Gosnell M.C., Snelling R.E and Mottola H.A. *Anal. Chem.* 1986; 58: 1585-7
112. Weetall H.H., Filbert A.M. *Methods Enzymol.* ~:59-72
113. Prodromidis M.I., Tzouwara-Karayanni S.M., Karayannis M.I. et al. *Analyst.* 1996; 121: 435-9

137. Knowles R.G., Palacios M., Palmer R.M. and Moncada S. *Proc. Natl. Acad. sci. USA.* 1989; 86: 5159-62
138. Ohshima H., Oguchi S., Adachi H., Iida S. Suzuki H., Sugimura T. and Esumi H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 183/1: 238-44
139. Kwon N.S., Nathan C.F. and Stuehr D.J. *J. Biol. Chem.* 1989; 264/34: 20496-501
140. Kincaid R.L., Vaughan M., Osborne J.C. and Tkachuk V.A. *J. Biol. Chem.* 1982; 257/18: 10638-43
141. Brecht D.S., Snyder S.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 682-5
142. Hallinan E.A., Tsymbalov S. and Finnegan P.M. et al. *J. Med. Chem.* 1998; 41/6: 775-7
143. Zhang H. Q., Fast W., Marletta M.A., Martasek P. and Silverman R. B. *J. Med. Chem.* 1997; 40: 3869-70
144. Webber R.K., Metz S., Moore W.M. et al. *J. Med. Chem.* 1998; 41: 96-101
145. Shearer B.G., Lee S., oplinger J.A., Frick L.W., Garwey E. P. and Furfine E.S. *J. Med. Chem.* 1997; 40: 1901-5
146. Silverman R.B., Huang H., Marletta M.A. and Martsasek P. *J. Med. Chem.* 1997; 40: 2813-7
147. Kosaka H., Watanabe M., Yoshihara H., Harada N. and Shiga T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 184/2: 1119-24
148. Pellat C., Henry Y. and Drapier J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 166/1: 119-25
149. Green L.C., Wagner D. A. and Glogowski J. *Anal. Biochem.* 1982; 126: 131-8
150. Pai T.G., Payne W.J. and Legall J. *Anal. Biochem.* 1987; 166: 150-7
151. Mordvintcev P., Mulsch A., Busse R. and Vanin A. *Anal. Biochem.* 1991; 199: 142-6
152. Maliski T., Taha Z. *Nature.* 1992; 358: 676-8
153. Kikuchi K., et al. *Anal. Chem.* 1993; 65: 1794-9
154. Maskus M., Pariente F., Wu Q., Toffanin A., Shapleigh J.P. and Abruna H.D. *Anal. Chem.* 1996; 68: 3128-34
155. Zhou X., Arnold M.A. *Anal. Chem.* 1996; 68: 1748-54
156. Kelm M., Dahmann R., Wink D. and Feelisch M. *J. Biol. Chem.* 1997; 272/15: 9922-32

178. Bettache N., Carter T., Corrie J.E., Ogden D. and Trentham D. R. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 266-81
179. Keefer L.K., Nims R.W., Davies K.M. and Wink D.A. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 281-93
180. Williams D.L.H., et al. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 299-310
181. Liu Q. and Gross S.S. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 311-24
182. Stuehr D.J. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 324-34
183. Kiatt P., Schmidt K., Werner E.R. and Mayer B. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 358-65
184. Fukuto J.M. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 365-75
185. Griffith O.W. and Kilbourn R.G. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 375-93
186. Moore P.K., Bland-Ward P.A. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 393-8
187. Corbett J.A. and Mcdaniel M.L. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 398-408
188. Wu C.C., and Thiemermann C. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 408-40
189. Xia H. and Bredt D. S. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 427-36
190. Robinson L.J., Ghanouni P. and Michel T. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 436-49
191. Charles I.G., Scorer C.A., Moro M. A. et al. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 449-60
192. Torres J., and Wilson M.T. *Methods Enzymol.* 1996; 269:3-15
193. Salvemini D. and Masferrer J.L. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 12-26
194. Drapier J.C. and Hibbs J.B. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 26-37
195. Carreras M., Poderoso J.J., Cadenas E. and Boveris A. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 65-75
196. Evans C.H., Watkins S.C. and Steranovic-Racic M. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 75-88
197. Radomski M. W., Zakar T. and Salas E. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 88-107
198. Ku D.D. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 107-19
199. Brenman J.E. and Bredt D.S. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 119-29
200. Hobbs A.J. and Ignarro L J. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 134-49
201. Lincoln T.M., Cornwell T., Komalavilas P. and Boerth N. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 149-66
202. Ross M.E. and Iadecola C. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 408-26

2. ΣΧΕΔΙΑΣΗ-ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ-ΤΕΧΝΙΚΕΣ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ταξινομούνται ως ακολούθως:

2.1.1. Αντιδραστήρια Χημειοφωταγών (ΧΦ) Αντιδράσεων

Λουμινόλη: Λουμινόλη από την εταιρεία Sigma στην καθαρότερη μορφή της. Το Υπεροξείδιο του υδρογόνου, H_2O_2 (30% w/v), της εταιρείας Merck καθώς και το σιδηρικυανιούχο κάλιο, $K_3Fe(CN)_6$, της ίδιας εταιρείας χρησιμοποιήθηκαν σαν οξειδωτικά σε αλκαλικό περιβάλλον, ενώ η π-ιωδοφαινόλη της εταιρείας Aldrich χρησιμοποιήθηκε για ενίσχυση της ΧΦ-εκπομπής

Πυρογαλλόλη: Πυρογαλλόλη της εταιρεία Fluka χρησιμοποιήθηκε σε ειδικές περιπτώσεις. Τα οξειδωτικά Fe(III), με την μορφή του άλατος $FeCl_3$ (Merck), ιώδιο, I_2 (Merck), και υπερϊωδικά με την μορφή KIO_4 (Sigma) ενώ η υδροχλωρική υδροξυλαμίνη, $NH_2OH.HCl$ (Merck) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση της ΧΦ-εκπομπής

Εστέρων Ακριδίνης: Λουσιγενίνη της εταιρείας Sigma χρησιμοποιήθηκε για την σήμανση DNA, και πρωτεϊνών καθώς επίσης και για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας αντιοξειδωτικών. Το Υπεροξείδιο του υδρογόνου, H_2O_2 (30% w/v), της εταιρείας Merck χρησιμοποιήθηκε σαν οξειδωτικό σε αλκαλικό περιβάλλον.

Εστέρων του οξαλικού οξέος: Ο 2,4,6-τριγλωροφαίνυλο οξαλικός εστέρας, TCPO, της εταιρείας Sigma χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του H_2O_2 που παράγεται από ενζυμικές αντιδράσεις. Το Υπεροξείδιο του υδρογόνου, H_2O_2 (30% w/v), της εταιρείας Merck καθώς και τα Ρουβρένιο και Περιλένιο της εταιρείας Aldrich για την ενίσχυση της ΧΦ-εκπομπής

2.1.2. Βιοχημικά αντιδραστήρια

Ενζυμα και πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες φάσεις της παρούσας διατριβής και έχουν αγοραστεί από την εταιρεία της Sigma εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά ως ακολούθως:

Το ένζυμο NO-συνθάση, NOS, χρησιμοποιήθηκε για την εργαστηριακή ενζυμική παρασκευή του NO με μετατροπή της L-Αργινίνης.

Τα ένζυμα κάροτο-περοξειδάση, HRP, καταλάση, CAT, καθώς και η πρωτεΐνη αιμογλοβίνη, Hb, χρησιμοποιήθηκαν για την παγίδευση του παραγόμενου NO κατά την παρασκευή του στο εργαστήριο από ανόργανες ενώσεις. Το ένζυμο HRP

Αυτό το ρυθμιστικό χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση του βέλτιστου pH για ΧΦ-εκπομπή σε κάθε ΧΦ-αντίδραση.

Τα βιολογικά ρυθμιστικά διαλύματα, HEPES (N-[2-υδρόξυαιθύλο] - πιπεραζίνη-N'-[2- αίθανοσουλφονικό οξύ] και γλυκίνης αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma για ειδικές περιπτώσεις όπως για παράδειγμα το HEPES προσετέθη για ρύθμιση του pH των διαλυμάτων των πορφυρινικών παγιδευτών του NO διότι βρέθηκε ότι δεν μειώνει το χρόνο ζωής του NO ενώ σε άλλες περιπτώσεις όπως την δειγματοληψία από βιολογικά υγρά in vivo δεν διαχέονταν μέσω της μεμβράνης διαπίδυσης στο οργανισμό του πειραματόζωου λόγω του σχετικά υψηλότερου μοριακού του βάρους. Η γλυκίνη χρησιμοποιήθηκε σαν ρυθμιστικό για την ρύθμιση του pH του διαλύματος οξέος για την μετουσίωση των πορφυρινικών ενζύμων και πρωτεϊνών.

Το αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, PBS της εταιρείας Sigma , χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα για την παρασκευή ρυθμισμένου pH διαλυμάτων ΧΦ-αντιδραστήριου λόγω της σταθερότητός του και της χημικής του αδράνειας.

Το τρις-(υδρόξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο, Tris, αγοράστηκε από την εταιρεία Pharmacia Biotech, και χρησιμοποιήθηκε κύρια στην παρασκευή του διαλύματος της λουμινόλης επειδή έδειξε την βέλτιστη ΧΦ-εκπομπή.

Τα συμπλεκτικά αντιδραστήρια αιθυλενοδιάμινοτετραοξικό οξύ, EDTA, και αιθυλενογλυκολο-δισ (β-αμινοαιθυλαιθέρα) N,N,N',N'-τετραοξικό οξύ, EGTA, αγοράστηκαν από την εταιρεία Fluka και χρησιμοποιήθηκαν για την συμπλοκοποίηση ιόντων βαρέων μετάλλων που περιέχονται σε ίχνη στα διαλύματα και παρεμποδίζουν την δράση των ενζύμων.

2.1.4. Χημικά Αντιδραστήρια:

Διάφορα ανόργανα και οργανικά αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν για διάφορους λόγους ως ακολούθως:

Για παρασκευή ενώσεων: Τα ανόργανα αντίδραστήρια νιτρώδες νάτριο, ιωδιούχο κάλιο, μεταλλικός υδράργυρος, π.θειικό οξύ, μοριακό ιώδιο, υδροξείδιο του καλίου και νιτρικό κάλιο αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck και χρησιμοποιήθηκαν για την εργαστηριακή παρασκευή NO και τον καθαρισμό αυτού από τα παραπροϊόντα του.

Τα οργανικά αντιδραστήρια L-αργινίνη, ακέτυλοχολίνη και χολίνη αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma και το μέν πρώτο χρησιμοποιήθηκε για την εργαστηριακή ενζυματική παρασκευή του NO ενώ τα υπόλοιπα για την ενζυματική παρασκευή του υπεροξειδίου του υδρογόνου

Το Ακρυλαμίδιο, το Διμεθύλενο-ακρυλαμίδιο, το υπερθειικό κάλιο ($K_2S_2O_8$), και η N,N,N',N'- τετραμεθυλενοδιαμίνη, (TEMED) αγοράστηκαν από την εταιρεία Pharmacia Biotech και χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή πολυακρυλαμίδικης πηκτής.

Ουρία, φορμαλδεύδη και υπεριοδικό νάτριο αγοράστηκαν από την εταιρεία Fluka και χρησιμοποιήθηκαν για ενεργοποίηση την μεμβράνης στήριξης και την διάνομιξη της διαμέτρου των πόρων καθώς και την προσθήκη νέων δραστικών ομάδων.

Nafion (5% σε αλειφατικές αλκοόλες) αγοράστηκε από την εταιρεία Aldrich και χρησιμοποιήθηκε για τον αποκλεισμό των νιτρωδών.

Πολυουρεθάνη (PU) 88% κατά βάρος αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma και χρησιμοποιήθηκε προστατευτική στρώση στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης.

2.1.6. Υλικά ακινητοποίησης ενζύμων

Διάλυμα 50% γλουταραλδεύδης (GA) αγοράστηκε από την Aldrich. 1-αίθυλο-3-(3-διμεθυλάμινοπρόπυλο)καρβοδιμίδιο αγοράστηκε από την Sigma, το γ-αμινοπρόπυλοαιθόξυσιλάνιο και το ελεγχόμενου πόρων γυαλί αγοράστηκαν από την Sigma και χρησιμοποιήθηκαν σαν στηρικτικό υλικό για την ακινητοποίηση ενζύμων.

2.1.7. Αέρια

Τα υψηλής καθαρότητας αέρια He, Ar, N₂, NO αγοράστηκαν από την Air Liquide Ltd, Γαλλίας

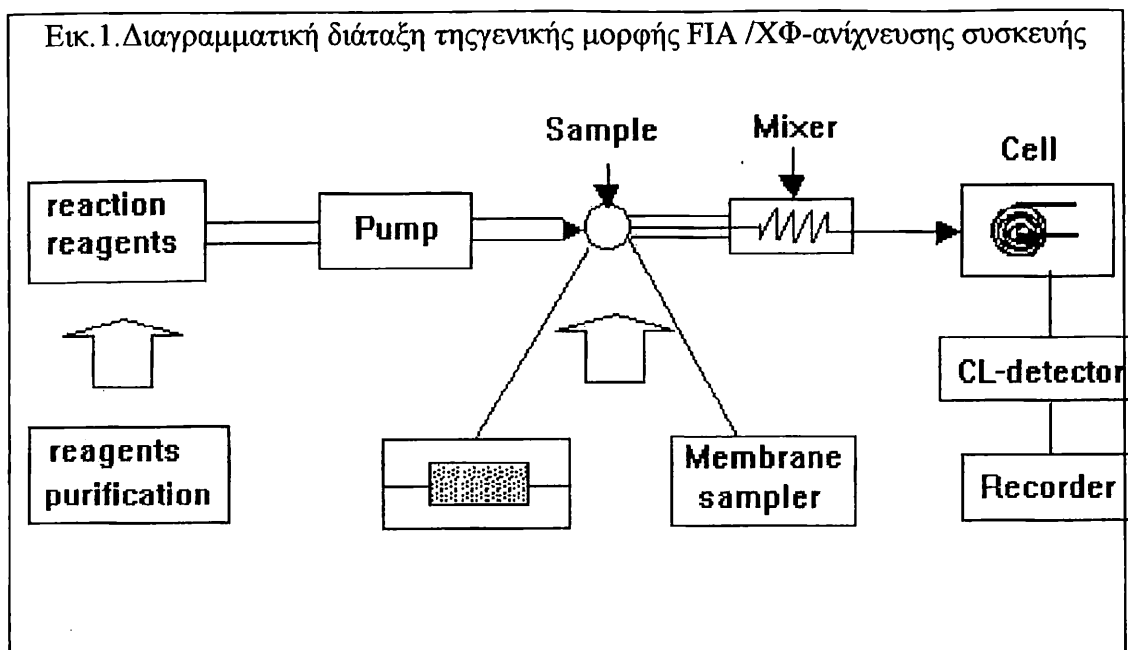
2.1.8. Διαλύτες

Οι οργανικοί διαλύτες ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, διμέθυλο-φορμαμίδιο (DMF), και τετράυδροφουράνιο (THF), αγοράστηκαν από την Sigma και χρησιμοποιήθηκαν σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με την τεχνική της Υψηλής απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας (HPLC). Διπλά απεσταγμένο νερό χρησιμοποιήθηκε σ' όλες τις πειραματικές εργασίες της διατριβής αυτής.

2.1.9. Πειραματόζωα

Αρουραίοι ράτσας Wistar (αρσενικά, 250-300 γρ.) και λευκά κουνέλια (αρσενικά 2,0 - 2,5 χλγρ.) χρησιμοποιήθηκαν για την παρακολούθηση του NO in vivo και για την παρασκευή του εκχυλίσματος του νευρικού ιστού. Όλα τα πειραματόζωα έλαβαν κανονική τροφή και νερό πριν από τα πειράματα εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Όλες οι διεργασίες μεταχείρισης των πειραματοζώων ήταν σύμφωνες με τις αρχές που έχουν οριστεί από την Ένωση Φυσιολόγων της Ελλάδας και την Επιτροπή Ηθικού Κώδικα των Ζώων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Εικ. 1. Διαγραμματική διάταξη της γενικής μορφής FIA / ΧΦ-ανίχνευσης συσκευής

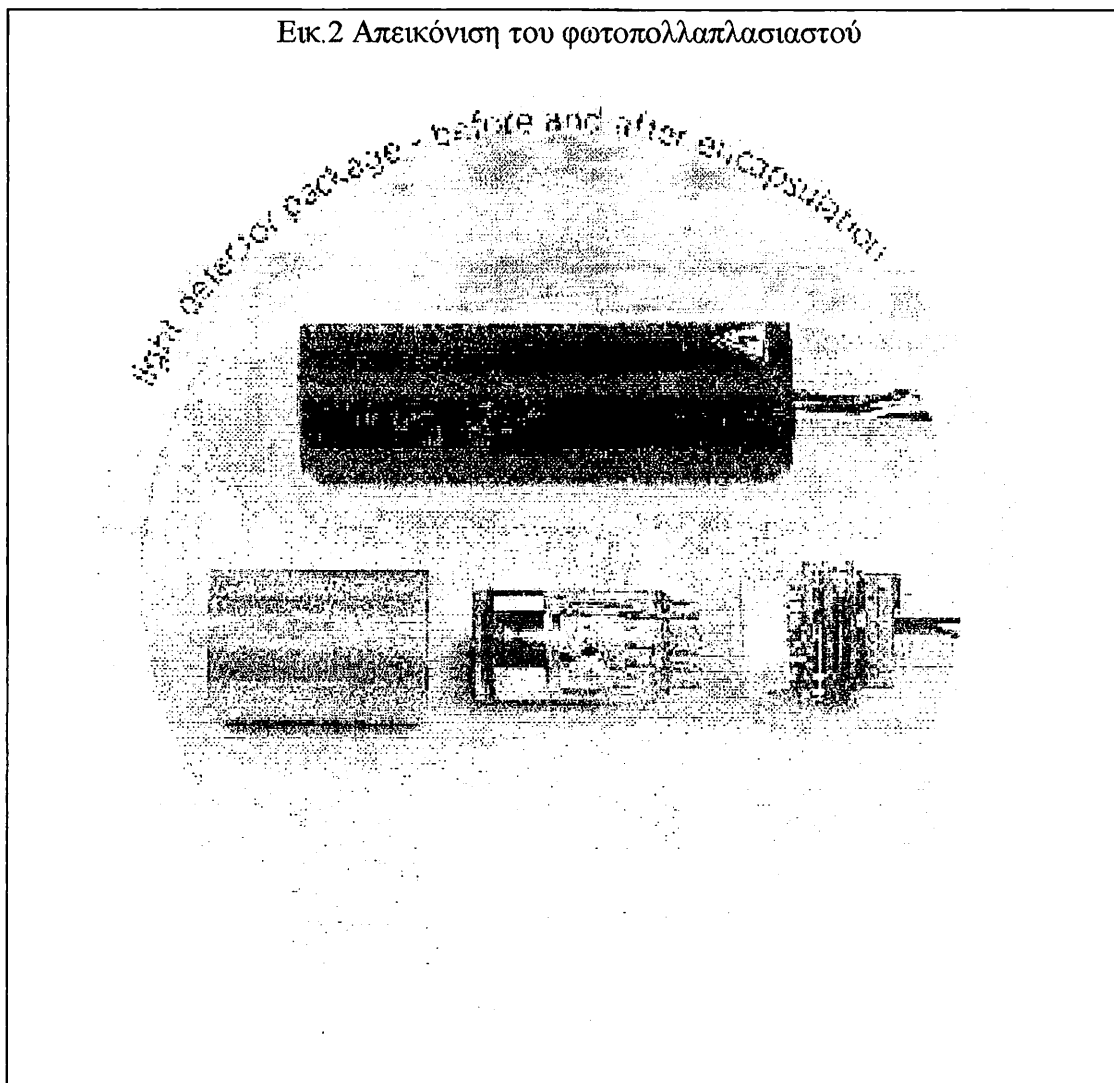


Στην Εικόνα 1 τα αντιδραστήρια της ΧΦ-αντίδρασης προωθούνται από την αντλία με σταθερή ταχύτητα ροής. Απαέρωση των διαλυμάτων επιτυγχάνεται με διοχέτευση λεπτών φυσαλίδων αδρανούς αερίου π.χ. στην ανίχνευση του NO όλα τα διαλύματα πρέπει να είναι ελεύθερα ιχών οξυγόνου και γιατί απαερώνονται με την διαβίβαση αερίου Αργού.

Το δείγμα μπορεί να διοχετεύεται στην ροή με διάφορους τρόπους ως ακολούθως:

- Δια μέσου του βρόγχου της εξάπορτης βαλβίδος σε όγκους που καθορίζει ο όγκος του βρόγχου
- Το σύστημα μπορεί να εφοδιασθεί με αντιδραστήρα (καταλύτη ή ενζύμου) και η αναλύομενη να παραχθεί στην ροή με μια καταλυτική αντίδραση π.χ. το NO μπορεί να παραχθεί μέσω την ενζυματικής μετατροπής της L-αργινίνης με ακινητοποιημένο ένζυμο NO-συνθάση σε ελεγχόμενης διαμέτρου πόρων σφαιριδίων γυαλιού (CPG).
- Για πολυσυστατικά δείγματα που περιέχουν ενώσεις / συστατικά που δημιουργούν παρεμπόδιση στην ΧΦ-αντίδραση, το δειγματοληπτικό σύστημα εφοδιάζεται με μεμβράνη που διηθεί ή μεταβάλλει τις χημικές ιδιότητες των παρεμποδιστών ενώ επιτρέπει την ελεύθερη διάχυση της αναλυομένης, π.χ. το NO από τα βιολογικά υγρά δειγματοληπτείται εκλεκτικά ενώ το υπεροξείδιο του υδρογόνου που παράγεται από την ενζυματική αντίδραση της ακετυλοχολίνης παρουσία συνακτινητοποιημένων ενζύμων (AChE, ChOD) δειγματοληπτείται εκλεκτικά και μεταφέρεται στο σύστημα της ΧΦ-αντίδρασης.

Εικ.2 Απεικόνιση του φωτοπολλαπλασιαστού



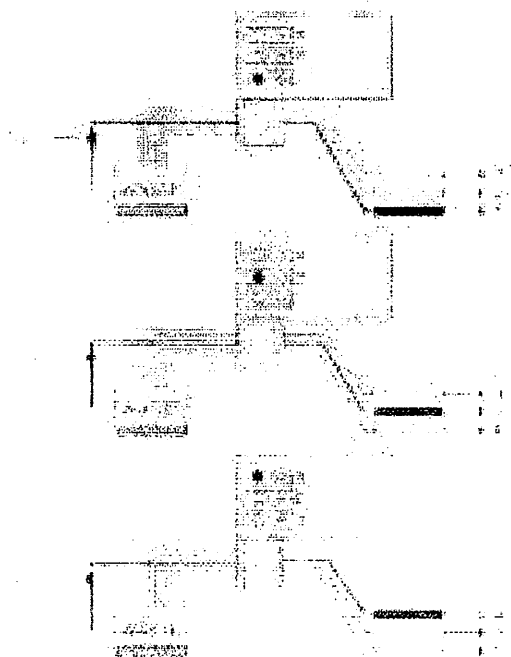
2.2.2. Συσκευή μικροδιαπίδυσης για την δειγματοληψία και μεταφορά του δείγματος σε ανιχνευτή χημειοφωταύγειας

Η συσκευή μικροδιαπίδυσης σαν τεχνική δειγματοληψίας βιολογικών υγρών σε προσδιορισμούς in vivo διευκολύνει την διερεύνηση των βιοχημικών φαινομένων στα εξωκυτταρικά υγρά των ιστών, οργάνων και κάθε άλλου βιολογικού υγρού. Η εξέλιξη της τεχνικής από την μορφή της εμφύτευσης σάκκου μέσω της εμβολικής διαπίδυσης και τελικά της συνεχούς ροής δειγματοληψίας έγινε στο μεγαλύτερο μέρος από τους νευρολόγους ερευνητές [1].

Η δειγματοληψία με την τεχνική της μικροδιαπίδυσης γίνεται με εμφυτευμένο ανιχνευτικό στοιχείο που συνίσταται από κοίλη τριχοειδή μεμβράνη διαπίδυσης στο όργανο ή στο βιολογικό υγρό που θα αναλυθεί. Η κοντή άκρη του τριχειδούς σωλήνα διαπίδυσης συνδέεται με μικρής διαμέτρου σωληνίσκο που χρησιμοποιείται για την

και ο επιλογέας σύριγγας λύνει το πρόβλημα αυτό. Περισσότερες λεπτομερείες σχετικά με το πρόβλημα αυτό παρέχονται στην Εικ.4.

Εικ.4. Διακόπτης παροχής υγρού και επιλογέας σύριγγας για αυτόματη διακοπή



2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ

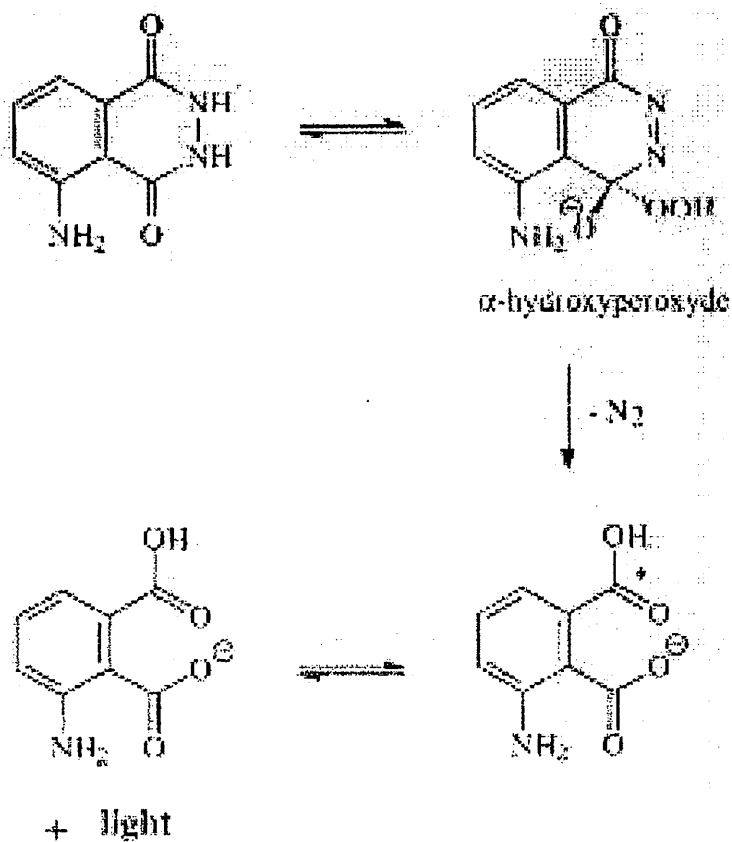
2.3.1. Μέθοδοι ΧΦ-αντίδρασης

Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν κατά κύριο λόγο οι κάτωθι ΧΦ-αντιδράσεις:

- ΧΦ-αντίδραση Λουμινόλης
- ΧΦ-αντίδραση Ακριδινεστέρων και παραγώγων
- ΧΦ-αντίδραση Περοξοξαλικών εστέρων

2.3.1.1. ΧΦ-αντίδραση λουμινόλης και παραγώγων: Η λουμινόλη παράγει χημειοφωταύγεια με πολλά οξειδωτικά μόρια, συμπεριλαμβανομένων των οξυγόνου, υποχλωριώδους, ιωδίου, υπερμαγγανικών κ.λ.π. (Εικ.5) Σε απροτικούς διαλύτες (διμέθυλοσουλφοξείδιο ή διμέθυλοφορμαμίδιο) απαιτείται μόνο το οξυγόνο με μια ισχυρή βάση για την ΧΦ-εκπομπή. Στους αμφιπρωτικούς διαλύτες (νερό, υδατικά μίγματα διαλυτών, ή μικρού μοριακού βάρους αλκοόλες) οι διάφορες σωματιδιακές μορφές του οξυγόνου (μοριακό οξυγόνο, περοξειδία, υπερυπεροξειδικόν ανιόν)

Εικ.5. Απλοποιημένος μηχανισμός αντίδρασης της λουμινόλης: το ενδιάμεσο κλειδί είναι υδροξυπεροξείδιο που επιτυγχάνεται από την οξείδωση του ετεροκυκλικού δακτυλίου. Η διάσπασή του οδηγεί στο αμινοφθαλικό ιόν με εκπομπή φωτός



Μια άλλη τεχνική που έχει προταθεί για διαγνωστικούς σκοπούς είναι η αντλούμενη με ακτινοβολία χημειοφωταύγεια. Κατά την τεχνική αυτή μια ακτίνα παλμικής laser-ακτινοβολίας διεγείρει ένα μόριο βαφής που απορροφά την κόκκινη περιοχή μηκών κύματος. Η λουμινόλη μπορεί να οξειδωθεί από το μόριο της διεγερμένης βαφής με ή χωρίς την συμμετοχή του οξυγόνου.

ηλεκτρονιοδέκτες οδηγεί σε απώλεια ΧΦ-εκπομπής. Η σύζευξη της διαζολουμινόλης είναι επίσης μη ευνοϊκή καθώς επίσης και αλκυλώση της αμινομάδος της λουμινόλης μειώνει δραστικά την απόδοση της ΧΦ-εκπομπής ($\Phi_{\text{X}\Phi}=0,1\%$). Αντίθετα, η ίδια υποκατάσταση στην ισολουμινόλη είναι τόσο ευνοϊκή ώστε η επιτυγχανόμενη απόδοση αυξάνει πάνω απ' αυτήν της φυσικής λουμινόλης. Περαιτέρω διερευνήθηκαν μόρια με διαφορετικά μήκη αλυσίδων και παράπλευρων διακλαδώσεων.

Αντικατάσταση του φαινολικού δακτυλίου από δακτύλιο ναφθαλίνιου ή βενζοπερυλενίου οδηγεί σε ενδιαφέρουσες σειρές μορίων. Το αμινοβουτυλοαιθυλοναφθαλικό υδραζίδιο (ABENH) είναι περίπου 4-φορές πιο χημιοφωταυγές από το αντίστοιχο της ισολουμινόλης και εκπέμπει σε μακρύτερα μήκη κύματος (515 nm αντί 420 nm) που μπορεί να εμποδίσει την απόσβεση ή παρεμπόδιση από άλλα φθορισμοφόρα, αλλά οξειδώνεται εύκολα από το οξυγόνο του αέρα στην επιφάνεια του διαλύματος. Τα βενζοπερυλενικά παράγωγα είναι 2-φορές πιο αποδοτικά από τα προηγούμενα με κβαντική απόδοση στην εκπληκτική τιμή $\Phi_{\text{X}\Phi}=50\%$.

Η λουμινόλη, η ισολουμινόλη και οι ανάλογες ενώσεις των εφαρμόστηκαν σε πολλά πεδία εφαρμογών συμπεριλαμβανομένου και των τεχνικών διάγνωσης και παρακολούθησης με ανοσοπροσδιορισμούς και μή-ανοσοπροδιορισμούς καθώς επίσης και τους βιοαισθητήρες. Τα παράγωγα της λουμινόλης σπανίως εφαρμόζονται σε εφαρμογές βιοαισθητήρων, καθότι εμφανίζουν χαμηλή ΧΦ-εκπομπή στην αντίδραση οξείδωσης.

2.3.2. ΧΦ-αντίδραση εστέρων ακριδίνης και παραγώγων (Εικ.7): Η Λουσιγενίνη είναι το πιο γνωστό παράδειγμα της τάξης αυτών των ΧΦ-ενώσεων. Στις ΧΦ-αντιδράσεις αυτών των ενώσεων δεν παρατηρείται το φαινόμενο της καταλυτικής δράσης. Μόνο το υπεροξειδίο του υδρογόνου και μια ισχυρή βάση είναι απαραίτητη για την ΧΦ-αντίδραση των παραγώγων της ακριδίνης. Τα παράγωγα της ακριδίνης βρίσκονται σε ισορροπία με την μη-ΧΦ-ψευδοβάση που σχηματίζεται από την υποκατάσταση της υδροξυλομάδας στην 9-θέση στον ετεροκυκλικό δακτύλιο. Η ισορροπία αυτή μετατίθεται προς την πλευρά της ψευδοβάσης σε αλκαλικό μέσο. Τα κινητικά δεδομένα, ήτοι ο χρόνος ημιζωής του ΧΦ-αντιδραστήριου στην μετατροπή προς ψευδοβάση σε διάφορα pH δίνονται από τον Littig ως εξής: pH 9, $t_{1/2}$ 26 s, pH 11, $t_{1/2}$ 8 s, pH 13, $t_{1/2}$ 1 s. Αυτή η γρήγορη μετατροπή των ακριδινεστέρων προς ψευδοβάσεις δημιουργεί την ανάγκη της ελαχιστοποίησης του χρόνου ανάμιξης των αντιδραστηρίων προ της παρατήρησης της ΧΦ-εκπομπής. Για το λόγο αυτό, είναι

Κατά την ΧΦ-αντίδραση τα εκπέμποντα σωματίδια ελευθερώνονται από το μόριο και γιαυτό τα χαρακτηριστικά της ΧΦ-εκπομπής είναι σχετικά ανεξάρτητα από το συζυγές μικροπεριβάλλον. Ακόμη, η υψηλή κβαντική απόδοση και το χαμηλό υπόβαθρο-σήμα επιτρέπουν ανίχνευση υψηλής ευαισθησίας. Αυτοί οι λόγοι σε συνδυασμό με την εύκολη σύζευξη ακριδινεστέρων ή ιμιδίων με πρωτείνες εξηγούν γιατί τα ΧΦ-ακρίδινο-παράγωγα προτάθηκαν εξ' αρχής για τον υπερευαίσθητο ανοσοπροσδιορισμό της ορμόνης που ευαισθητοποιεί τον θυροειδή αδένα (TSH), των μορίων επισήμανσης των όγκων (σίδηρο πρωτεΐνη), των ανοσογλοβουλινών και συγγενών ενώσεων. Την τελευταία δεκαετία μερικοί ανταγωνιστικοί και πολλοί μη-ανταγωνιστικοί ανοσοπροσδιορισμοί επέτρεψαν τον προσδιορισμό διαφόρων αναλυόμενων σε επίπεδο μικρότερο του picoM.

Οι ενώσεις της ακριδίνης αποδίδουν καλύτερα σαν σημαντές των κλώνων DNA και παράγουν ΧΦ- DNA ανιχνευτικά στοιχεία. Πράγματι, μετά την εισδοχή των στη έλικα του DNA, τα μόρια της ακριδίνης δείχνουν αυξημένη σταθερότητα έναντι της υδρόλυσης και γίνονται ανενεργά έναντι των πυρηνόφιλων θειολών και θειωδών. Διάφοροι εκλεκτικοί προσδιορισμοί βασίζονται στις ιδιότητες αυτές που επίσης χρησιμοποιήθηκαν για τον ακριβή προσδιορισμό των σταθερών ταχύτητας υβριδισμού και της θερμοδυναμικής ενέργειας δεσμού των ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτικών στοιχείων με απλούς συνθετικούς στόχους καθώς και πολύπλοκους βιολογικούς. Προσδιορισμοί πολλών αναλυόμενων που βασίζονται στην κινητική αποσύνθεσης πολλών ακριδινιο-παραγώγων έχουν γίνει με την χρήση DNA-ανιχνευτικών στοιχείων αν και οι μέθοδοι αυτοί θα μπορούσαν να εφαρμοσθούν και σε αναλύσεις με βάση το μαρκάρισμα αντισωμάτων.

Στην σειρά των ακριδινικών ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε μόνο η λουσιγενίνη για μη-ανοσοπροσδιορισμούς και ειδικότερα για την ειδική ποσοτικοποίηση της απόκρισης του κυτταρικού υπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$) μετά από οξειδωτική έκσταση. Αν και τα ΧΦ-ισομερή της ακριδίνης και των συγγενών ετεροκυκλικών ενώσεων (φαινανθρίνο και ισοκινολέινο) έχουν μελετηθεί προ δεκαετίας δεν χρησιμοποιήθηκαν στην ιατρική ανάλυση ακόμη.

2.3.3. ΧΦ-αντίδραση περόξυ-οξαλικών και παραγώγων (Εικ.8): Πολλά οξαλικά παράγωγα οξειδώνονται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου με παραγωγή διεγερμένων ενδιάμεσων υψηλής ενέργειας. Ένα αέριο ενδιάμεσο απομονώθηκε από το μίγμα αντίδρασης των οξαλκών με υπεροξείδιο του υδρογόνου και στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για να παράγει ΧΦ-εκπομπή παρουσία ενός φθορισμο-δεκτικού

ότι οι κυκλοδεξτρίνες διατηρούν μια κάποια απόδοση σε υδατικά διαλύματα δια μέσου της στέγασης των αντιδραστηρίων σε μικροπεριβάλλον χαμηλής πολικότητας. Συνήθως απρατηρείται υψηλό υπόβαθρο στην ΧΦ-αντίδραση των περόξυ-οξαλικών. Ο σχηματισμός και η διάσπαση των ΧΦ-ενδιαμέσων φαίνεται να ευθύνεται για το ΧΦ-υπόβαθρον. Η εκπομπή αυτή διακρίνεται κινητικά από την ΧΦ-εκπομπή που επάγεται από τον φθοριστή, και μειώνεται σε υψηλούς λόγους συγκεντρώσεων υπεροξειδίου του υδρογόνου έναντι των οξαλικών. Για την μείωση της υπόβαθρης εκπομπής προτάθηκε επίσης η συνεχής προσθήκη αντιδραστηρίου.

Τα παράγωγα των οξαλικών δεν είναι σταθερά στο νερό ή σε υγρανθέντες διαλύτες. Μετά από μερική υδρόλυση, τα παραγόμενα μονουποκαταστετημένα παράγωγα αποσυντίθενται περαιτέρω με απώλεια δειοξειδίου του άνθρακα και μονοξειδίου του άνθρακα. Αυτή η αστάθεια περιορίζει έντονα τις εφαρμογές τους στο διαγνωστικό πεδίο της ιατρικής. Ένας άλλος λόγος είναι η μικρή διαλυτότης και των δύο συμμετεχόντων ενώσεων της ΧΦ-αντίδρασης στο νερό που την κάνει και ακατάλληλο για την σύζευξη με πρωτεΐνες.

Η ΧΦ-περοξυοξαλικών χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται από ενζυματικές δράσεις όπως της ουρικάσης, της χολινοξειδάσης, της χοληστερολοξειδάσης, της ξάνθινοξειδάσης, και της γλυκοζοξειδάσης. Ο προσδιορισμός του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε βιολογικά υγρά ή ομογενήματα είναι ένα άλλο πεδίο εφαρμογής της αντίδρασης αυτής. Φάρμακα χαμηλού μοριακού βάρους, ορμόνες, ολιγονουκλεοτίδια, και χημικά έχουν αναλυθεί ποσοτικά μετά από εκχύλιση ή χρωματογραφική έκλουση με την χρήση της ΧΦ-εκπομπής των περιοξαλικών. Μια μέθοδος παραγωγοποίησης ενός σταδίου απαιτείται εξαρτωμένου εκ του εάν η ένωση είναι φθορίζουσα ή όχι. Προσδιορισμοί πολλών αναλυόμενων έχουν προταθεί μέχρι σήμερα, αν και πολλές φθορίζουσες ενώσεις είναι γνωστό πως εκπέμπουν σε μεγάλη περιοχή μηκών κύματος.

2.4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΉ ΠΡΟΤΥΠΩΝ - NO

Για την επίτευξη πρότυπου NO-αερίου δείγματος απαιτείται πολύ καλός καθαρισμός ώστε οι καμπύλες αναφοράς που θα χαραχθούν να αντιπροσωπεύουν πραγματικές ποσότητες και όχι αναλογικές σχέσεις. Ο καθαρισμός δε αυτός πρέπει να γίνεται στην διαδικασία της χρήσης του διότι το NO-αέριο οξειδώνεται εύκολα από το οξυγόνο του ατμοσφαιρικού αέρα και έχει μικρό χρόνο ημιζωής. Για την παρασκευή καθαρού NO χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι μέθοδοι:

αντίδραση. Η σύνθετη μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε για την αποφυγή παρεμποδίσεων από τέτοιες ενώσεις.

Γενικά, η σύνθετη μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε συνίσταται από τα ακόλουθα στρώματα:

- Στρώμα στήριξης ή προστασίας: Αυτό το στρώμα είναι πορώδες με σχετικά μεγάλης διαμέτρου πόρους, με μηχανική αντοχή και καλή ευλιγισία
- Στρώμα διήθησης: Αυτό το στρώμα σχεδιάζεται για να απομακρύνει την πιθανή παρεμπόδιση και να επιτύχει εκλεκτικότητα και επαναληψιμότητα στην ΧΦ-εκπομπή. Γενικά το στρώμα αυτό έχει ανοίγματα που αποκλείουν την διόδο μορίων από ένα δεδομένο μοριακό βάρος και πάνω.
- Στρώμα αντίδρασης: Στο στρώμα αυτό εκτελούνται ενζυμικές αντιδράσεις διαφόρων υποστρωμάτων και παράγουν την αναλυόμενη ή καταστρέφουν την παρεμποδίζουσα ένωση.

Γενικά η σύνθετη μεμβράνη πρέπει να επιτρέπει την εκλεκτική ελεύθερη διάχυση της αναλυόμενης ενώσεως ενώ να αποκλείει την διάχυση παρεμποδιστικών ενώσεων και συγχρόνως να μπορεί να σταθεροποιεί ενζύμα.

Στα πειράματά μας σχετικά με την εκχύλιση του NO από βιολογικά υγρά, χρησιμοποιήθηκε η μεμβράνη της οξεικής κυτταρίνης με επίστρωση από Nafion σαν στρώμα στήριξης/διήθησης για την απομάκρυνση όλων των ενώσεων παρεμπόδισης της ΧΦ-αντίδρασης και με πρόνοια την ελεύθερη διάχυση του NO. Στην περίπτωση του προσδιορισμού της ακετυλοχολίνης η μεμβράνη της οξεικής κυτταρίνης χρησιμοποιήθηκε σαν στρώμα στήριξης/διήθησης, και το στρώμα αντίδρασης αποτελούνταν από πηκτή πολυακρυλαμίδιου με παγιδευμένα ένζυμα.

2.5.2. Παρασκευή

Στην μεθοδολογία της παρασκευής μιας σύνθετης μεμβράνης, είναι πολύ σημαντικό να επιτευχθεί σταθερότης και συνεκτικότητας σε έκαστο στρώμα αλλά και μεταξύ των στρωμάτων για είναι συμπαγής και μη υπάρχουν διαρροές των συστατικών της στους διαλύτες των διαφόρων ροών της συσκευής FIA. Συχνά, υμενικά στρώματα διαφορετικής σύστασης παρασκευάζονται με τις κάτωθι τεχνικές προσάρτησης:

2.5.2.1. Φυσική προσάρτηση: Η σταθερότης της επίστρωσης ενός ημιστερεού ή υγρού υλικού σε μια στερεή επιφάνεια εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων του στηρικτικού στρώματος, την επιφανειακή τάση και την χημική συγγένεια των δύο

προστατευτικό υμενικό στρώμα. Συνήθως χρησιμοποιείται η μεθοδολογία πολυμερισμού με Nafion ή πολυουρεθάνη. Επειδή η επίστρωση αυτή συχνά γίνεται στο στρώμα αντίδρασης (περιέχει ένζυμα) προτιμάται να γίνεται υπό ήπιες συνθήκες (αποφεύγεται η επεξεργασία με ισχυρά όξινα ή αλκαλικά διαλύματα).

2.5.3. Μέθοδος επίστρωσης

Στην παρασκευή των σύνθετων μεμβρανών, απαιτείται ο σχηματισμός στρώματος υλικού στην επιφάνεια ενός στερεού μεμβρανοειδούς στρώματος στήριξης. Η συνήθης πρακτική είναι η έγχυση του υλικού του στρώματος αντίδρασης στην επιφάνεια του στρώματος στήριξης. Σ' αυτή την μεθοδολογία γίνεται ένα ομοιογενές διάλυμα με τα σχετικά συστατικά και εγχύεται στην στερεή φάση για επικάλυψη· στην συνέχεια αφήνεται για στερεοποίηση ή πολυμερισμό για την κατασκευή της σύνθετης μεμβράνης. Στην μέθοδο αυτή το πιο σημαντικό στάδιο είναι ο έλεγχος του πάχους του στρώματος. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόζονται οι κάτωθι μέθοδοι:

2.5.3.1 Επίστρωση με διασπορά: Στην μέθοδο αυτή, το διάλυμα διασπείρεται φυσικά με την βοήθεια εφαρμοστή υγρού υμενίου για τον έλεγχο του πάχους. Μερικές φορές ο εφαρμοστής δεν είναι χρήσιμος λόγω περιορισμών του στρώματος στήριξης. Ο χειρονακτικός τρόπος διασποράς δεν είναι αποτελεσματικός λόγω του ανόμοιου πάχους ή λόγω του υπερβολικού πάχους που παρέχει και οδηγεί σε αισθητήρες χαμηλής απόκρισης.

2.5.3.2 Επίστρωση με φυγοκέντρωση: Το διάλυμα εγχύεται και διασπείρεται με την βοήθεια φυγοκεντρικού επιστρωτή (Εικ.10). Με την χρήση διάφορων ταχυτήτων και χρόνων φυγοκέντρωσης επιτυγχάνονται επιστρωτικά υμένια διαφόρου πάχους. Συχνά είναι δύσκολο να επιλέξουμε την κατάλληλη ταχύτητα διότι απαιτεί μεγάλη εξάσκηση και χρήση μεθόδων για την μέτρηση του επιτυγχανόμενου πάχους και χαρακτηρισμού της δραστηριότητας της μεμβράνης. Γενικά, όσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα και ο χρόνος φυγοκέντρωσης τόσο λεπτότερες μεμβρανοειδείς επικαλύψεις επιτυγχάνονται. Ιδιαίτερα, σε περιπτώσεις που η μεμβρανοειδής επίστρωση περιλαμβάνει ένζυμα ο αισθητήρας με την λεπτότερη επίστρωση θα εμφανίσει μικρότερη ενζυματική δραστηριότητα, και η απόκριση του αισθητήρα θα είναι πτωχή.

- Η στρεπταβιδίνη παγιδεύεται στην επιφάνεια του υμενοειδούς στρώματος στήριξης , και κατόπιν επωάζεται το υλικό με τα βιοτινυλιωμένα ένζυμα απ' ευθείας
- Η βιοτίνη σταθεροποιείται στην επιφάνεια του υμενοειδούς στρώματος στήριξης ,και κατόπιν τα βιοτινυλιωμένα υλικά συνδέονται στην επιφάνεια δια μέσου γέφυρας με ελεύθερη στρεπταβιδίνη. Η μέθοδος αυτή απαιτεί δύο στάδια επώασης διότι πρέπει πρώτα να γίνει επώασης με στρεπταβιδίνη και έπειτα επώασης με τα βιοτινυλιωμένα υλικά.

2.5.4. Προκατεργασία της εμπορικής μεμβράνης στήριξης

Γενικά, η εμπορική μεμβράνη χρησιμοποιείται για την στήριξη διότι έχει αρκετή μηχανική αντοχή και σταθερές φυσικοχημικές ιδιότητες. Από την άλλη πλευρά οι ιδιότητές της μπορεί να μη είναι συμβατές με τις απαιτήσεις του πειραματικής εργασίας. Για παράδειγμα μπορεί να έχουν πολύ μικρό μέγεθος πόρων, ή πολύ μεγάλο πάχος, που οδηγεί σε χαμηλή ταχύτητα διάχυσης που αυξάνει τον χρόνο απόκρισης. Γενικά οι μεμβράνες που διατίθενται στο εμπόριο έχουν σταθερές ιδιότητες, ιδιαίτερα στην επιφάνειά τους· αυτό είναι ευεργετικό στην αποφυγή της ρύπανσής των, αλλά στην περίπτωση που απαιτείται η προσάρτηση αντιδραστηρίων (ένζυμα) , εμφανίζονται δυσκολίες . Σ' αυτή την περίπτωση η επιφάνεια κατεργάζεται με τις παρακάτω μεθόδους:

2.5.4.1. Αλκαλική υδρόλυση: Γενικά τα αλκαλικά διαλύματα μπορούν να υδρολύσουν τις πολυμερείς μεμβράνες (όπως την οξεική κυτταρίνη) , και θα παραχθούν μεγαλύτεροι πόροι. Πιο έντονα αλκαλικά διαλύματα δείχνουν πιο ισχυρή δράση και τα πολύ ισχυρά αλκαλικά διαλύματα οδηγούν στη πλήρη καταστροφή της μεμβράνης. Στην πράξη, υπό ήπιες συνθήκες και παρουσία χλωριούχου ψευδαργύρου ή υδρόλυση προχωρεί αργά και με κατάλληλη ρύθμιση του χρόνου υδρόλυσης μπορεί να επιτευχθεί ελεγχόμενη διάνοιξη των πόρων.

2.5.4.2. Επεξεργασία με υπεριοδικά: Η μεμβράνη της κυτταρίνης μπορεί να επεξεργασθεί διαδοχικά με υπεριοδικό νάτριο και ουρία. Η αλληλεπίδραση των παραγώγων της ουρίας με την φορμαλδεύδη οδηγεί σε έντονα δραστικές ομάδες που μπορούν προκαλέσουν περαιτέρω συμπύκνωση με αμινοξέα που είναι υπολείμματα πρωτεϊνών.

2.6. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

παγίδευση σε πηκτές ή μεμβράνες. Πέραν αυτών των συμβατικών μεθοδολογιών απεδείχθει σημαντική και η ακινητοποίηση βιομορίων σε ηλεκτροπολυμερισμένα υμένια . Γενικά, οι μέθοδοι αυτοί έχουν τους περιορισμούς τους και πολλές φορές εμφανίζουν χαμηλή επαναληψιμότητα και πτωχή επιφανειακή διασπορά.. Πρόσφατα διερευνήθηκαν οι ακόλουθες μέθοδοι ακινητοποίησης που δείχνουν ότι παρέχουν καλή ενζυματική δραστηριότητα:

2.6.1. Μέθοδος κολοειδούς-πηκτής (sol-gel)

Διάφοροι μέθοδοι ακινητοποίησης όπως αυτές της ομοιοπολικής πρόσδεσης, της φυσικής προσρόφησης και της σταυρωτής διασύνδεσης περιγράφηκαν για την ακινητοποίηση των ενζύμων. Πρόσφατα η εφαρμογή της μεθοδολογίας κολοειδούς-πηκτής για την παγίδευση των οργανικών μορίων σε ανόργανο υλικό έχει προκαλέσει τον ενδιαφέρον των ερευνητών. Ενζυμα όπως η AchE μπορούν να παγιδευθούν στα κανάλια των πόρων του κολοειδούς-πηκτής υλικού. Συγκρινόμενη με άλλες μεθόδους ακινητοποίησης , η μέθοδος κολοειδούς-πηκτής με χρήση γυαλιού σαν υλικό ακινητοποίησης ενζύμων έχει πολλά πλεονεκτήματα. Τα πλεονεκτήματα αυτά περιλαμβάνουν την ικανότητα να παγιδεύσουν μεγάλες ποσότητες ενζύμων, να αποκτήσουν θερμική και χημική σταθερότητα, απλότητα στην παρασκευή χωρίς ομοιοπολική πρόσδεση, ευκολία στον έλεγχο του μεγέθους των πόρων και της γεωμετρίας, και την ελάχιστη απόσβεση των αντιδραστηρίων φθορισμού. Αυτή η τεχνολογία επίσης παρέχει εναλλακτικό τρόπο σχεδίασης ανόργανων στηρικτικών υλικών με ευελιξία και ευλιγισία που παραδοσιακά εμφάνιζαν μόνο τα οργανικά υλικά.

Οι συνθήκες προετοιμασίας του κολοειδούς-πηκτής υλικού έχουν σημαντική επίδραση στην δραστηριότητα των παγιδευμένων ενζύμων. Τα τοπικά περιβάλλοντα των παγιδευμένων ενζύμων και η ικανότης των αναλυομένων να διαχέονται στο ένζυμο είναι οι δύο κύριοι παράγοντες στην παρασκευή κολοειδούς-πηκτής υλικού για βιοαισθητήρες. Πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί στις ιδιότητες των πορωδών κολοειδούς-πηκτής υλικών όπως στην κατανομή μεγέθους των πόρων, την ειδική επιφάνεια, την γεωμετρία των πόρων, την μορφολογία, και την πολικότητα. Ακόμη, έχουν διερευνηθεί και τα κινητικά φαινόμενα της αλληλεπίδρασης των αναλυόμενων ενώσεων με τα παγιδευμένα ένζυμα. Ομως, η σχέση μεταξύ του τύπου και pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων σε συνάρτηση με τον φθορισμό των φθορισμικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή οπτικής ίνας βιοαισθητήρων με βάση κολοειδούς-πηκτής υλικά έχει μελετηθεί πολύ λίγο. Η ανίχνευση της ακέτυλο-χολίνης

χρησιμοποιούνται για συζεύξουν τα νουκλειικά οξέα στην επιφάνεια, συμπεριλαμβανομένων και της παγίδευσης, της προσρόφησης και πρόσδεσης με ομοιοπολικό χημικό δεσμό. Λόγω του υψηλού υπόβαθρου που είναι αποτέλεσμα της μη-εξειδικευμένης προσρόφησης στις ακινητοποιήσεις μη-ομοιοπολικού χημικού δεσμού, έχει επιλεγεί η ομοιοπολικού δεσμού ακινητοποίηση για την εκλεκτική σύνδεση των ολιγονουκλεοτιδικών-ανιχνευτικών στοιχείων στα στηρικτικά υλικά. Μερικές καλά-μελετημένες τροποποιήσεις επιφανειών και μέθοδοι σιλιανοποίησης συχνά χρησιμοποιούνται για την ακινητοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων ή των DNA-μορίων.

Η ακινητοποίηση των αντισωμάτων σε στερεές φάσεις κατά τρόπο αποτελεσματικό και με διατήρηση της δραστηρότητάς των είναι ένα σημαντικό πεδίο για την έρευνα και την βιομηχανία. Ανεπτύχθηκαν μέθοδοι κατευθυνόμενης-θέσης προσάρτησης αντισωμάτων σε αгарόζη δια μέσου της οξειδωσης των υδατανθρακικών ημίσεων (moieties) στην περιοχή Fc. Παρόμοια προσάρτηση σε σιλιανοποιημένα στηρικτικά υλικά δεν επέτυχε. Έχει τελευταία περιγραφεί ένα νέο συνδιαστικό πρωτόκολο της κατευθυνόμενης θέσης προσάρτησης των οξειδωμένων με υπεριοδικά πολυκλωνικών αντισωμάτων γίδας σε ίνες από μαλλί γιαλιού που έχουν ενεργοποιηθεί με 3-αμινοπροπυλο-τριαιθόξυ-σιλάνιο. Η μελέτη επιδεικνύει ότι η μέθοδος αυτή οδηγεί στην αποτελεσματική ακινητοποίηση των πολυκλωνικών αντισωμάτων που διατηρούν την δεσμική ικανότητα για αντιγόνα.

Πολλές χημείες χρησιμοποιήθηκαν για την ακινητοποίηση αντισωμάτων σε στερεές επιφάνειες, που συνήθως βασίζονται στην στρατηγική της ενεργοποίησης της του στερεού υλικού και κατόπιν της πρόσδεσης του προ-επεξεργασμένου ή φυσικού αντισώματος. Οι πιο συνήθεις μέθοδοι περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του στερεού υλικού με βρωμιούχο κυάνιον ή εστέρες του N-υδροξυ ηλεκτραμιδίου. Οι μεθοδολογίες συζεύγνουν τα αντισώματα ομοιοπολικά στην στερεά φάση δια μέσου των αμινομάδων των περίπου 70 λυσινικών υπολειμμάτων (residues) στο μόριο, που καταλήγουν όχι μόνο σε προσαρτήσεις πολλαπλών θέσεων αλλά επίσης και πολλών προσανατολισμών με συνέπεια την μείωση της ικανότητας για πρόσδεση αντιγόνου.

Για να ξεπεραστούν οι περιορισμοί αυτοί, ανεπτύχθησαν μέθοδοι κατευθυνόμενης-θέσης ακινητοποίησης των αντισωμάτων. Μια προσέγγιση είναι να οξειδώσει κανείς το υδατανθρακικό ήμισυ του αντισώματος με υπεριοδικά και να παράγει αλδευδομάδες που μετά δένονται χημικά σε ενεργοποιημένα με υδραζίδια στηρικτικά υλικά όπως η αгарόζη. Επειδή τα αντισώματα είναι γλυκοζυλιωμένα σε μοναδική

συζευχθούν σε πρωτείνες με γλουταραλδεύδη. Εφαρμόστηκε στο εσωτερικό ενός λεπτού νάυλον σωλήνα και ακινητοποιήθηκαν γλυκοζοξειδάση και ουρεάση για τον προσδιορισμό της γλυκόζης και της ουρίας αντίστοιχα σε αυτοματο αναλυτή. Πιο πρόσφατη εργασία χρησιμοποίησε τους αλκυλιωτικούς παράγοντες διμέθυλοθειικό (DMS) ή τριεθυλοξάνιο τετράφθοροβορικό (TOTFB) σε διχλωρομεθάνιο και ελέγχθη ότι επετεύχθησαν υψηλότερες ποσότητες ακινητοποιημένων ενζύμων . Σε αντίθεση με την υψηλή τοξικότητα και την πιθανή καρκινογένεση που προέρχεται από την χρήση αυτών των αλκυλιωτικών μέσων, εφαρμόστηκαν ευρύτατα. Για παράδειγμα, το DMS χρησιμοποιήθηκε για να συνδέσει διάφορα ένζυμα σε νάυλον σωλήνες, σφαιρίδια και δίχτυα. Πολύ πρόσφατα χρησιμοποιήθηκαν λιγότερο επικίνδυνες μεθοδολογίες. Μερικοί ερευνητές χρησιμοποίησαν την αναρροή με μεθανολικό θειικό οξύ, που φαίνεται να επιτυγχάνει και Ο-αλκυλίωση και συγχρόνως μερική υδρόλυση στο πρώτο βήμα της ακινητοποίησης ενζύμων σε σφαιρίδια νάυλον. Οσον αφορά την άνεση και την ασφάλεια , η μέθοδος που πρέπει να επιλεγεί, είναι η αρχική της μερικής όξινης υδρόλυσης που χρησιμοποιήθηκε με νάυλον δίχτυα για χρήση στα ενζυμικά ηλεκτρόδια και για την ακινητοποίηση της λιπάσης σε νάυλον σφαιρίδια.

Με την χρήση νάυλον σφαιριδίων σχεδόν παρόμοιας διαμέτρου, η μέθοδος της DMS-ενεργοποίηση και η μέθοδος της μερικής όξινης υδρόλυσης επέτυχαν 13-18 χιλιοστογραμμάρια ακινητοποιηθείσης πρωτεΐνης ανά γραμμαριο νάυλον. Αναφέρθηκαν ότι ακινητοποιήθηκαν μέχρι και 400 χιλιοστογραμμάρια πρωτεϊνών ανά γραμμάριο νάυλον με ενεργοποίηση όξινης υδρόλυσης σε λεπτά νάυλον δίχτυα. Δεν κερδίζει λοιπόν κανείς να χρησιμοποιήσει την πιο επικίνδυνη τεχνική του αλκυλιωτικού παράγοντα.

2.6.4. Ακινητοποίηση ενζύμων σε μεμβράνη χιτοζάνης

Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από την βιοσυμβατότητά της. Ο βιοαισθητήρας που χρησιμοποιεί αυτό το υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί απ' ευθείας in vivo χωρίς να προκαλέσει καμία βιολογική ζημία. Τα ένζυμα, συνήθως παγιδεύονται απ' ευθείας ή δια μέσου ιχνών γλουταραλδεύδης, αλλά το ακινητοποιηθέν ένζυμο δείχνει μικρή δραστηριότητα και σταθερότητα. Αυτή η μέθοδος ακινητοποίησης δεν αντέχει τις απαιτήσεις της κατασκευής βιοαισθητήρος. Στο εργαστήριό μας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος βιοτίνης στρεπταβιδίνης με πολύ καλά αποτελέσματα δραστηριότητας και σταθερότητας για in vivo παρακολούθηση. Περισσότερες λεπτομέρειες δίνονται στο

την μελέτη της επιφανειακής συνεκτικότητας μορίων ή στην ακινητοποίηση των βιοτινυλωμένων μεμβρανικών κυστιδίων σε σύζευξη με αβιδίνη εγκατεστημένη σε στερεές επιφάνειες. Στην διατριβή αυτή χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία αυτή για την παρασκευή σύνθετης μεμβράνης με ακινητοποιημένα ένζυμα την AchE και ChOD

2.7. ΑΝΙΧΕΥΤΙΚΟΙ ΚΑΘΕΤΗΡΕΣ (PROBES)

2.7.1. Προετοιμασία του ανιχνευτικού καθετήρα

Οι ανιχνευτικές καθετήρες χρησιμοποιήθηκαν για παρατηρήσεις in vivo. Για να επιτύχουμε υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία, οι καθετήρες ανίχνευσης θα πρέπει να πληρούν τις κάτωθι πρυποθέσεις:

- Καλή μηχανική αντοχή
- Βιο-συμβατότητα και όχι βιολογικά ζημιογόνοι/τα υλικά του καθετήρα να μη είναι τοξικά και να μη προκαλούν αλλεργίες
- Ελεύθεροι παρεμποδίσεων: γενικά ο ανιχνευτικός καθετήρας κατασκευάζεται από ειδικές υμενοειδείς στρώσεις και η συνολική μεμβράνη θα πρέπει να έχει ικανοποιητικό MWCO ή σχετικό στρώμα προστασίας όπως Nafion υμένιο για να απομακρύνει πιθανά μόρια παρεμπόδισης
- Υψηλή ευαισθησία: Ο ανιχνευτικός καθετήρας θα πρέπει να σχεδιασθεί να αντιδρά αποδοτικά με την αναλυόμενη και να παρέχει προϊόν που να δίνει σήμα ανιχνεύσιμο.
- Υψηλή τχύτητα διάχυσης για την αναλυόμενη. Θα πρέπει να επιλέξουμε ικανοποιητικό μέγεθος πόρων για τον έλεγχο της ταχύτητας διάχυσης ή της ταχύτητας εκχύλισης.
- Ρύθμιση της δομής και μικρότητας του μεγέθους. Για να πληρεί τις απαιτήσεις της in vivo παρακολούθησης ο ανιχνευτικός καθετήρας θα πρέπει ελαχιστοποιηθεί σε μέγεθος και να είναι άνετος στο χειρισμό.

Στην διατριβή αυτή χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτικοί καθετήρες μικροδιαπήδησης που αγοράστηκαν από την εταιρεία Bioanalytical System Inc. (BAS) (Εικ.11 και12). Σύμφωνα με τον ανιχνευτικό στόχο, οι ανιχνευτικοί καθετήρες τροποποιήθηκαν με επίστρωση της μεμβράνης των με στρώματα διήθησης χαμηλού MWCO για απομάκρυνση παρεμποδιστικών ενώσεων

2.8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

2.8.1. Προετοιμασία των πειραματοζώων για την παρακολούθηση in vivo

Διάφορα είδη ζώων χρησιμοποιούνται σαν πειραματοζώα για μετρήσεις in vivo, όπως ποντίκια, αρουραίοι, ινδικά χοιρίδια, κουνέλια, σκύλοι, γουρούνια κ.λ.π.

Τα ποντίκια είναι μικρά, φθηνά και αναπαραγωγίμα, πράγμα που διευκολύνει την διερεύνηση της επίδρασης ορισμένων παραγόντων, καθότι σ' ένα τέτοιο πείραμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί κάποιος αριθμός πειραματοζώων σαν μάρτυρες ελέγχου και κάποιος άλλος για το κυρίως πείραμα. Όμως, τα ποντίκια έχουν μικρό σώμα, και λίγο αίμα και αυτό φέρνει δυσκολίες στην χειρουργική επέμβαση και στην ανάλυση του αίματος διότι η λήψη και λίγου αίματος θα επιφέρει ανωμαλίες στην φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Τέλος τα ποντίκια δεν είναι ικανοποιητικά για in vivo παρακολούθηση δια μέσου αιμοφόρων αγγείων επειδή οι περιφερειακές φλέβες και αρτηρίες είναι πολύ μικρές, αλλά είναι χρήσιμα in vivo παρακολούθηση σε ιστούς (όπως υποδερμικούς).

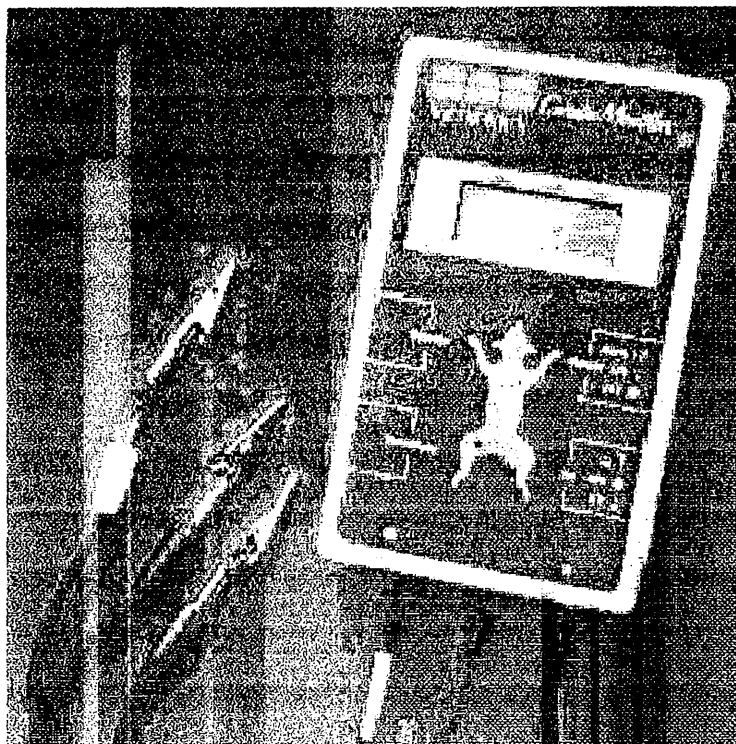
Οι αρουραίοι έχουν ικανοποιητικό βάρος σώματος για κάθε πείραμα, αλλά είναι επιθετικοί, και οι ερευνητές θα πρέπει να προσέξουν μήπως δαγκωθούν κατά την χειρουργική επέμβαση. Οι αρουραίοι είναι κατάλληλοι για in vivo παρακολούθηση μέσω της σφαγίτιδας φλέβας και ιστού και έχουν επίσης ωρισμένη ποσότητα αίματος που επιτρέπει την λήψη μικρής ποσότητας αίματος για ανάλυση χωρίς να προκαλεί εμφανείς επιδράσεις στην φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού των.

Τα ινδικά χοιρίδια είναι πολύ ήσυχα ζώα με ικανοποιητικό βάρος σώματος, αλλά δεν είναι αναπαραγωγίμα και κοστίζουν περισσότερο από τους αρουραίους. Χρησιμοποιούνται συνήθως σε κάποιες χειρουργικές επεμβάσεις χωρίς αναισθησία.

Τα κουνέλια είναι ήρεμα ζώα με μεγαλύτερο βάρος σώματος, και είναι κατάλληλα για πιο πολύπλοκες χειρουργικές επεμβάσεις, όπως αυτές της καρδιάς. Έχουν ωρισμένη ποσότητα αίματος και είναι κατάλληλα για συνεχή λήψη αίματος προς ανάλυση. Είναι δύσκολο να βρεί κανείς την σφαγίτιδα φλέβα, αλλά η φλέβα και αρτηρία που περνούν από το αυτί είναι κατάλληλες για in vivo παρακολούθηση μέσω αιμοφόρων αγγείων και για λήψη δειγμάτων αίματος. Περαιτέρω, είναι κατάλληλα και για in vivo παρατήρηση ιστών.

Στα in vivo πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν αρουραίοι για την in vivo παρακολούθηση του NO δια μέσου της σφαγίτιδας, της μοιραίας φλέβας και νευρικού ιστού του εγκεφάλου. Τα κουνέλια χρησιμοποιήθηκαν για την in vivo παρακολούθηση του NO δια μέσου του αυτιού, της σφαγίτιδας, μοιραίας φλέβας και

Εικ.13 Απεικόνιση του μετρητού της ταχύτητας παλμών της καρδιάς



Η θερμοκρασία του σώματος σταθεροποιήθηκε στους 37°C με όργανο ελέγχου της θερμοκρασίας ζώων (Bioanalytical Systems⁵ Inc.) και παρακολουθείτο δια μέσου πρωκτικού ανιχνευτικού στοιχείου (Εικ. 14)

Το αμινοξύ μπορεί να αντιδράσει με την ο-φθαλαλδεύδη, και τα σχετικά παράγωγα μπορούν να ανιχνευθούν με κινητική μέθοδο και ανίχνευση με φασματοφωτομετρία απορρόφησης ή φθορισμομετρία. Η φθορισμομετρική μέθοδος θεωρείται ως η πλέον ευαίσθητος μέθοδος για τον προσδιορισμό των αμινοξέων, αλλά και η φασματοφωτομετρία απορρόφησης χρησιμοποιείται όταν η συγκέντρωση του αμινοξέος είναι αρκετά υψηλή. Στα πειράματα της διατριβής αυτής, η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την εύρεση του λόγου μετατροπής της αργινίνης προς την παραγώμενη κιτροουλίνη με την δράση του ενζύμου NOS. Το φάσμα διέγερσης των L-αργινίνης, και L-κιτροουλίνης έχει μόνο μια μικρή διαφορά ενώ το αντίστοιχο της εκπομπής είναι σχεδόν το ίδιο όπως φαίνεται από τα δεδομένα που δίνονται αμέσως πιο κάτω:

- L-αργινίνη: το μέγιστο στο φάσμα διέγερσης είναι 346 nm και η εκπομπή είναι 458 nm
- L-κιτροουλίνης το μέγιστο στο φάσμα διέγερσης είναι 342 nm και η εκπομπή είναι 458 nm

Για να εξάγει κανείς τον λόγο των δύο αναλυόμενων στο δείγμα χρησιμοποιήθηκε η απορρόφηση στα 350 nm· σ' αυτό το μήκος κύματος η L-αργινίνη έχει πολύ μεγαλύτερη απορρόφηση από την L-κιτροουλίνη. Η διαφοροποίηση στην ταχύτητα δημιουργίας παραγώγων της ο-φθαλαλδεύδης με τις αναλυόμενες χρησιμοποιήθηκε σαν παραμετρος για την εύρεση του λόγου των αναλυόμενων στο προς εξέταση δείγμα. Περισσότερες λεπτομέρειες για την μέθοδο δίνονται στο τμήμα της διατριβής που αναφέρεται στον προσδιορισμό του NO που παράγεται από την ενζυματική δράση του NOS στην αργινίνη.

2.9.2. Προσδιορισμός νιτρωδών

Ο προσδιορισμός των νιτρωδών βασίστηκε κατά κύριο λόγο στις ακόλουθες μεθόδους:

2.9.2.1. Μέθοδος Griess): τα νιτρώδη μπορούν να αντιδράσουν με το χρωμοτροπικό οξύ παρουσία σουλφανιλικού οξέος και τα παράγωγα που σχηματίζονται προσδιορίζονται δια μέσου της φασματοφωτομετρικής απορρόφησης στα 507 nm με το φασματοφωτόμετρο αυτόματης σάρωσης (SECOMAM)

2.9.2.2. Μέθοδος μαγγανομετρίας: τα νιτρώδη προσδιορίστηκαν ογκομετρικά με μαγγανομετρική μέθοδο σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

υποβάθρου που προέρχεται από την παρουσία των πορφυρινικών βιομορίων. Με την χρήση της βελτιστοποιημένης συσκευής και βελτιστοποιημένων συνθηκών ΧΦ-ανίχνευσης NO παρουσία πορφυρινικών βιομορίων έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης της παρασκευής μεμβράνης για την απομάκρυνση των παρεμποδιστών της ΧΦ-ανίχνευσης του NO κατά την δειγματοληπτική του διαδικασία από βιολογικά υγρά.

Η βελτιστοποίηση της συσκευής μικροδιαπίδυσης έγινε με διατήρηση όλων των βέλτιστων συνθηκών ΧΦ-ανίχνευσης του NO που επετεύχθησαν με την συσκευή FIA, και βελτιστοποιήθηκε

μόνο η ταχύτης ροής των αντιδραστηρίων, ή η μέθοδος δειγματοληψίας και το μήκος των

σωληνώσεων του συστήματος

Οι λεπτομέρειες των πειραμάτων αυτών παρέχονται στα τμήμα των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής και στα αντίστοιχα κεφάλαια.

3.1. ΓΕΝΙΚΑ

3.1.1. Παρακολούθηση του NO σε έμβιους οργανισμούς.

Πρόσφατα γίνεται πολύ ερευνητική προσπάθεια σε διάφορα πεδία όπως την ιατρική, την φαρμακολογία, την τοξικολογία, την βιοχημεία, κ.ο.κ. με στόχο το μόριο NO., που είναι ένα πολύ μεγάλης βιολογικής σημασίας μόριο για τους έμβιους οργανισμούς. Η έντονη φυσιολογική του δράση αποδίδεται στο μικρό του μέγεθος, την ελεύθερη διάχυσή του και την ισχυρή χημική του δραστηριότητα, επειδή ανήκει στα μόρια-ρίζες. Γενικά στην βιβλιογραφία τα αποτελέσματα των μελετών είναι πολύπλοκα και συχνά προκαλούν την σύγχυση. Για παράδειγμα, η φυσιολογική δράση του NO θεωρήθηκε φιλική σε μερικές περιπτώσεις ενώ εχθρική σε άλλες. Η δράση του στον οργανισμό φαίνεται να είναι προστατευτική, αλλά σε μερικές περιπτώσεις η ίδια δράση καταλήγει σε καταστρεπτικά αποτελέσματα [1-10].

Μεγάλη πρόοδος έχει επιτευχθεί μέχρι σήμερα στην κατανόηση των δράσεων του μορίου του NO υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά θα πρέπει να γίνει κατανοητό ότι η γνώση μας στο πεδίο αυτό είναι ακόμη πτωχή. Μέχρι σήμερα αντιμετωπίζει κανείς πολλά προβλήματα στο είδος αυτό της έρευνας για τους εξής λόγους:

(1). Η συγκέντρωση του NO είναι αρκετά χαμηλή λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του σε

έμβιους οργανισμούς και η παρακολούθησή του in vivo είναι προβληματική άν όχι αδύνατη

ακόμη και σήμερα με αποτέλεσμα να μη μπορεί να γίνουν ερευνητικές μελέτες της δράσης

του· η πλήρης κατανόησης της επίδρασης του NO στις φυσιολογικές δράσεις του οργανισμού

μπορεί να γίνει μόνο όταν γίνει δυνατή η μέτρηση της διαφοροποίησης του σε διάφορες

καταπονήσεις του οργανισμού.

(2). Σαν ελεύθερη ρίζα προκαλεί ζημιά στον οργανισμό που αναστέλλεται από δραστικές

βιολογικές ενώσεις όπως:

- Άλλα μόρια ρίζες όπως η υδροξυλο-ρίζα (OH[•]), το υπεροξειδικό ανιόν (O₂^{•-}) που αμφότερα υπάρχουν στον οργανισμό και αντιδρούν με το NO και δίνουν άλλες δραστικές ομάδες

άμεση μέθοδος για τον προσδιορισμό του NO in vivo λόγω των πολλών συστατικών που βρίσκονται στα βιολογικά υγρά και παρεμποδίζουν την ανίχνευση καθώς και του μικρού χρόνου ημιζωής του. Πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την μέτρηση του NO [21-45], παρ' όλα αυτά καμιά δεν έχει εφαρμοσθεί στην NO in vivo παρακολούθηση. Η ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου για την παρακολούθηση του NO in vivo σε πραγματικό χρόνο είναι επείγουσα ανάγκη [46-78].

Από την πολυπλοκότητα των δράσεων και επιδράσεών του σε διαφορες φυσιολογικές και παθολογικές λειτουργίες του οργανισμού δεν είναι δυνατόν να προβλεφθεί πότε η παραγωγή του είναι φιλική και πότε εχθρική. Πολλά ερευνητικά δεδομένα δίνουν διαφορετικά ή και ακόμα αντίθετα αποτελέσματα παρ' ολο που οι συνθήκες είναι οι ίδιες. Το φαινόμενο αυτό δεν είναι παράξενο, αν σκεφθεί κανείς ότι όλα τα φυσικά συμβάντα έχουν δύο όψεις που, βέβαια, η μία είναι η πραγματική, και η πρόοδος που έχει γίνει στο πεδίο δεν είναι ακόμη αρκετή για να ξεχωρίσει την αλήθεια. Πρέπει να δημιουργηθεί μια νέα μέθοδος για την καλύτερη κατανόηση της δράσης του μορίου αυτού και πρώτα απ' όλα πρέπει να επιτευχθούν μετρήσεις εμπιστοσύνης του NO με μια μέθοδο που θα αποτελέσει εργαλείο για τις περαιτέρω μελέτες.

Στην εργασία αυτή, αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος της παρακολούθησης του NO σε πραγματικό χρόνο in vivo μέσω δειγματοληψίας με συσκευή μικροδιαπίδυσης και FIA/XΦ-ανίχνευσης [9-86].

3.1.2. Προσδιορισμός του H₂O₂ σε έμβιους οργανισμούς.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου θεωρείται ότι παίζει ρόλο κλειδί στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις των θαλάσσιων περιβαλλόντων, ιδιαίτερα στα επιφανειακά νερά (τα πάνω 10 μέτρα) όπου συγκεντρώσεις των 100-1000 nM έχουν αναφερθεί. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι λοιπόν πιθανόν να ελέγχει την οξειδοαναγωγική σωματιδιακή σύσταση πολλών ειδών μεταλλων και να λαμβάνει μέρος σε αντιδράσεις οξειδωσης διαφόρων μορίων, περιλαμβάνοντας τις ευκίνητες και υπολειμματικές οργανικές ενώσεις. Κατά κύριο λόγο σχηματίζεται από την φωτοχημική παραγωγή δια μέσου ενδιάμεσων ελευθέρων ριζών και διαλυμένων οργανικών χρωμοφόρων και βρίσκεται σε όλα τα φυσικά και ένυδρα περιβάλλοντα. Η υγρή και στεγνή απόθεση του φωτοπαραγόμενου H₂O₂ στην ατμόσφαιρα μπορεί να είναι σημαντική μεταβατική πηγή στους ωκεανούς ενώ η βιολογική παραγωγή του από μερικά φυτοπλαγκτόν είναι πηγή μικρότερης κλίμακας.

Το ενδιαφέρον για την ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στους έμβιους οργανισμούς είναι ότι έχει αποδειχθεί η συμμετοχή του σε πολλές ασθένειες, όπως

Τα τελευταία χρόνια, κλιμακώθηκε η σημαντικότητα της παρακολούθησης της συγκέντρωσης του του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε διάφορα πεδία , όπως την ιατρική θεραπεία, την βιοχημεία, την υγιεινή τροφίμων, και τον έλεγχο του περιβάλλοντος. Πολλές έρευνες έχουν γίνει για την παρασκευή αισθητήρων υπεροξειδίου του υδρογόνου ή ηλεκτροδίων που τοποθετούνται σε διαλύματα που περιέχουν ένζυμα. Ακόμη, μελέτες για ηλεκτροχημικούς αισθητήρες αερίου H_2O_2 έχουν αναφερθεί [97-100]. Βιοαισθητήρες για την ανίχνευση H_2O_2 είναι πάρα πολύ χρήσιμοι διότι η μέτρηση της συγκέντρωσης του H_2O_2 απαιτείται σε πολλά πεδία έρευνας και ο H_2O_2 -ανιχνευτής είναι χρήσιμος για την παρασκευή ποικιλίας αισθητήρων με βάση τα ένζυμα των οξειδασών[101-103].

3.1.3. Προσδιορισμός της ακετυλοχολίνης σε έμβιους οργανισμούς

3.1.4. Η ακετυλοχολίνη (ACh) είναι ο πιο επαρκής διεγερτικός διαβιβαστής στις συνάψεις των νευρικών κυττάρων και συνδέσεις νευρικών με μυικά κύτταρα στο εντερικό νευρικό σύστημα. Είναι ο νευροδιαβιβαστής του ζωικού βασιλείου που περιγράφηκε πρώτος. Είναι ο πρωτογενής διαβιβαστής μεταξύ νευρών και ιστών. [104,105].

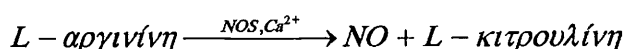
Η ακετυλοχολίνη ήταν η πρώτη ένωση που ταυτοποιήθηκε σαν νευροδιαβιβαστής στο κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS). Φυλογενετικά αυτή η ένωση βρίσκεται σε όλο το ζωικό βασίλειο καθώς επίσης και σε μερικά φυτά όπου παρέχει την χημική άμυνα. Η ακετυλοχολίνη συνίσταται από την χολίνη (μια ουσία που βρίσκεται στα τρόφιμα, που λαμβάνεται από τα χολινεργικά κύτταρα δια μέσου του συστήματος λήψης χολίνης που βοηθείται από το νάτριο) και μια ακετυλομάδα που παρέχεται από το Ακετυλο-συνένζυμο Α (παράγεται ενδοκυτταρικά από την οξειδωτικό μεταβολισμό στα μιτοχόνδρια). Η σύνθεση της ακετυλοχολίνης λαμβάνει χώρα στα άκρα των αξόνων των νευρικών κυττάρων και καταλύεται από το κυτοσολικό ένζυμο την χολινοακέτυλο-μεταφοράσης (ChAT). Η αποκάλυψη της ακετυλοχολίνης σαν νευροδιαβιβαστής έγινε τα 1920. Πρώτα η χολίνη απομονώθηκε από την λεκιθίνη το 1862 και ανακοινώθηκαν διάφορες φυσιολογικές της δράσεις γύρω στα 1900. Μερικοί ερευνητές συνέθεσαν την ακετυλοχολίνη και βρήκαν πως ήταν 10000 φορές πιο δραστική φυσιολογικά από την χολίνη. Ο sir Henry Dale έδειξε το 1914 ότι η ακετυλοχολίνη εμφάνιζε δράση παρόμοια αυτής που παρατηρείται με τον ερεθισμό του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος. Στα 1921, τα πειράματα έδειξαν ότι η ακετυλοχολίνη είναι χημικός νευροδιαβιβαστής στις απολήξεις του πνευμονογαστρικού νεύρου στην καρδιά και αργότερα βρέθηκε ότι ήταν κανονικό

3.2.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΝΟ-ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΕΠΙ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΡΟΗΣ ΠΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΚΑΝΑΛΙ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΠΟΛΥ ΚΑΝΑΛΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΡΟΗΣ/ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΟΥΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

3.2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

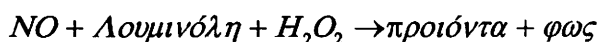
3.2.2. Ο ΧΦ-προσδιορισμός θεωρείται ότι είναι η πιο χρήσιμη μέθοδος για την ανίχνευση του ΝΟ λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της ικανότητάς του για παρακολούθηση της συγκέντρωσής του σε πραγματικό χρόνο κατά την πορεία μιας μεταβολής του. Ακόμη το ΝΟ έχει αναφερθεί πως κατά την αντίδραση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζει περοξυνιτρώδες (ONOO⁻) που είναι ισχυρότερα οξειδωτικά σωματίδια από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και που μπορούν να δώσουν ΧΦ-εκπομπή. Η ΧΦ-ανίχνευση είναι δυνατόν να ξεπεράσει τις δυσκολίες του in vivo προσδιορισμού ΝΟ σε πραγματικό χρόνο παραγωγής του από τις αντιδράσεις του οργανισμού σε διαφορετικές περιστάσεις της ζωής εάν σχεδιασθεί σωστά [127-133].

3.2.3. Πέραν από τις συμβατικές μεθόδους της παρασκευής του ΝΟ με την χρήση ανόργανων αντιδράσεων, το ΝΟ μπορεί να παρασκευασθεί εργαστηριακά δια μέσου της ενζυματικής μετατροπής της L-αργινίνης με την δράση του ενζύμου ΝΟ-συνθάση [131], με βάση την ακόλουθη αντίδραση,



Αυτό το είδος της παρασκευής ΝΟ είναι προτιμότερο για την αναλύσεις με έγχυση δείγματος σε ροή (FIA) διότι το σχηματιζόμενο ΝΟ είναι ελεύθερο από άλλα σωματίδια οξείδωσης του ΝΟ, που μπορούν να παρεμποδίσουν την ΧΦ-ανίχνευση του ΝΟ.

Στην εργασία αυτή το ΝΟ παράγεται με την πιο πάνω ενζυματική αντίδραση και ανιχνεύεται κατ' ευθείαν σε γραμμή (on-line) στην υδατική φάση με την ΧΦ-αντίδραση της λουμινόλης/H₂O₂ σύμφωνα με την αντίδραση



Με βάση την συσκευή FIA/ΝΟ-ΧΦ-ανίχνευση περιγράφεται μια νέα μέθοδος προσδιορισμού αργινίνης που έχει την επαναληψιμότητα της τεχνικής FIA και την

Συσκευή

Τα πειράματα απορρόφησης φωτός πραγματοποιήθηκαν σε ένα UV-ορατού φασματοφωτόμετρο (S1000PC SECOMAM)

Τα πειράματα εκπομπής χημειοφωταύγειας έγιναν με μία μέθοδο ανάλυσης με έγχυση δείγματος σε ροή αντιδραστήριου η οποία χρησιμοποιεί μια διάταξη FIA συνδεδεμένη με έναν φωτοπολλαπλασιαστή ευαίσθητο σε UV ακτινοβολία. Η κυψελίδα είναι ένας ελικοειδής γυάλινος σωλήνας, χειροποίητος και τοποθετείται ακριβώς μπροστά από το παράθυρο του φωτοπολλαπλασιαστή. Ο δειγματολήπτης είναι μια εξάπορτη βαλβίδα με έναν τριχοειδή σωλήνα που έχει όγκο 0,140μλ. Η διάταξη FIA/φωτοπολλαπλασιαστή φαίνεται στο Σχήμα1.

Προετοιμασία του αντιδραστήρα ακινητοποίησης ενζύμου Το NOS-ένζυμο ακινητοποιήθηκε πάνω σε ελεγχόμενων πόρων γυάλινα σφαιρίδια (CPG) με την μέθοδο της γλουταραλδεύδης [134] σε διάφορα στάδια ως ακολούθως

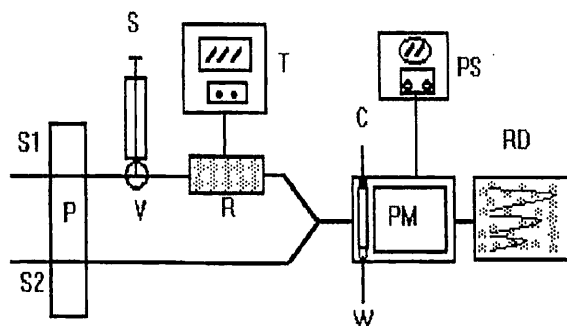
α) Τα CPG καθαρίστηκαν με νιτρικό οξύ και με γ-αμινοπροπυλτριαιθοξυσιλάνιο

β) Τα αλκυλαμινο CPG ενεργοποιήθηκαν με γλουταραλδεύδη και

γ) Το NOS ένζυμο συζεύγνυται με το CPG και τοποθετείται σε μια γυάλινη στήλη ώστε να προκύψει ο ενζυμικός αντιδραστήρας.

Σχήμα 1 Διάταξη FIA/ανιχνευτή χημειοφωταύγειας ✓

Συνομεύσεις: P=περισταλτική αντλία (GILSON Mini-2), V=εξάπορτη βαλβίδα (ANACHEM), R=Αντιδραστήρας NOS-ενζύμου 6,0 cm x 2,5 mm (μήκος x πλάτος), C=κοχλιωτή κυψελίδα, W=απόβλητα, PM=φωτοπολλαπλασιαστής (THOPN EMI 9789 B), PS=τροφοδοτικό (THOPN EMI PM 28B (1200V), RD=καταγραφέας (LINEAR 1200), S1= γραμμή μεταφοράς (0,76 ml/min, ρυθμιστικό διάλυμα), S2=αντιδραστήρια χημειοφωταύγειας (0,76 ml/min, σύστημα λουμινόλης-H₂O₂), S= σύρριγγα (2,5 ml) για έγχυση δείγματος, T=θερμοστατικό (JULABO VC F30).



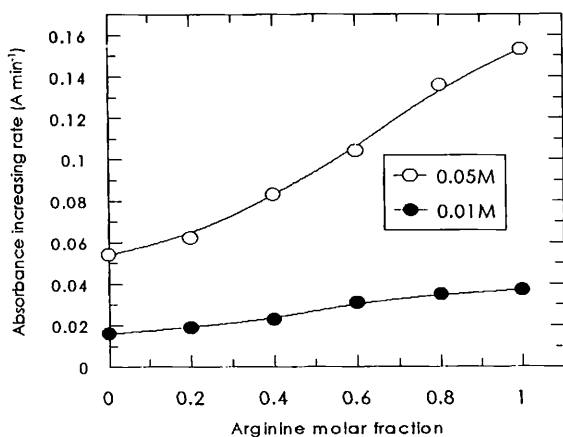
όπως ο εγκέφαλος. Το iNOS προέρχεται από το ανοσοποιητικό σύστημα όπως είναι τα μεγάλα φαγοκύτταρα. Παρά τις διαφορές τους στα διάφορα επίπεδα έκφρασής τους, όλα τα αντισώματα του ενζύμου έχουν ίδιες τέσσερις προσθετικές ομάδες. Το φλαβινοαδενινοδινουκλεοτίδιο (FAD), το φλαβινονουκλεοτίδιο (FMN), την σιδηροπρωτοπορφυρίνη (αίμη) και την τετραυδροπτερίνη (H4BP). Η δραστηριότητα αυτού του είδους ενζύμου εξαρτάται από το NADPH και την συγκέντρωση του ιόντος ασβεστίου. Είναι επίσης απαραίτητη η εξαρτώμενη από ασβέστιο ρυθμιστική πρωτεΐνη που καλείται καλμοδουλίνη [137, 138].

Δραστηριότητα του NOS που βασίζεται στο σχηματισμό κιτρουλίνης

Η ο-φθαλαλδεύδη αντιδρά κάτω από κατάλληλες συνθήκες με αμίνες και αμινοξέα και σχηματίζει παράγωγα τα οποία απορροφούν σε 340 – 350 nm και εκπέμπουν φθορισμό περίπου σε 460 nm. Προκειμένου να την παράγουμε ποσοτικά την κιτρουλίνη κάναμε τα ακόλουθα:

(α) Πρότυπες καμπύλες: Η ταχύτητα της αντίδρασης της ο-φθαλαλδεύδης με την L-αργινίνη είναι πολύ πιο γρήγορη από την αντίστοιχη με την L-κιτρουλίνη. Οι πρότυπες καμπύλες για την ταχύτητα αύξησης της απορρόφησης σε 350 nm έναντι της συγκέντρωσης της L-αργινίνης ή της L-κιτρουλίνης φαίνονται στο Σχήμα 2. Η μεγάλη διαφορά των ταχυτήτων αντίδρασης επιτρέπει τον προσδιορισμό της αργινίνης παρουσία της κιτρουλίνης και έτσι βρίσκουμε την μετατροπή της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη από την δράση του NOS-ενζύμου. Αυτό ολοκληρώνεται από την λήψη των καμπυλών συσχέτισης μεταξύ της ταχύτητας απορρόφησης και του μοριακού κλάσματος της L-αργινίνης σε μικτά υδατικά διαλύματα αργινίνης και κιτρουλίνης σε συγκεκριμένες ολικές συγκεντρώσεις.

Σχήμα 3 Καμπύλες βαθμονόμησης του μοριακού κλάσματος της L-αργινίνης για 0,05 και 0,01 M υδατικά διαλύματα μιγμάτων L-αργινίνης με L-κιτροουλίνη.



(γ) Μετρήσεις για μετατροπή της L-αργινίνης χρησιμοποιώντας τον NOS-αντιδραστήρα.

Η διάταξη ροής που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση εκπομπής χημοφωταύγειας με τον NOS-αντιδραστήρα στην κατεύθυνση της ροής, χρησιμοποιήθηκε για να περάσουν 30,0 ml από το διάλυμα L-αργινίνης 0,05 M. Από τα 30 ml του εκλούσματος, μια ποσότητα των 5 ml απομακρύνθηκε για να μετρηθεί ο λόγος της μεταβολής της απορρόφησης και μέσω της πρότυπης καμπύλης να προσδιοριστεί το μοριακό κλάσμα της L-αργινίνης. Τα υπόλοιπα 25,0 ml αποθηκεύτηκαν για να χρησιμεύσουν για τροφοδοσία του NOS-αντιδραστήρα μετά από δέκα λεπτά έκπλυση με απεσταγμένο νερό. Η διαδικασία επαναλήφθηκε αρκετές φορές και ελήφθησαν τα μοριακά κλάσματα της L-αργινίνης από το έκλουσμα. Τα δεδομένα φαίνονται στο Σχήμα 4α.

Σε ένα άλλο πείραμα, 5,0 ml διαλύματος 0,05 M L-αργινίνης πέρασε δια μέσου του NOS-αντιδραστήρα και συλλέχθηκαν με συλλογέα κλασμάτων ποσότητες του 1,0 ml από τα εκλούσματα. Η ταχύτητα αλλαγής της απορρόφησης προσδιορίστηκε όπως προηγούμενα. Με την χρήση της πρότυπης καμπύλης του Σχήματος 3, εκτιμήθηκε το μοριακό κλάσμα της L-αργινίνης για τα συλλεχθέντα δείγματα. Τα δεδομένα φαίνονται στο Σχήμα 4β.

οφείλεται σε δηλητηρίαση των ενεργών ή συνεργιστικών θέσεων αλλά επίσης αυτό μπορεί να οφείλεται σε αλλαγή της διαμόρφωσης του ενζυμικού μορίου οφειλόμενη στην αντίδραση. Η δηλητηρίαση των ενεργών θέσεων μπορεί να οφείλεται στα προϊόντα της αντίδρασης ή σε παρεμποδίζουσες ενώσεις οι οποίες μολύνουν το αντιδραστήριο της αργινίνης.

Δραστικότητα του NOS που βασίζεται στην εκπομπή χημειοφωταύγειας

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1 η συσκευή είναι εξοπλισμένη με έναν NOS-ενζυματικό αντιδραστήρα που παρέχει την πηγή NO και έναν ανιχνευτή χημειοφωταύγειας που χρησιμεύει σαν αισθητήρας. Και τα δύο τμήματα της συσκευής χρειάζονται βελτιστοποίηση όσο αφορά τις συνθήκες λειτουργίας, το κάθε ένα χωριστά και το σύνολο. Για παράδειγμα το τμήμα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας θα μπορούσε να έχει όσο το δυνατόν μικρότερο υπόβαθρο για την εκπομπή και να μην επηρεάζεται από την παρουσία αντιδραστηρίων ή άλλων προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης εκτός από το προϊόν NO. Από την άλλη πλευρά ο ανιχνευτής πρέπει να δείχνει την υψηλότερη δυνατή ευαισθησία για το μόριο του NO.

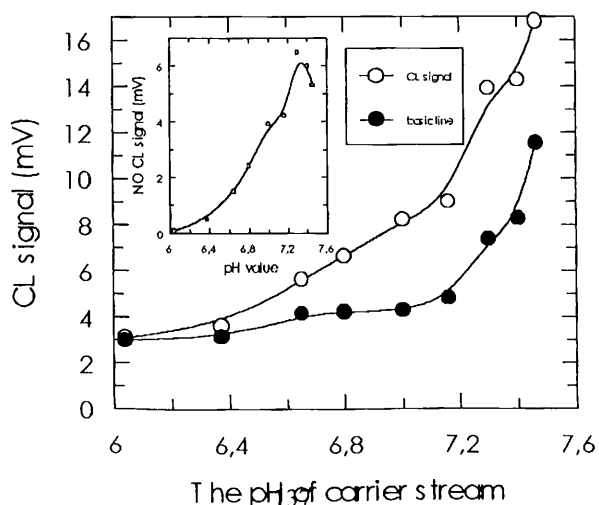
Τα πρωταρχικά πειράματα έδειξαν ότι

1. Η τιμή των 900 Volt ήταν μια λογική ρύθμιση για την παροχή ισχύος για τον ευαίσθητο στην UV ακτινοβολία φωτοπολλαπλασιαστή που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία.
2. Τα 0,2 m μήκος του σωλήνα από τεφλόν (0,8 mm id) μεταξύ του ενζυμικού αντιδραστήρα και της κυψελίδας του ανιχνευτή της διάταξης FIA ήταν καλή επιλογή.
3. Το μέγεθος του αντιδραστήρα του τριχοειδούς γυάλινου αντιδραστήρα μήκους 6 cm και εσωτερικής διαμέτρου 2,5 cm ήταν κατάλληλο για την λήψη μιας συμμετρικής και λεπτής κορυφής για το σήμα εκπομπής χημειοφωταύγειας χωρίς προβλήματα διασποράς. Γενικά ο αντιδραστήρας δεν θερμάνθηκε εξωτερικά.
4. Το μέγεθος δείγματος των 120 μl βρέθηκε ότι ήταν αρκετό για να δώσει ένα καλά σχηματισμένο σήμα.
5. Το ρεύμα του αντιδραστηρίου χημειοφωταύγειας είχε σύσταση από 100 μM λουμινόλη/5 mM H₂O₂ σε 0,01 M Tris (pH=7,3) ρυθμιστικό διάλυμα. Αυτή η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 5 φορές υψηλή όπως εκείνη που βρέθηκε στην βιβλιογραφία [139], για να ισορροπήσει την απώλεια από την αστάθεια του H₂O₂ σε διαλύματα αναγωγικών ενώσεων ειδικά σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες που είναι συνηθισμένες στις συνθήκες λειτουργίας.

βρέθηκε ικανοποιητική για την λήψη ενός καλού σήματος με τις διαστάσεις του αντιδραστήρα που επελέγησαν και αναφέρθηκαν παραπάνω. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία [5], το αντιδραστήριο Ca^{2+} -EGTA χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1 mM EGTA και 1 mM CaCl_2 . Χρησιμοποιώντας για την γραμμή μεταφοράς την ίδια σύσταση, από προκαταρκτικά πειράματα πήραμε ένα μεγάλο σήμα (περίπου 15 mV) σε pH 5,75 από 0,1 M L-αργινίνη, ύστερα από έκπλυση του αντιδραστήρα με απεσταγμένο νερό για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αλλά το σήμα γινόταν συνεχώς μικρότερο με επιτυχείς εγχύσεις δειγμάτων L-αργινίνης. Στο βέλτιστο pH 7,1 ~7,4 για την δραστηριότητα του NOS, πήραμε ένα πολύ μικρό σήμα (περίπου 1 mV). Σε μεταγενέστερη πειραματική εργασία, χρησιμοποιώντας στη γραμμή μεταφοράς Ca^{2+} -EDTA σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES, πήραμε ένα πολύ σταθερό σήμα. Περισσότερη έρευνα επικεντρώθηκε στην αλλαγή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος και στη συγκέντρωση του ελεύθερου (μη συμπλοκοποιημένου) Ca^{2+} από το EDTA του διαλύματος της γραμμής μεταφοράς. Η επίδραση αυτών των μεταβολών φαίνεται στον Πίνακα 1.

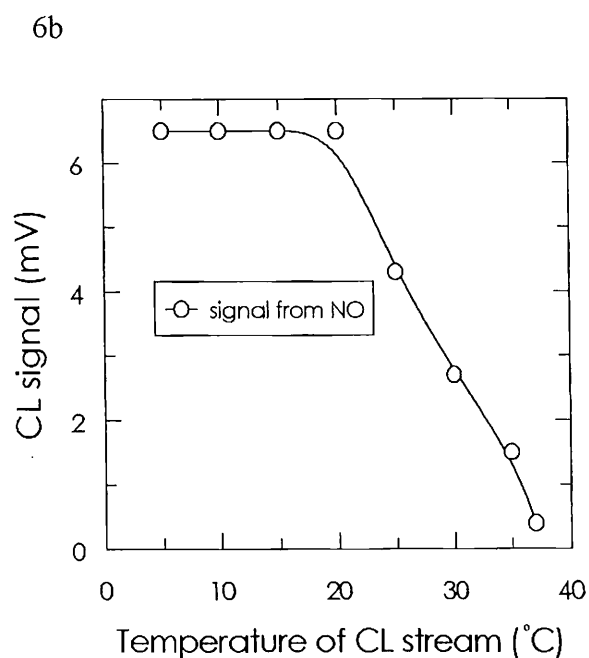
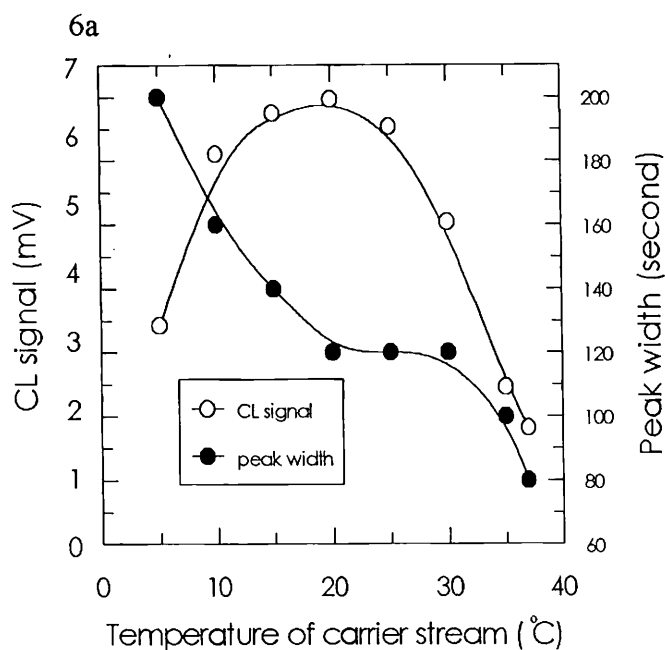
Από τον Πίνακα 1 βρίσκουμε ότι όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του Ca^{2+} -EDTA και του HEPES ρυθμιστικού διαλύματος, το σήμα της αντίδρασης βελτιώνεται, αλλά επίσης αυξάνεται το σήμα του υποβάθρου. Το αυξηθέν σήμα του υποβάθρου έχει μεγάλη επίδραση στην παράμετρο του ορίου ανιχνευσιμότητας. Η σύσταση του διαλύματος της γραμμής μεταφοράς HEPES 5 mM, CaCl_2 0,625 mM, EDTA 0,5 mM, βρέθηκε ότι είναι βέλτιστη για αυτό το σύστημα αντίδρασης και με το καλύτερο όριο ανιχνευσιμότητας. Περισσότερες λεπτομέρειες για τα πλεονεκτήματα της χρήσης αυτής της σύστασης του διαλύματος της γραμμής μεταφοράς δίνονται στο Σχήμα 5 το οποίο δείχνει την επίδραση του pH στο σήμα της χημειοφωταύγειας.

Σχήμα 5 Σήμα χημειοφωταύγειας έναντι pH του CSS.5.



β) Τα αντιδραστήρια της χημειοφωταύγειας, ειδικά το H_2O_2 και το προϊόν NO διαφεύγουν από το υδατικό διάλυμα ποσοτικά σε υψηλότερες θερμοκρασίες. (Σχήμα 6β)

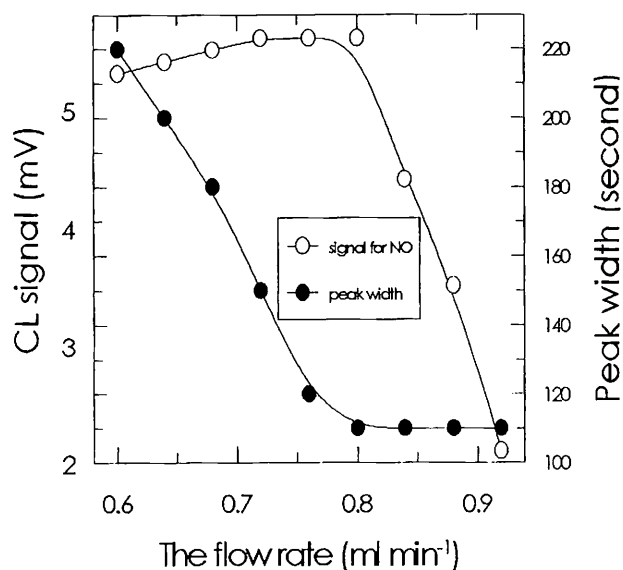
Σχήμα 6 Σήμα χημειοφωταύγειας και εύρος κορυφής έναντι θερμοκρασίας του CSS.5 (α) και ρεύματος CL (β).



Όπως φαίνεται στο σχήμα 6α η εκπομπή χημειοφωταύγειας είναι διαφορετική σε διαφορετικές θερμοκρασίες του διαλύματος της γραμμής μεταφοράς και το μέγιστο

την επίδραση της ταχύτητας ροής του διαλύματος της γραμμής μεταφοράς στην εκπομπή χημειοφωταύγειας, χρησιμοποιώντας έναν τριχοειδή σωλήνα για αντιδραστήρα με εσωτερική διάμετρο 2,5 mm και μήκος 6 cm. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 7.

Σχήμα 7 Σχήμα χημειοφωταύγειας και εύρος κορυφής έναντι της ταχύτητας ροής του CSS.5/CL-RSS.



Όπως φαίνεται από το Σχήμα 7 η ομαλή γραμμή που περνάει δια μέσου των σημείων εμφανίζει μια μικρή αύξηση όσο αυξάνει η ταχύτητα ροής μέχρι που για ταχύτητες ροής υψηλότερες από 0,8 ml min⁻¹ εμφανίζεται μια απότομη αύξηση. Το μέγιστο για το σήμα της χημειοφωταύγειας βρέθηκε για ταχύτητα ροής 0,76 ml min⁻¹. Η κατάλληλη ταχύτητα ροής πρέπει να παρέχει αρκετό χρόνο επαφής μεταξύ των αντιδραστηρίων και του καταλύτη ώστε να λαμβάνουμε την βέλτιστη συγκέντρωση NO.

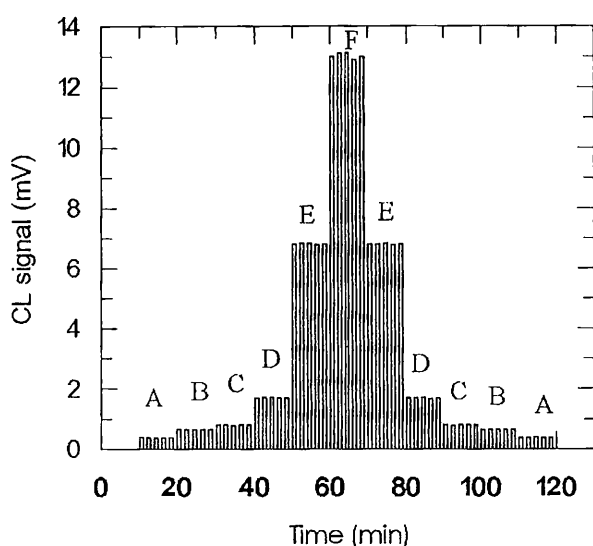
Όταν η ταχύτητα ροής είναι πολύ μεγάλη τα αντιδραστήρια δεν έχουν αρκετό χρόνο επαφής και το NO παράγεται σε μικρότερες ποσότητες. Έτσι το σήμα εκπομπής χημειοφωταύγειας είναι μικρό. Όταν επιλεγεί μικρότερη ταχύτητα ροής το σήμα δεν έχει εμφανή ελάττωση, αλλά η διαδικασία ανίχνευσης γίνεται χρονοβόρα επειδή το εύρος του σήματος αυξάνει. Έτσι η ταχύτητα ροής 0,76 ml min⁻¹ επιλέγεται σαν βέλτιστη, με ένα εύρος κορυφής του σήματος που αντιστοιχεί σε 120 sec για κάθε έγχυση δείγματος.

Επαναληπτικότητα του σήματος χημειοφωταύγειας

Από τα καταγραφόμενα, η επαναληπτικότητα των αποτελεσμάτων είναι πολύ καλή. Περισσότερες λεπτομέρειες φαίνονται στο Σχήμα 9.

Σχήμα 9 Τυπικά καταγραφόμενα για το σύστημα χημειοφωταύγειας Λουμινόλη-υπεροξειδίου υδρογόνου-μονοξειδίου-αζώτου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις L-αργινίνης χρησιμοποιώντας CSS.5.

Δείγμα: σύσταση=μεταβλητή, Συγκεντρώσεις L-αργινίνης στο διάλυμα της γραμμής μεταφοράς σε καθορισμένη τιμή pH(=7,3) ως ακολούθως: A=0,5 mM, B=1mM, C=5mM, D=10mM, E=50mM, F=100mM.



Επίδραση των ενώσεων που παρεμποδίζουν

Εξετάστηκε η επίδραση στην εκπομπή χημειοφωταύγειας των συνένζυμων, H4BP, καλμοδουλίνη και NADPH (αναφέρθηκαν σε αρκετές εργασίες) όσον αφορά τη δραστηριότητα του NOS. Πρόσθετα εξετάστηκαν μερικές άλλες σχετικές ενώσεις και τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2 Η διερεύνηση των παρεμποδιστικών ενώσεων

Interfering compound within the carrier stream	CL-emission (%) at 5×10^{-3} M H_2O_2 *	CL-emission(%) at 0.1 M H_2O_2 *
No interfering compound	100	100
KCl (2 mM)	95	97
MgCl ₂ (0.01 M)	35	36
NaCl (0.05 M)	27	29
Calmodulin (10 U/ml)	46	not tested
NADPH (0.06 mM)	8	85
H4BP (0.1 g/L)	0	2.5
DTT (0.1 mM)	0	9

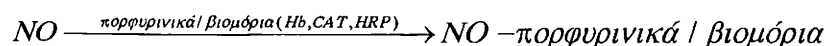
* H_2O_2 from the CL-reagent stream.

3.3 ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕ ΠΟΡΦΥΡΙΝΙΚΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΕΤΑΙ ΑΠΟ ΚΑΝΑΛΙ ΡΟΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΠΟΛΥ ΚΑΝΑΛΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΡΟΗΣ/ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΟΥΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

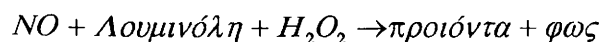
3.3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι προταθείσες μέθοδοι ανίχνευσης NO από τους ερευνητές αντιμετωπίζουν διάφορες δυσκολίες στην ανίχνευση in vivo του NO σε βιολογικά υγρά, λόγω της αστάθειας του μορίου σε υδατικά διαλύματα και της πολύ χαμηλής του συγκέντρωσης στα δείγματα αυτά. Στο αίμα το NO σταθεροποιείται υπό την μορφή συμπλόκου στην αιμογλοβίνη που είναι βιομόριο με πορφυρινικό δακτύλιο. Με βάση την ιδιότητα του NO να σχηματίζει σχετικά σταθερά σύμπλοκα με βιομόρια που έχουν πορφυρινική ομάδα θα μπορούσε να διερευνηθεί η συμπεριφορά των συμπλόκων αυτών στην ΧΦ-ανίχνευση του NO με βάση την ΧΦ-αντίδραση της λουμινόλης. Είναι όμως γνωστό πως βιομόρια με πορφυρινικό δακτύλιο στο μόριό τους είναι καταλύτες της ΧΦ-αντίδρασης της λουμινόλης με H₂O₂ με αποτέλεσμα να εμφανίζουν ΧΦ-σήμα. Η δυνατότης της μετουσίωσης του ενζύμου και ελευθέρωσης του NO στο κανάλι ροής του δείγματος πριν την ανάμιξή του με τα κανάλια ροής των ΧΦ-αντιδραστηρίων θα μπορούσε να εκμηδενίσει την υπόβαθρο ΧΦ-εκπομπή του βιομορίου. Με βάση, την στρατηγική αυτή σχεδιάσαμε συσκευή παραγωγής και καθαρισμού του NO· το παραχθέν/καθαρισθέν NO παγιδεύσαμε σε διάλυμα βιομορίου με πορφυρινικό δακτύλιο όπως η αιμογλοβίνη (Hb), η καταλάση (CAT), η καρτοτο-περοξειδάση (HRP). Το διάλυμα αυτό οδηγήθηκε δια μέσου του καναλιού ροής δείγματος της συσκευής FIA/ΧΦ-ανίχνευσης προς μετουσίωση με την συμβολή του σε άλλο κανάλι ροής με το υγρό μετουσίωσης, και μετά το διοχετεύσαμε στο κανάλι ροής της λουμινόλης μπροστά στην είσοδο της κυψελίδας του ανιχνευτή. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στην πορεία αυτή ανίχνευσης του NO είναι οι ακόλουθες[142-144]:

Παγίδευση NO:



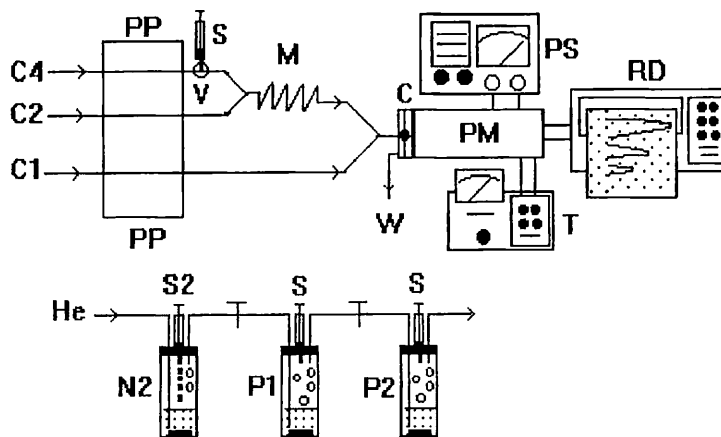
ΧΦ-σήμα από NO:



Τα πειράματα εκπομπής χημειοφωταύγειας πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή πολλαπλής έγχυσης δείγματος σε ροή, εφοδιασμένη με ένα φωτοπολλαπλασιαστή υπεριώδους. Επιπλέον το σύστημα συνδέονταν με συσκευή παραγωγής NO, η οποία αποτελούνταν από έναν μικρού μεγέθους αντιδραστήρα, μία προαιρετική παγίδα, για την απομάκρυνση αέριων παραπροϊόντων και ένα δοχείο που περιείχε το διάλυμα του υποκαταστάτη PRB, για την παγίδευση του NO (Σχήμα 1α). Το σύστημα παρασκευής NO ήταν εφοδιασμένο με ροή αερίων, He ή Ar, η οποία χρησίμευε ως φορέας του NO κατά τη διάρκεια της αντίδρασης παραγωγής του. Η κυψελίδα ήταν ιδιοκατασκευής, κοχλιωτή και βρισκόταν ακριβώς μπροστά από το παράθυρο του φωτοπολλαπλασιαστή.

Η συσκευή παραγωγής NO, που βασίζονταν στην οξειδοαναγωγική αντίδραση KI/KNO_2 , αποτελούνταν από τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες με ελαστικά πώματα. Ο πρώτος σωλήνας (N1) είναι ο αντιδραστήρας παραγωγής NO, ο δεύτερος (A) είναι η παγίδα για την απομάκρυνση των αέριων παραπροϊόντων και ο τρίτος (P) είναι το δοχείο που περιέχει το υδατικό διάλυμα του υποκαταστάτη PRB. Σε κάθε ελαστικό πώμα είναι προσαρμοσμένες είσοδοι και έξοδοι αερίων. Επιπροσθέτως στους σωλήνες N1 και P υπάρχουν είσοδοι για προσαρμογή σύριγγας. Η σύριγγα στο σωλήνα N1 χρησιμοποιείται για την εισαγωγή του διαλύματος νιτωδών και η σύριγγα στο σωλήνα P για την απομάκρυνση αέρα και την δημιουργία διαφοράς πίεσης.. Το διάγραμμα της όλης συσκευής, δηλαδή FIA, κυψελίδα με το φωτοπολλαπλασιαστή, και η συσκευή παραγωγής NO, παρουσιάζεται στο σχήμα 1α.

(1b)



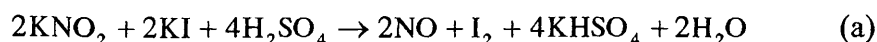
Η συσκευή παραγωγής NO, που βασίζονται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση Hg/KNO_2 , αποτελούνταν από τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες με ελαστικά πώματα. Ο πρώτος σωλήνας (N2) είναι ο αντιδραστήρας παραγωγής NO, ο δεύτερος (P1) και ο τρίτος (P2), είναι τα δοχεία που περιέχουν το υδατικό διάλυμα του υποκαταστάτη PRB. Σε κάθε ελαστικό πώμα είναι προσαρμοσμένες εισοδοί και έξοδοι αερίων και εισοδοί για προσαρμογή σύριγγας. Η σύριγγα που είναι προσαρμοσμένη στον αντιδραστήρα χρησιμοποιείται για την έγχυση θεικού οξέος, ενώ οι σύριγγες στους σωλήνες P1 και P2 είναι κλειστές και χρησιμοποιούνται για δειγματοληψία του περιεχομένου τους μετά το πέρας της αντίδρασης. Οι εισοδοί και οι έξοδοι των αερίων στους σωλήνες χρησιμοποιούνται για ροή He. Ο δειγματολήπτης είναι μία βαλβίδα με έξι εισόδους-εξόδους εφοδιασμένη με τριχοειδή σωλήνα χωρητικότητας 140μl. Το διάγραμμα της όλης συσκευής, παρουσιάζεται στο σχήμα 1β.

Το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού (S1000PC SECOMAN) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των νιτρικών και ο δονητής υπερήχων (Vibro CellTM Sonic and materials Inc., Danbury, CT, USA) για την απαερίωση των διαλυμάτων.

Διαδικασία

Παρασκευή NO

Η μέθοδος για την παρασκευή NO βασίζεται στις ακόλουθες χημικές αντιδράσεις [145]:



διήθημα αραιώνονταν μέχρι όγκου 100ml για τον προσδιορισμό των νιτρωδών που δεν αντέδρασαν.

Η ποσότητα των νιτρωδών που μετατράπηκαν σε NO υπολογιζόταν από την ποσότητα των νιτρωδών που παρέμειναν στο σωλήνα του αντιδραστήρα μετά το πέρας της αντίδρασης. Ο προσδιορισμός των νιτρωδών γίνονταν με τη μέθοδο diazo [146].

Ανίχνευση NO με χημειοφωταύγεια

Το υδατικό διάλυμα του συμπλόκου του NO με τους PRB υποκαταστάτες διήλθε μέσω των γραμμών μεταφοράς C3 (Σχήμα 1α) ή C4 (Σχήμα 1β) για να συναντήσει τη γραμμή μεταφοράς του ρυθμιστικού οξειδωτικού (C2) και παρακάτω να συναντήσει τη γραμμή μεταφοράς των αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας (C1) ακριβώς στην είσοδο της οπτικής κυψελίδας. Το σήμα χημειοφωταύγειας που δημιουργήθηκε μετρήθηκε και καταγράφηκε από τον καταγραφέα.

3.3.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Είναι γνωστό ότι η εκπομπή χημειοφωταύγειας που παράγεται από την αντίδραση λουμινόλης με H_2O_2 είναι ισχυρή σε pH μεταξύ 10-11, και μειώνεται με τη μείωση του pH, έως το pH 7 όπου στην πράξη δεν υπάρχει εκπομπή. Παρόλα αυτά η οξείδωση της λουμινόλης από H_2O_2 παρουσία HRP ή άλλων υποκαταστατών PRB δημιουργεί μία έντονη εκπομπή χημειοφωταύγειας στην περιοχή pH μεταξύ 6.0 και 7.5. Επιπροσθέτως, η ένταση είναι ακόμη μεγαλύτερη όταν το NO βρίσκεται μαζί με τον υποκαταστάτη PRB. Ωστόσο η εκπομπή χημειοφωταύγειας που υποβοηθείται από τους υποκαταστάτες PRB στην περιοχή του pH μεταξύ 6.0 και 7.5 και δίνει το υπόβαθρο της εκπομπής χημειοφωταύγειας που παράγεται από την παρουσία του NO, πρέπει να ελαχιστοποιηθεί για να επιτύχουμε ανίχνευση NO με μεγάλη ευαισθησία.

Προκαταρκτική εργασία για την βελτιστοποίηση της ανίχνευσης χημειοφωταύγειας με μειωμένη εκπομπή του υπόβαθρου.

Από προηγούμενη εργασία μας [79], για τον προσδιορισμό του NO που παράγεται από επίδραση NOS σε L-αργινίνη, βρέθηκε ότι η καθαρή εκπομπή χημειοφωταύγειας που προέρχεται από την οξείδωση της λουμινόλης από το υπεροξειδίο του υδρογόνου παρουσία NO, ήταν πιο έντονη: (α) στην περιοχή pH μεταξύ 7.0 και 7.4, (β) σε συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου μερικών mM και

όπου Y = απορρόφηση σε μονάδες A , και x = συγκέντρωση νιτρωδών σε M . Ο συντελεστής συσχέτισης ήταν $r = 0.9999$ και το όριο ανίχνευσιμότητας $1.0 \times 10^{-5} M$ βάσει του επιπέδου του θορύβου. Η ποσότητα νιτρωδών που παρέμειναν όπως υπολογίστηκε από τη σχέση (1) αφαιρέθηκε από την ολική αρχική ποσότητα νιτρωδών, και έτσι υπολογίστηκε η ποσότητα NO που παρήχθη. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στο πίνακα 1. Από τα δεδομένα του πίνακα 1 υπολογίζεται ο $\lg(CL\text{-σήμα})$ και παρίσταται γραφικά με τον $\lg(\text{moles } NO)$. Η γραμμική συμμεταβολή (regression treatment) των δεδομένων έδωσε τις βέλτιστες τιμές για τις παραμέτρους (best fit parameters) και την τυπική απόκλιση όπως φαίνεται στην εξίσωση (2)

$$Y = 5.42(\pm 0.02) + 1.030(\pm 0.005)X \quad (2)$$

όπου $Y = \lg(CL\text{-σήμα})$ σε mV και $X = \lg(\text{moles } NO)$ και συντελεστής συσχέτισης $r = 0.9999$

Από την καμπύλη βαθμονόμησης φαίνεται ότι η κλίση είναι ελάχιστα μικρότερη του 1.0 και επομένως η εξίσωση (2) μετατρέπεται κατά προσέγγιση στην εξίσωση (3).

$$y = a \cdot x \quad (3)$$

όπου $a = 10^{5.42}$, $y = mV$ σήματος χημειοφωταύγειας, $x = \text{ποσότητα } NO$ (σε mole) σε υδατικό διάλυμα Hb $2.0 \times 10^{-4} g l^{-1}$. Επομένως η ευαισθησία της μεθόδου είναι $2.63 \times 10^5 mV \cdot mole^{-1}$. Η ευαισθησία είναι πολύ υψηλή και έτσι η μέθοδος μπορεί και ανιχνεύει πολύ μικρές ποσότητες NO . Παρόλα αυτά στα πειράματά μας το όριο ανίχνευσιμότητας ήταν περιορισμένο εξαιτίας του αντιδραστήρα παραγωγής NO ο οποίος δεν είναι ακριβής για μικρές ποσότητες KNO_2 . Περαιτέρω, το τυπικό σφάλμα που λήφθηκε από τη γραμμική συμμεταβολή (regression) των δεδομένων για την ευαισθησία δίνει μία πολύ καλή συσχέτιση και αποδεικνύει την ακρίβεια του υπολογισμού των παραμέτρων. Η σχετική τυπική απόκλιση (% rsd) σε κάθε δεδομένο σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης, όπως λήφθηκε από τα τρεις μετρήσεις, βρέθηκε ότι είναι 8.0 για την περιοχή μεταξύ 2×10^{-5} και 5×10^{-4} mole NO και περίπου 1.0 για την περιοχή μεταξύ 1.0×10^{-3} και 1.0×10^{-2} mole NO . Η σχετικά υψηλή τιμή της τυπικής απόκλισης που λήφθηκε για τις μικρές συγκεντρώσεις, οφείλεται κυρίως στην διεργασία παραγωγής NO στον αντιδραστήρα και κατά ένα μικρότερο ποσοστό στη δυνατότητα του NO να παγιδευτεί στο σχετικά μικρό όγκο (4.0 ml) του διαλύματος Hb . Η καμπύλη βαθμονόμησης στις συνθήκες που χρησιμοποιήσαμε ισχύει για συγκεντρώσεις μεταξύ

συγκεντρώσεις. Το σήμα χημειοφωταύγειας γίνεται μέγιστο όταν η συγκέντρωση KNO_2 πάρει την τιμή 0.1M. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι: (α) Το KI δεν βρίσκεται πλέον σε περίσσεια, (β) Ο υποκαταστάτης PRB έχει κορεστεί με NO, ή (γ) το σήμα δεν μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω σε ύψος.

Επίδραση των υπολοίπων αντιδραστηρίων

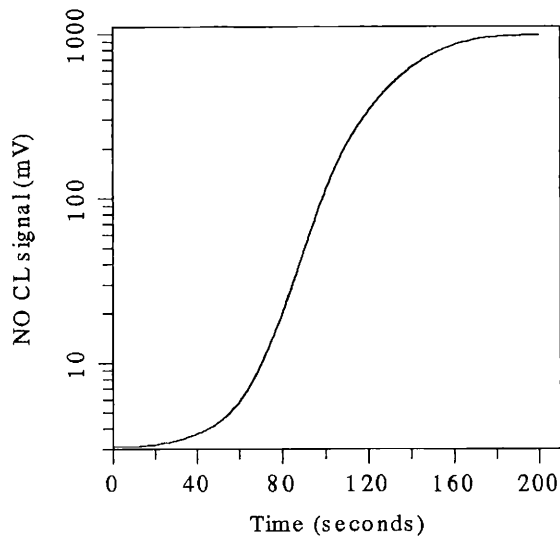
Στο αέριο NO είναι πιθανόν να υπάρχουν προσμείξεις, οι οποίες μπορεί να οφείλονται είτε στη μέθοδο παρασκευής, είτε στη διαλυτοποίηση σε υδατικά διαλύματα αερίων της ατμόσφαιρας. Τέτοιες προσμείξεις μπορεί να είναι O_2 , NO_2 , I_2 . Το NO_2 μπορεί να εισέλθει στο όξινο υδατικό διάλυμα και με επίδραση O_2 να δώσει NO_2^- , NO_3^- . Επίσης το I_2 μπορεί να αναχθεί σε I^- .

Επίδραση της SOD [147]

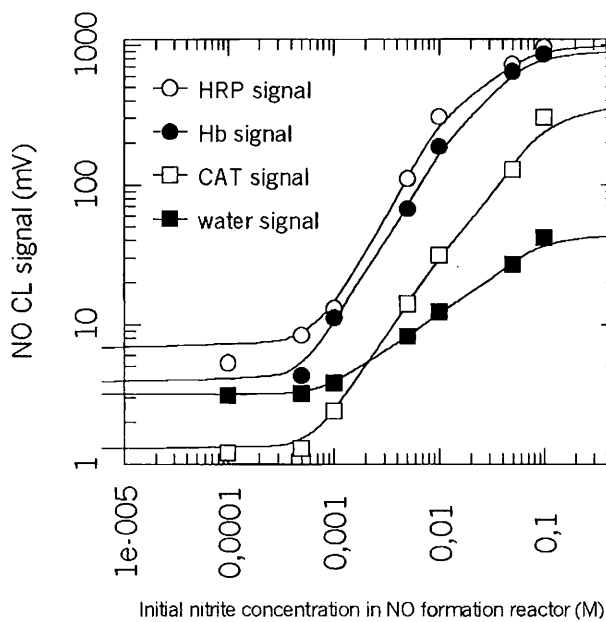
Η SOD είναι το ένζυμο που καταλύει την μετατροπή του $\bullet\text{O}_2^-$ σύμφωνα με την αντίδραση (δ): $2 \bullet\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ (d)

Η επίδραση της SOD στο σήμα χημειοφωταύγειας που δημιουργείται από την αντίδραση H_2O_2 με NO μέσω της οξειδωσης της λουμινόλης σε $\text{pH}=7.10$ δίνεται στο Σχήμα 4. Είναι φανερό ότι η προσθήκη SOD (500 Uml^{-1}) μειώνει το σήμα χημειοφωταύγειας, πράγμα που δηλώνει ότι (α) είτε η SOD καταστρέφει τα χημειοφωταυγάζοντα NO στο ρεύμα της HRP, είτε (β) η SOD την αντίδραση λουμινόλης- H_2O_2 -NO, απομακρύνοντας το $\bullet\text{O}_2^-$.

Σχήμα 2 Ίχνος παρακολούθησης σχηματισμού του NO μέσω της αντίδρασης του KNO_2 με KJ χρησιμοποιώντας την παραπάνω συσκευή.



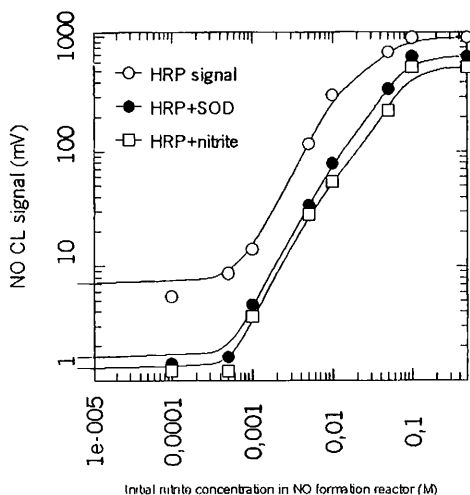
Σχήμα 3 CL σήμα σύμπλοκης ένωσης NO-PRB έναντι συγκέντρωσης νιτρωδών. Το NO λαμβάνεται μέσω της αντίδρασης του KNO_2 με KJ και παγίδευσή του σε διάφορα αντιδραστήρια PRB.



Επίδραση του O_2 , NO_2^- , NO_3^-

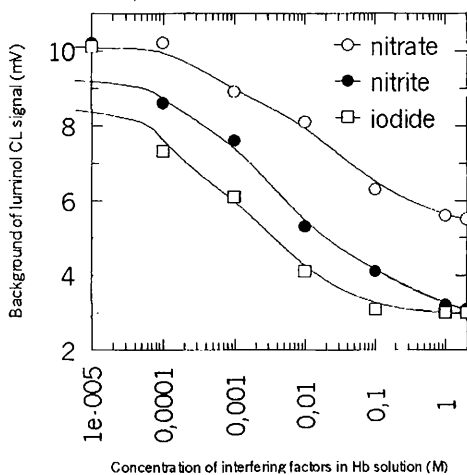
- Εκτός από το NO, ανώτερα αέρια, NO_s, ή άλλα πιθανά προϊόντα (π.χ. νιτρώδη, νιτρικά, I₂ και I⁻) τα οποία παράχθηκαν από παράπλευρες αντιδράσεις στο σύστημα παραγωγής NO (N1 ή N2), απορροφήθηκαν από διάλυμα KOH.

Σχήμα 4 Επίδραση του SOD και νιτρωδών επί του CL-σήματος του συμπλόκου NO-HRP. Το NO λαμβάνεται μέσω της αντίδρασης του KNO₂ με KJ χρησιμοποιώντας διαφορετικές ποσότητες KNO₂.



Σχήμα 5. Επίδραση της συγκέντρωσης των παρεμποδιστών στο υπόβαθρο του συστήματος λουμινόλης CL

Συνθήκες: Γραμμή μεταφοράς C1 ([Luminol] = 1.0x10⁻⁵ M σε Universal buffer 14.30 mM σε pH = 7.10); Γραμμή μεταφοράς C2 ([H₂O₂] = 2.0x10⁻³ M σε Universal buffer 1.43 mM σε pH = 4.10); Γραμμή μεταφοράς C3 ([Hb] = 2.0x10⁻⁴ g.l⁻¹ σε νερό).



3.4.ΜΕΜΒΡΑΝΟΕΙΔΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΠΤΗΣ ΓΙΑ ΕΛΕΥΘΕΡΟ-ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΝΟ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΣΥΣΚΕΥΗ ΠΟΛΥΚΑΝΑΛΙΚΗΣ ΡΟΗΣ/ΧΦ-ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

3.4.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βιολογικά υγρά έχουν πολλά συστατικά που μπορούν να επιδράσουν είτε θετικά είτε αρνητικά στην ΧΦ-εκπομπή της λουμινόλης · τέτοια συστατικά μπορεί να είναι σωματίδια που επιδρούν στα ΧΦ-αντιδραστήρια (αναγωγικές οργανικές ενώσεις, αναγωγικά ανόργανα συστατικά), ή καταλύουν την ΧΦ-αντίδραση (Hb, HRP, Fe(II)), ή παγιδεύουν το ΝΟ, ή δίνουν από μόνα τους ΧΦ-εκπομπή με το σύστημα λουμινόλης όπως διάφορες σωματιδιακές μορφές του ΝΟ_x, ή παρέχουν διαφόρου άλλου τύπου αλληλεπιδράσεις που μεταβάλλουν την ΧΦ-εκπομπή με μεταβολή της κβαντικής απόδοσης . Η απομάκρυνση των ενώσεων αυτών που επιδρούν σημαντικά στην ΧΦ-εκπομπή του ΝΟ πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπ' όψιν για τον προσδιορισμό του ΝΟ με την συσκευή FIA/ ΧΦ-ανίχνευσης σε δείγματα βιολογικών υγρών [148-152].

Μια από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση ενώσεων από πολυσυστατικά δείγματα είναι και η μοριακή διήθηση των μορίων μέσω μεμβρανών διαπήδησης. Πολλοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει τέτοιες μεμβράνες για διάφορες εφαρμογές όπως την κατασκευή αμπερομετρικών αισθητήρων, την κατασκευή εκλεκτικών ηλεκτροδίων , σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς κ.ο.κ.

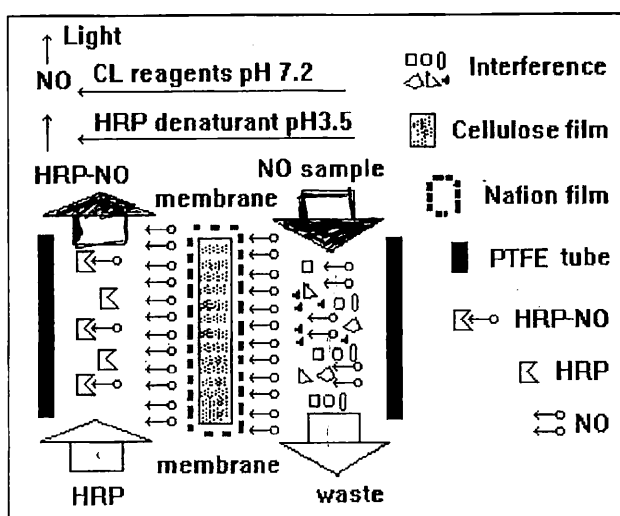
Στην παρούσα εργασία γίνεται αξιολόγηση της ικανότητας διάφορων τύπων μεμβρανών να αποκλείουν ή να μπλοκάρουν την διέλευση ενώσεων με διαφορετικό μοριακό βάρος που βρίσκονται στα βιολογικά υγρά σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις εξετάζοντας την μεταβολή του ΧΦ-σήματος του ΝΟ υπό βέλτιστες συνθήκες, στη συσκευή FIA/ΧΦ-ανίχνευσης που αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκε μεμβράνη δειγματοληψίας και προσαρτηθηκε στην συσκευή ενώ μεμβράνες διαφορετικής σύστασης, πάχους, και με πόρους αποκλεισμού ενώσεων διαφορετικών μοριακών βαρών μελετήθηκαν με τεχνητά δείγματα που περιείχαν ενώσεις με ποικίλες χημικές και φυσικές ιδιότητες. Για να επιτευχθεί εύκολη διάχυση του ΝΟ και υψηλή εκλεκτικότητα προς διάφορες παρεμποδίζουσες ενώσεις που βρίσκονται σε βιολογικά υγρά όπως το αίμα παρασκευάστηκε μια σύνθετη μεμβράνη από οξεική κυτταρίνη επικαλυφθείσα με στρώμα από Nafion υλικό [153,154].

εκπομπή CL ελήφθη με την βοήθεια μιας FI-διάταξης, που είναι εξοπλισμένη με έναν φωτοπολλαπλασιαστή (PM) ευαίσθητο σε UV ακτινοβολία και ένα σχετικό ηλεκτρονικό σύστημα. Η κυψελίδα είναι ένα χειροποίητος γυάλινος κοχλιωτός σωλήνας, που τοποθετείται ακριβώς μπροστά από το παράθυρο του σωλήνα του φωτοπολλαπλασιαστή. Η λειτουργία της συσκευής προγραμματίστηκε χρονικά όπως φαίνεται στο σχήμα 1b με (α) την χρονική περίοδο απαέρωσης, όπου όλο το διάλυμα απαερώνεται με υπερήχους και έπειτα με φυσαλίδες αργού, (β) μια μικρή χρονική περίοδο για να ληφθεί το υπόβαθρο της εκπομπής CL απουσία NO, (γ) μια χρονική περίοδος δειγματοληψίας NO, όπου 1 mmole NO διοχετεύτηκε διαμέσου του υδατικού διαλύματος της παρεμποδίζουσας ένωσης στη συσκευή δειγματοληψίας με μεμβράνη. Η ποσότητα που διέφυγε την συμπλοκοποίηση με HRP, συλλέχτηκε με ένα διάλυμα Hb στην έξοδο, και (δ) η χρονική περίοδος παρακολούθησης εκπομπής CL, όπου το NO που παγιδεύεται με HRP οδηγείται στο σύστημα FI/CL-ανίχνευσης. Το ποσοστό NO που πέρασε μέσω της μεμβράνης μετρήθηκε με την αφαίρεση των mmoles που διέφυγαν στο Hb διάλυμα από 1 mmole.

Σχήμα 1 (α) Διάταξη FI/ανίχνευσης χημειοφωταύγειας εφοδιασμένη με αντιδραστήρα παραγωγής NO και συσκευή δειγματοληψίας από perlm- εκλεκτική μεμβράνη και (β) τρόπος λειτουργίας

Συντομεύσεις: A=Σωλήνας απορρόφησης NO; C=κοχλιωτή κυψελίδα; C1=γραμμή μεταφοράς CL αντιδραστηρίων; C2 =Glycine-HCl ρυθμιστικό διάλυμα; C3=HRP διάλυμα; M=μίκτης; N=αντιδραστήρας παραγωγής NO; P=σωλήνας καθαρισμού NO; PM =φωτοπολλαπλασιαστής (THORN EMI 9789 B); PP=περισταλτική αντλία; RD=καταγραφέας; S=επιλογέας NO; S1=σύριγγα για έγχυση δείγματος, S2=σύριγγα για έγχυση KNO₂; S3=σύριγγα για δειγματοληψία Hb-NO; V=εξάπορτη βαλβίδα; W1=απόβλητο διάλυμα; W2 =απόβλητο αέριο.

Σχήμα 2 Διάγραμμα της συσκευής δειγματοληψίας από perm-εκλεκτική μεμβράνη



ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Προετοιμασία των perm-εκλεκτικών μεμβρανών για NO. Η κατασκευή της perm-εκλεκτικής μεμβράνης για NO είναι πολύ σημαντική, δεδομένου ότι εγγυάται την λήψη της ελεύθερης παρεμποδισών ανίχνευσης CL. Εκτός από την perm-εκλεκτικότητα ως προς το NO, άλλες παράμετροι, όπως μια ικανοποιητική ροή για το NO (υψηλή ευαισθησία) και ο γρήγορος χρόνος απόκρισης λήφθηκαν υπόψη επίσης για την επιλογή της επιθυμητής ταινίας. Από την προκαταρκτική ερευνητική εργασία διαπιστώθηκε ότι η διπλή ταινία οξικής κυτταρίνης που ενσωματώνει επένδυση Nafion, ικανοποίησε τα ανωτέρω πρότυπα.

Η προτεινόμενη ταινία παρέχει έναν μικτό (αποκλεισμό και πολικότητα μεγέθους) έλεγχο του μηχανισμού μεταφοράς, εξασφαλίζοντας κατά συνέπεια έναν ευαίσθητο, γρήγορο και ελεύθερο από παρεμποδίσεις σύστημα.

Παρασκευή της ταινίας οξικής κυτταρίνης: Αυτή η ταινία έγινε στο εργαστήριό μας με την ακόλουθη μέθοδο: 4 g της οξικής κυτταρίνης και 4 mg PVA διαλύθηκαν από ένα μίγμα ακετόνης και κυκλοεξανόνης με αναλογία όγκων 3:2. Το μίγμα αναδεύτηκε όλη τη νύχτα και 2 ml του καθαρού διαλύματος πολυμερούς επιστρώθηκε στην επιφάνεια ενός καθαρού-ομαλού γυαλιού, με την βοήθεια ενός υγρού film applicator (URAI, Ιταλία), χρησιμοποιώντας την πλευρά Νο. 8 που αντιστοιχεί σε ένα πάχος υγρής ταινίας 200 μm. Ο διαλύτης αφέθηκε να στεγνώσει στον αέρα όλη νύχτα και η ξηρά μεμβράνη (πάχος 20 mm) απομονώθηκε με τη βύθιση της επιφάνειας του γυαλιού σε ένα λουτρό απεσταγμένου νερού. Μετά την ξήρανση η μεμβράνη κόπηκε

NO από N οδηγήθηκε στο σωλήνα A, που περιέχει διάλυμα 0,1 KOH, προκειμένου να αφαιρεθούν τα αέρια παραπροϊόντα και οι ακαθαρσίες. Μετά πέρασε μέσω του υδατικού διαλύματος του δείγματος στη συσκευή δειγματοληψίας μεμβράνης.

3. 4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βελτιστοποίηση των συνθηκών εργασίας.

Οι ακόλουθες συνθήκες εργασίας προσαρμόστηκαν με μια μικρή τροποποίηση, βασισμένη σε προηγούμενη εργασία μας [81]. C1 γραμμή ροής: 1×10^{-5} M και Luminol και 2×10^{-3} M H_2O_2 σε 100 mM Tris-HCl, pH= 7,2. C2 γραμμή ροής: 10 mM γλυκίνη- HCl, pH= 3,5. C3 γραμμή ροής $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ HRP σε 1 mM Tris HCl, pH= 7.2 (Fig. 1). Η γραμμή ροής C3 χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να παγιδευτεί το NO που πέρασε μέσω της NO περμ-εκλεκτικής μεμβράνης. Η γραμμή ροής C2 χρησιμοποιήθηκε για να μετουσιώσει το HRP στο όξινο διάλυμά του προκειμένου να απελευθερωθεί το NO από την σύμπλοκη ένωση HRP-NO. Επιπλέον, μειώνει το υπόβαθρο CL, που παράγεται από το σύστημα HRP-Luminol- H_2O_2 . Η γραμμή ροής C1 περιέχει τα αντιδραστήρια CL. Οι ανωτέρω συνθήκες εργασίας βελτιστοποιήθηκαν, προκειμένου να υπάρξουν οι βέλτιστες συνθήκες για το σύστημα λουμινόλης- H_2O_2 NO και η χαμηλότερη γραμμή βάσης από το σύστημα λουμινόλης- H_2O_2 -HRP (3.6 mV). Δεδομένου ότι το σύστημά μας εμφανίζει μια μέγιστη απόκριση εντός της περιοχής κατά δέκα φορές pH= 7,0-7,4 το τελικό pH διευθετήθηκε σε 7,2, χρησιμοποιώντας υψηλότερη ρυθμιστική ικανότητα στη γραμμή ροής C1, από αυτή της γραμμής ροής C2. Όταν οι γραμμές ροής C1 και C2 αναμίχθηκαν μαζί για την αντίδραση NO-CL, το τελικό pH διατηρήθηκε σχεδόν σταθερό. Στη γραμμή ροής C3, η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος tris-HCl διατηρήθηκε χαμηλή (1 mM), προκειμένου να διατηρηθεί το pH σταθερό όταν έρχεται σε επαφή με το διάλυμα δείγματος μέσω της μεμβράνης.

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η οξείδωση του NO από το οξυγόνο, τα διαλύματα στις γραμμές ροής (C1, C2 και C3) απαερώθηκαν με επεξεργασία με υπέρηχους για 15 min σε 4°C ακολουθούμενη για 30 min από διαβίβαση καθαρού αργού που περνά προηγουμένως μέσω 0,01 M KOH και 0,1 M διάλυμα πυρογαλλόλης για να απομακρύνουν τα ίχνη οξυγόνου. Επιπλέον, για να λάβουμε το % NO που παγιδεύεται στην HRP από 1 mmole που διοχετεύτηκε διαμέσου του υδατικού

ταινία Ca-Nafion. Τα μοριακά βάρη των δειγμάτων που εξετάστηκαν σε σχέση με το MWCO των πόρων της μεμβράνης, ταξινομούνται σε τρεις κλάσεις.

Ιόντα και μόρια με MW < 150 (κλάση A):

Περνούν μέσω όλων των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία εκτός από τα ανιόντα που δεν μπορούν να περάσουν μέσω της μεμβράνης Nafion-CA. Από τον πίνακα γίνεται αντιληπτό οι χλωριούχες ενώσεις των αλκαλιμετάλλων όπως NaCl, KCl και οι ασθενείς βάσεις ή τα οξέα όπως η ουρία, αμμωνία, CO₂ είναι ενώσεις χωρίς σημαντική επίδραση στην CL – εκπομπή του NO. Τα κατιόντα με ανασταλτική δράση όπως Mg⁺², Ca⁺² ή με καταλυτική δράση στην CL – εκπομπή, όπως Fe⁺³, έχουν μια μικρή επίδραση. Μικρή επίδραση έχουν τα ανιόντα που είναι μεταβολίτες του NO όπως NO₃⁻, εκείνα που μπορούν να οξειδωθούν από τα CL-αντιδραστήρια όπως το Γ. Τέλος, οι μεταβολίτες του NO με μεγάλη συνεισφορά στη NO CL-εκπομπή NO₂⁻ ή μόρια με αναγωγικές ιδιότητες όπως το BME έχουν μέτρια επίδραση στην NO εκπομπή χημειοφωταύγειας (CL-εκπομπή).

Εντούτοις η επίδραση ελαχιστοποιείται με τη μεμβράνη CA για όλες τις παρεμποδίζουσες ενώσεις εκτός από τα νιτρώδη και το BME. Η επίδραση σχεδόν μηδενίζεται για τα νιτρώδη με τη χρησιμοποίηση της μεμβράνης Ca-Nafion.

Οργανικά μόρια με 3500>MW>150 (κλάση B).

Περνούν μέσω της μεμβράνης διαπίδυσης MWCO<3500, αλλά όχι μέσω της μεμβράνης CA με MWCO<150. Από τον πίνακα 1 φαίνεται ότι η επίδραση των ενώσεων με όξινες ή βασικές αναγωγικές ή συμπλεκτικές ιδιότητες γενικά, όπως το ουρικό οξύ, η ντοπαμίνη, η κυστεΐνη, η γλυκόζη, το HEPES και το EDTA, είναι αμελητέα στην NO CL-εκπομπή όταν αυτές εισαχθούν στο CL-σύστημα. Η επίδρασή τους μηδενίζεται όταν η μεμβράνη εμποδίζει την είσοδό τους στο διάλυμα HRP-παγίδευσης. Οι ενώσεις με αναγωγικές ιδιότητες που συνήθως ενεργούν ως αναστολείς στις ενζυματικές αντιδράσεις, όπως το ασκορβικό οξύ, NADPH, tetrahydrobiopterin (H4BT), dithiothreitol (DTT) όταν περνούν μέσω της μεμβράνης στο HRP-διάλυμα έχουν μια μέση ή ισχυρή αρνητική επίδραση στην NO CL-εκπομπή. Η παρουσία τους στο CL-σύστημα αντίδρασης ενεργοποιεί τις διεργασίες αντίδρασης που καταναλώνουν το οξειδωτικό αντιδραστήριο. Η επίδρασή τους γίνεται θετική όταν η μεμβράνη παρεμποδίζει την είσοδό τους στο HRP-διάλυμα παγίδευσης. Ίσως η παρουσία τους στο δείγμα εμποδίζει την οξείδωση του NO από

Πίνακας 1. Επίδραση διαφόρων ενώσεων στην εκπομπή χημειοφωταύγειας (CL) που παράγεται κατά την οξείδωση της Λουμινόλης με H₂O₂ παρουσία HRP-NO.

Interfering compound	Formula weight (Dalton)	Concentration	Relative response value (%)		
			Dialysis tubing MWCO 3.500 60μm thickness	CA film MWCO <150 20μm thickness	Nafion-CA film MWCO <150 <30μm thickness
Inorganic ions and salts					
Na ⁺ (Cl ⁻)	23	0.145M	104 ± 3	103 ± 3	102 ± 2
K ⁺ (Cl ⁻)	39	5.0mM	95 ± 4	98 ± 3	100 ± 2
Mg ²⁺ (Cl ⁻)	24	0.95mM	122 ± 6	114 ± 4	108 ± 3
Ca ²⁺ (Cl ⁻)	40	2.6mM	113 ± 4	109 ± 3	105 ± 3
Fe ³⁺ (Cl ⁻)	56	28.6μM	107 ± 1	104 ± 2	103 ± 1
(K ⁺)NO ₃ ⁻	62	0.1mM	116 ± 3	113 ± 2	101 ± 2
(K ⁺)NO ₂ ⁻	46	0.1mM	159 ± 4	154 ± 4	102 ± 1
(K ⁺)I ⁻	127	0.1mM	82 ± 6	89 ± 3	99 ± 2
Organic small molecular weight materials					
Urea	60	9.4mM	104 ± 5	101 ± 3	98 ± 1
Uric acid	168	0.458mM	90 ± 4	98 ± 2	98 ± 3
Cysteine	176	0.1mM	112 ± 5	102 ± 1	101 ± 1
Glucose	180	5.8mM	110 ± 3	101 ± 2	101 ± 2
Dopamine	190	0.1mM	136 ± 4	104 ± 3	103 ± 2
HEPES	238	0.1mM, pH7.2	114 ± 2	102 ± 3	99 ± 2
EDTA	292	0.1mM, pH7.2	89 ± 3	98 ± 4	100 ± 3
Basic and acidic molecules					
NH ₃	17	0.1mM	104 ± 3	103 ± 2	103 ± 2
CO ₂	44	0.1mM	97 ± 5	96 ± 3	96 ± 4
Proteins and enzymes					
Hb	>40,000	200gl ⁻¹	76 ± 5	74 ± 6	73 ± 5
HRP	>40,000	0.2mg ⁻¹	89 ± 5	87 ± 3	87 ± 1
CAT	>40,000	0.2mg ⁻¹	91 ± 4	87 ± 2	85 ± 1
SOD	>40,000	0.2mg ⁻¹	117 ± 6	116 ± 6	116 ± 5
BSA	>40,000	0.2mg ⁻¹	98 ± 4	98 ± 1	98 ± 1
Reduction compounds					
BME	78	0.1mM	76 ± 2	80 ± 2	87 ± 3
DTT	154	0.1mM	45 ± 2	119 ± 3	113 ± 3
Ascorbate	176	0.1mM	5 ± 1	134 ± 5	133 ± 2
H ₄ BP	314	0.1mM	3 ± 1	152 ± 7	150 ± 7
NADPH	833	0.1mM	4 ± 1	189 ± 9	187 ± 6

Παρεμπόδιση από ενώσεις που υπάρχουν στο αίμα.

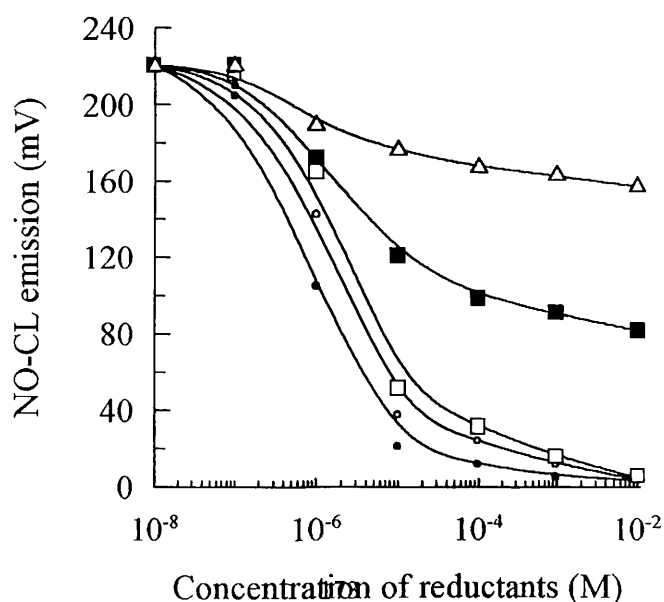
Εκτός από την ένωση BME όλες οι άλλες ενώσεις της κατηγορίας A είναι συστατικά του αίματος και όπως αναφέρεται ανωτέρω, η επίδραση αυτών των ενώσεων είναι ασήμαντη όταν χρησιμοποιείται η μεμβράνη CA-Nafion (Πίνακας 1). Επομένως η συνεισφορά από τις ενώσεις της κατηγορίας A στη συνολική επίδραση των συστατικών του αίματος στην CL-εκπομπή υποτίθεται ότι είναι αμελητέα. Τα συστατικά του αίματος από τις ενώσεις της κατηγορίας B έχουν αμελητέα επίδραση

μπορούν να περάσουν δια μέσω αυτής, ανακτώντας κατά συνέπεια την αρχική απόκριση του συστήματος. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα συγκέντρωσης οξυγόνου ή άλλων οξειδωτικών εμποδίζοντας την οξείδωση του NO. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα έναν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής του NO και μια υψηλότερη απόκριση NO-CL. Προκειμένου να βελτιωθεί η απόκριση του CL-συστήματος, διαφορετικές συγκεντρώσεις των αναγωγικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των NADPH, H4BP, ασκορβικό οξύ, DTT χρησιμοποιήθηκαν ως πρόσθετες ουσίες στο διάλυμα του δείγματος.

Πίνακας 2. NO CL εκπομπή με την παρουσία και την απουσία NADPH στο δείγμα.

Blood specimen (No.)	Response time (seconds)		NO-CL emission (mV)	
	WithoutNA	With	Without	With
	DPH	NADPH	NADPH	NADPH
1	13	12	220	415
2	15	13	230	434
3	12	11	217	410
4	14	12	209	395
5	11	10	215	406
6	11	9	228	430

Σχήμα 3 NO CL εκπομπή έναντι συγκέντρωσης αναγωγικών αντιδραστηρίων χρησιμοποιώντας τον σωλήνα διαπίδυσης (DT1) στην συσκευή δειγματοληψίας με μεμβράνη. NADPH (○), H4BP (●), DTT (■), BME (Δ) και ασορβικό οξύ (□).



Η επιλογή της NO περι-εκλεκτικής μεμβράνης

Η συμπεριφορά του συστήματος από την άποψη της ευαισθησίας (NO-CL εκπομπή) και του χρόνου απόκρισης (το χρονικό διάστημα μέχρι την επίτευξη μέγιστης απόκρισης αξιολογήθηκε με τη χρησιμοποίηση μεμβρανών διαπίδωσης με MWCO 100 και 500 dalton μη-ενισχυμένα βουλκανισμένα mat/mat φύλλα σιλικόνης με πάχος 30, 50 και 60mm και ταινία CA-Nafion με πάχος 30mm. Η ταινία CA-Nafion έδωσε την υψηλότερη NO-CL εκπομπή και τον μικρότερο χρόνο απόκρισης. Τα φύλλα πυριτίου χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς ως εκλεκτικές μεμβράνες του NO από άλλους ερευνητές. Εντούτοις, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 3, η ταινία CA-Nafion φαίνεται να είναι καταλληλότερη. Οι γραφικές παραστάσεις NO-CL εκπομπής για την περίπτωση της CA-Nafion μεμβράνης ή του σωλήνα διαπίδωσης 1 (DT1, MWCO 500 dalton) φαίνονται στο Σχήμα 5. Η μικρή απόκριση που παρατηρήθηκε στην περίπτωση του DT1 αποδίδεται στη διαπερατότητα της μεμβράνης από μερικά αναγωγικά είδη που βρίσκονται στο αίμα και τα οποία προκαλούν την αναγωγή του H₂O₂ στη C1 γραμμή ροής.

Πίνακας 3. NO CL εκπομπή χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεμβράνες.

Selective membranes	Membrane properties			Response	NO-CL
	Thickness (μm)	MWCO Dalton	Baseline (mV)	Time (seconds)	emission (mV)
Dialysis tubing 1 (DT1)	65	500	3.2	31	15
Dialysis tubing 2 (DT2)	80	100	3.7	23	142
Silicone sheets 1 (SS1)	30	-	5.3	17	192
Silicone sheets 2 (SS2)	50	-	5.1	21	165
Silicone sheets 3 (SS3)	60	-	4.9	26	134
CA-Nafion film (CN)	30	<150	3.6	13	220

Σταθερότητα του NO αισθητήρα

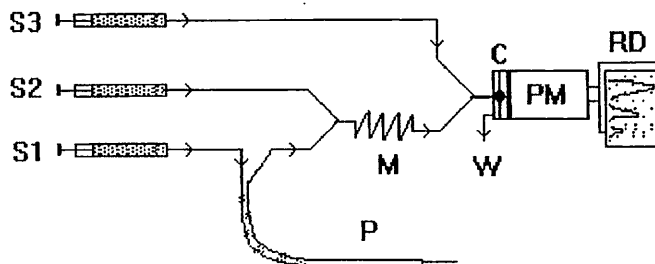
Η σταθερότητα αυτού του αισθητήρα εξαρτάται συνήθως από το λέρωμα της εκλεκτικής μεμβράνης. Το σύστημα διατηρεί σχεδόν 85% της αρχικής ενεργότητάς του μετά από τουλάχιστον 100 συνεχείς μετρήσεις. Η σταθερότητα αποθήκευσης της μεμβράνης Nafion-CA αυξάνεται εντυπωσιακά όταν φυλάσσεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,01M PBS (pH =7.0) σε 4°C.

Το Tris (τρις-υδροξυμεθυλ) αμινομεθάνιο), (Merck), HEPES V-[2-Υδροξυαιθυλ-πιπεραζίνη-N-[2-Αιθανοσουλφονικό οξύ] και EDTA αιθυλενο (διάμινοτετραοξικό οξύ) (SIGMA) χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η οξική κυτταρίνη (SIGMA), το οξικό πολυβινύλιο (PVA 166.000 daltons) και το Nafion (5% σε αλειφατική αλκοόλη) και τα δύο από την Aldrich, χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του δειγματοληπτικού αισθητήρα. Σαν in vivo δότες NO χρησιμοποιήσαμε s-νιτροζοθειόλες που παρασκευάστηκαν από κυστεΐνη (SNC) (SIGMA) και NaNO_2 (Merck), νιτροπρωσσικό νάτριο (SNP, $\text{Na}_2[\text{F}_2(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)(Merck), και Viagra σε φαρμακευτική μορφή (Pfizer). Η ακετυλοχολίνη (Ach), η 5,6,7,8-τετραυδροπτερίνη (H4BP), η διθειοθειτρόλη (DTT), το ATP, η L-αργινίνη (Arg) και η κυστεΐνη αγοράστηκαν από τη SIGMA. Το ασκορβικό οξύ (AA), το NADPH και η πυρογαλλόλη (PG) αγοράστηκαν από την Merck. Το αέριο αργό και το αέριο NO αγοράστηκαν από την Air-Liquide Ltd, Γαλλία. Το δις-απεσταγμένο νερό χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις εργασίες.

Προετοιμασία διαλυμάτων: Δότες NO: Τα διαλύματα των SNC, SNP και νιτροδών (NaNO_2) παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 68mM με διαλυτοποίηση σε απεσταγμένο νερό. Όγκοι (0, 10, 20, 40, 80, 160μl των ανωτέρω διαλυμάτων αραιώθηκαν μέχρι τελικό όγκο 160μl με απεσταγμένο νερό. Περισσότερες λεπτομέρειες δείχνονται στο Σχήμα 4. Το Viagra αγοράστηκε από την φαρμακευτική αγορά. Κατόπιν μια ταμπλέτα, που είναι η δόση που χρησιμοποιεί ένα ενήλικο άτομο, διαλύθηκε σε 2ml απεσταγμένο νερό και διηθήθηκε αμέσως. Μια άλλη ομάδα, όταν εγχέουμε Viagra, ή 1mg Hb, που διαλύθηκε σε 0,1ml απεσταγμένο νερό εγχύθηκε προηγουμένως. Η μεταβολή του NO που εμφανίζεται μετά από έγχυση των φαρμάκων φαίνεται στο Σχήμα 5. Τα διαλύματα Ach και ATP παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 0.01M με απεσταγμένο νερό και εγχύθηκαν σε διαφορετικές ποσότητες. Το διάλυμα BK παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 0.1mM και το διάλυμα SOD παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση $10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Περισσότερες λεπτομέρειες φαίνονται στο Σχήμα 6. Διαλύματα των συμπαράγοντων του NO συμπεριλαμβανομένων των Arg, NADPH, H4BP και $\text{Ca}^{+2}(\text{CaCl}_2)$, που θεωρούνται συμπαράγοντες της συνθάσης του NO διαλύματα των αναγωγικών αντιδραστηρίων όπως το DTT, το PG και το AA παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 0.01M.

Σχήμα 1 Διάταξη για in vivo παρακολούθηση του NO

Συντομεύσεις: C=κοχλιωτή κυψελίδα; M=μίκτης; P=σωλήνας μικροδιαπίδυσης; PM=φωτοπολλαπλασιαστής; RD=καταγραφέας; S1=σύριγγα για τα αντιδραστήρια CL, S2 =σύριγγα για το όξινο διάλυμα EDTA; S3 =σύριγγα για τη γραμμή μεταφοράς HEPES-HRP, W = απόβλητο.



Παρασκευή δειγματοληπτικών αισθητήρων για το NO και χαρακτηρισμός

Οι δειγματοληπτικοί αισθητήρες διαπίδυσης (από την BAS) τροποποιήθηκαν και κατασκευάστηκαν στο εργαστήριό μας με τρεις στοιβάδες μεμβρανών, οι οποίες δεν παρεμποδίζουν το NO. Η εσωτερική μεμβράνη αποτελείται από πολυακρυλονιτρίλιο με MWCO 30.000 daltons, ώστε να επιτυγχάνεται αρκετή μηχανική αντοχή. Στη συνέχεια καλύφθηκε με μια ταινία οξικής κυτταρίνης πάχους 20μm. Στο σύστημα παρακολούθησής μας το NO ελήφθη από το αίμα ή τον ιστό εγκεφάλου μέσω ενός δειγματοληπτικού αισθητήρα για την ανίχνευση CL. Γενικά, ο δειγματοληπτικός αισθητήρας έχει MWCO 100 daltons με επικάλυψη συνεχή από την εκλεκτική μεμβράνη Nafion. Όλα τα υλικά, των οποίων το MW (μοριακό βάρος) είναι μεγαλύτερο από 100 παρέμειναν έξω από τη μεμβράνη χωρίς να παρεμποδίζουν ειδικά το ασκορβικό οξύ, η κυστεΐνη, η ντοπαμίνη κ.λ.π. Στο αίμα, οποιαδήποτε παρεμπόδιση από ανιόντα, ειδικά από νιτρικά, αίρεται από το Nafion. Η σημαντικότερη παρεμπόδιση για το σύστημά μας είναι τα μικρά αέρια, όπως το O₂, το CO₂ και το pH.

Η μεταβολή του pH που συμβαίνει από τη διάχυση του CO₂ από τις βιολογικές πηγές διατηρείται σταθερή από το ρυθμιστικό διάλυμα του ρεύματος S3. Το σήμα ίσως επηρεάζεται από το O₂, δεδομένου ότι αυτό μπορεί επίσης να συζευχθεί με την HRP ανταγωνιστικά με το NO. Επιπλέον, το NO μπορεί ευκολότερα να οξειδωθεί παρουσία του O₂. Σ' αυτήν την περίπτωση, σχεδιάσαμε ένα άλλο πείραμα μέσω του

κορεσμένο με O₂. Η αντλία ταχύτητας ροής 2ml.min⁻¹ τέθηκε σε λειτουργία και λήφθηκε μια γραμμή βάσης. Μετά ο δειγματοληπτικός αισθητήρας πρώτα εμβαπτίστηκε σε κυστεΐνη 0.1M για την απόκριση CL. Εάν η απόκριση CL είναι μικρότερη από τη γραμμή βάσης αυτό σημαίνει ότι η κυστεΐνη έχει περάσει μέσω της μεμβράνης και η μεμβράνη με 100 MWCO δεν είναι ικανοποιητική. Επιπλέον, ο δειγματοληπτικός αισθητήρας εμβαπτίστηκε σε διάλυμα NaNO₂ 0.1M για την απόκριση. Εάν η απόκριση CL είναι υψηλότερη από τη γραμμή βάσης θεωρούμε ότι η ταινία Nafion δεν είναι αρκετή. Στις ανωτέρω περιπτώσεις ο δειγματοληπτικός αισθητήρας πρέπει να τροποποιηθεί περαιτέρω ή να αντικατασταθεί. Γενικά, μόνο δειγματοληπτικοί αισθητήρες που διατηρούν σταθερή απόκριση CL στη γραμμή βάσης παρουσία των ανωτέρω δύο διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκαν για την συνεχή παρακολούθηση του NO in vivo. Τέλος, αυτοί οι δειγματοληπτικοί αισθητήρες διαπίδυσης εμβαπτίστηκαν στα αναισθητοποιημένα πειραματόζωα (ποντίκια ή κουνέλια) χρησιμοποιώντας πρότυπες χειρουργικές διαδικασίες και έπειτα η αντλία τέθηκε σε λειτουργία για την παρακολούθηση του NO.

Jugular εμφύτευση και παρακολούθηση του NO στα ποντίκια

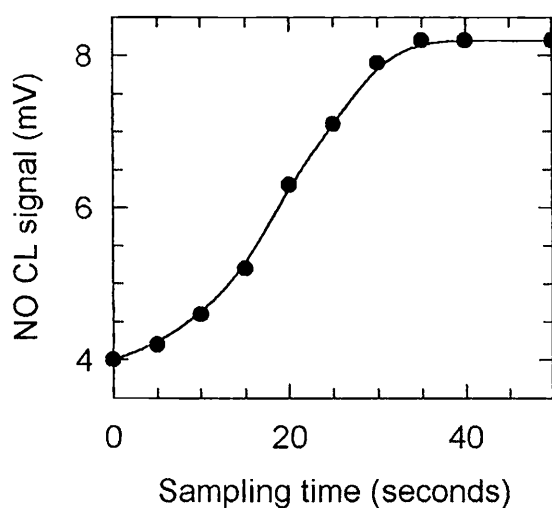
Οι αρσενικοί αρουραίοι Wistar που ζυγίζουν 250-300g αναισθητοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την υδροχλωρική κεταμίνη (10mg.ml⁻¹) και Midazolam (50mg.ml⁻¹) με αναλογία όγκων 1:1. Ο αγγειακός δειγματοληπτικός αισθητήρας διαπίδυσης παρεμβλήθηκε στην δεξιά jugular φλέβα και μια βελόνα παρεμβλήθηκε στην αριστερή jugular φλέβα για την έγχυση των φαρμάκων. Η θερμοκρασία του σώματος των αναισθητοποιημένων αρουραίων παρακολουθήθηκε από ένα ζωικό θερμόμετρο (από την BAS) και καταγράφηκε μέσω ενός πρωκτικού αισθητήρα. Το πείραμα άρχισε όταν η θερμοκρασία του σώματος επανήλθε στην φυσιολογική περιοχή (37-37.6°C) μετά την αναισθησία.

Ενδοεγκεφαλική εμφύτευση και παρακολούθηση του NO στα ποντίκια.

Οι αρουραίοι αναισθητοποιήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε ένα stereotaxic πλαίσιο. Χρησιμοποιώντας ένα τρυπάνι υψηλής ταχύτητας ανοίχτηκε μια οπή πέρα από την δεξιά parietal corte. Χρησιμοποιώντας ένα mieromanipulator τοποθετήθηκε μια κάνουλα στην οπή σε ένα επιθυμητό βάθος 10mm με όσο το δυνατόν μικρότερο τραύμα. Κατόπιν ο δειγματοληπτικός αισθητήρας μικροδιαπίδυσης NO τοποθετήθηκε stereotaxically στον parietal φλοιό σε βάθος 4mm. Μετά από τη σταθεροποίηση του

Διαπιστώσαμε ότι, στην σταθερή ταχύτητα ροής μικροδιαπίδυσης $2\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, η απόκριση NO CL δεν ήταν αρκετά επάνω από τη γραμμή βάσης, υποθέτοντας ότι τα επίπεδα του NO ήταν πολύ χαμηλά στην jugular φλέβα αρουραίων. Προκειμένου να ενισχύσουμε την ανίχνευση, αυξήσαμε το χρόνο δειγματοληψίας από 0 έως 50 δευτερόλεπτα. Σε αυτήν την περίοδο, περισσότερη ποσότητα NO μπορεί να διαχυθεί στο ρεύμα μεταφοράς S3 μέσω της μεμβράνης του δειγματοληπτικού αισθητήρα. Λεπτομέρειες φαίνονται στο Σχήμα 2. Από το Σχήμα 2, η τάση της γραμμής βάσης στο σωλήνα του φωτοπολλαπλασιαστή τοποθετήθηκε σε 4.0mV , και λάβαμε την καλύτερη απόκριση NO CL από έναν χρόνο δειγματοληψίας 35 δευτερολέπτων.

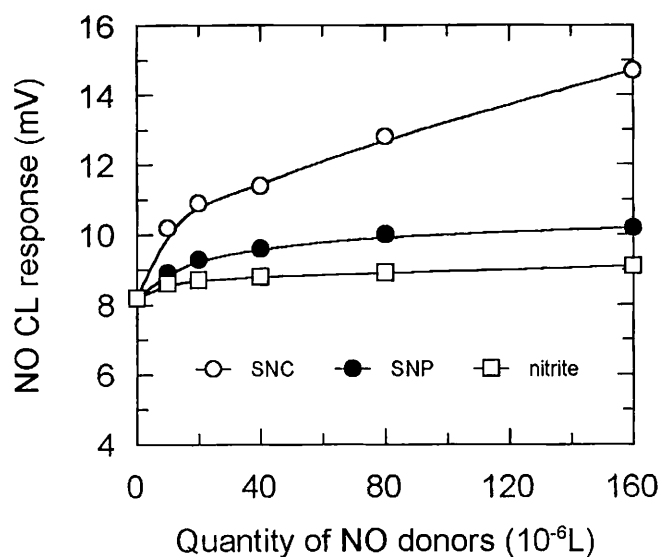
Σχήμα 2 Επίδραση χρόνου δειγματοληψίας του NO.



Επίδραση της θερμοκρασίας σώματος

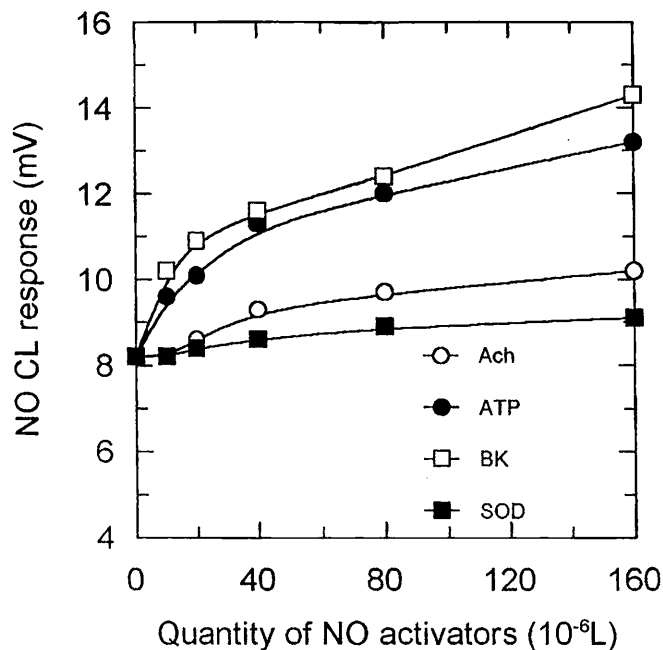
Η θερμοκρασία σώματος ελέγχθηκε και μετεβλήθη από 34 έως 40°C χρησιμοποιώντας έναν ρυθμιστή θερμοκρασίας. Παρακολούθηθηκε η μεταβολή του NO μέσω της jugular φλέβας στους αρουραίους. Περισσότερες λεπτομέρειες φαίνονται στο Σχήμα 3. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3, η χαμηλότερη παραγωγή NO παρατηρήθηκε στην κανονική θερμοκρασία σώματος $37-37.6^{\circ}\text{C}$ και η παραγωγή αυξήθηκε ειδικά στις χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αυτό μπορεί να απεικονίσει και μια πραγματική αύξηση παραγωγής NO από vasculature και, ίσως, μια ενισχυμένη σταθερότητα του NO στις χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αυξάνοντας τη θερμοκρασία σώματος επάνω από κανονικό, οδηγούμαστε επίσης σε μια μικρή αύξηση παραγωγής,

Σχήμα 4 Επίδραση των δοτών NO.



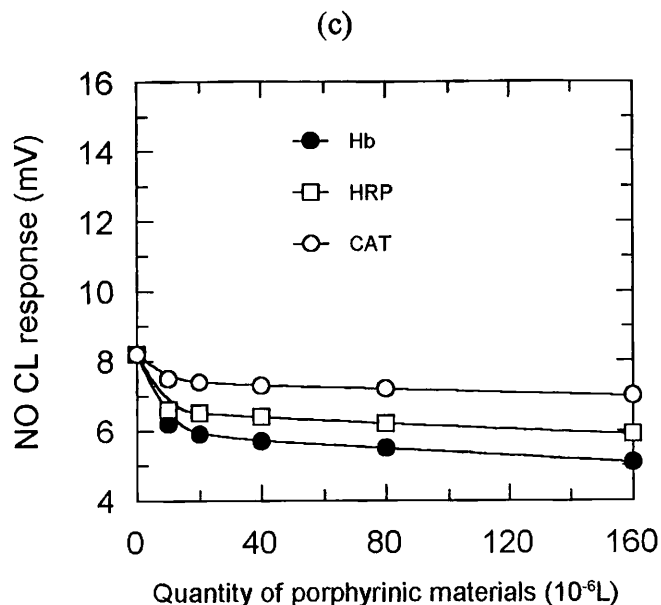
Η επίδραση του **Viagra (sildenafil citrate)** αναφέρεται ότι αυξάνει την στύση με την ενίσχυση των επιβραδυντικών επιδράσεων του NO. Η χαλάρωση του πεικού αρτηριακού μυ και επομένως η διέγερση, είναι υπό έλεγχο του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Ο κύριος νευρικός διαβιβαστής της χαλάρωσης του πεικού μυ είναι το NO [175]. Γενικά, το Viagra λειτουργεί ως ειδικός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP) και η επακόλουθη τονωτική αύξηση (GCM) εξηγεί τα υπερστυτικά αποτελέσματα αυτού του φαρμάκου. Σε αυτό το πείραμα, τα επίπεδα NO στο φλεβικό (jugular) αίμα των αρσενικών αρουραίων παρακολούθηθηκαν μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων Viagra. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5, η έγχυση Viagra προκάλεσε μια σαφή αύξηση δόσης απόκρισης του NO που ανιχνεύεται στο φλεβικό αίμα. Από ότι ξέρουμε, το Viagra δεν πρέπει να έχει άμεση επίδραση στην παραγωγή NO in vivo. Ο λόγος ύπαρξης αυτών των φαινομένων πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Τέλος, όπως αναμένεται, η ταυτόχρονη έγχυση Viagra και HB μείωσε την παραγωγή NO.

Σχήμα 6 Επίδραση των ενεργοποιητών του NO.



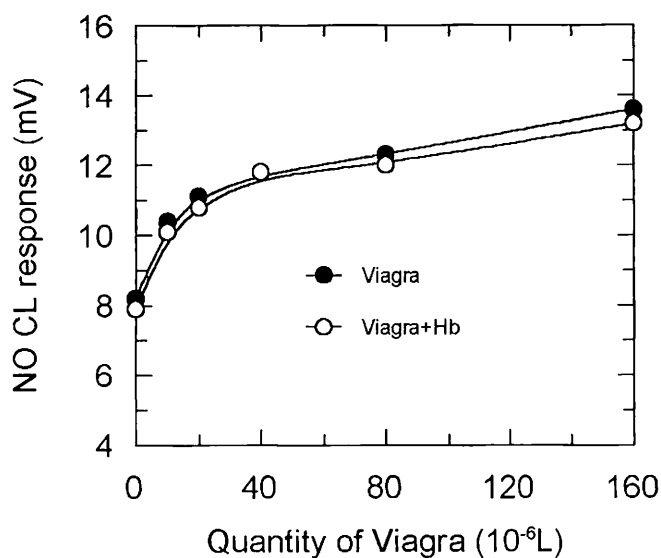
Η επίδραση συμπαράγοντων του NO. Η παραγωγή του NO από την NO συνθάση απαιτεί Arg, NADPH, H4BP και Ca²⁺ (CaCl₂) ως συμπαράγοντες [178]. Η παραγωγή NO επηρεάζεται επίσης από τα αναγωγικά αντιδραστήρια όπως το DTT, η πυρογαλλόλη (PG) και το ασκορβικό οξύ (AA), τα οποία τείνουν να εξαφανίσουν τα επίπεδα του NO. Στο σχήμα 7a, οι NOS συμπαράγοντες, Ca²⁺, L-αργινίνη εμφάνισαν πολύ ασθενή επίδραση στο σχηματισμού του NO.

Το NADPH και το H4BP, που θεωρούνται ως ισχυρά αντιοξειδωτικά αντιδραστήρια, δεν παρουσίασαν διαφορά στον σχηματισμό του NO. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί θεωρώντας ότι NADPH, και το H4BP δεν εισέρχονται εύκολα στα κύτταρα ώστε να βελτιώσουν δραστηριότητα του NOS. Στην περίπτωση του ασβεστίου, υπάρχει ήδη ένα επίπεδο πλάσματος περίπου 1,2 mM, έτσι ώστε το πρόσθετο ποσό που εγχέεται θα είχε πολύ μικρή επίδραση. Συνολικά η εξωκυτταρική παρουσία αυτών των αντιδραστηρίων που όλα ενεργούν ενδοκυτταρικά δεν θα αναμενόταν να έχει οποιαδήποτε επίδραση στην παραγωγή του NO. Στο Σχήμα 7b, όλα τα αναγωγικά αντιδραστήρια δεν δείχνουν επίδραση στο σχηματισμό του NO. Στο Σχήμα 7c, όλα τα πρφυρινικά υλικά παρουσίασαν ισχυρή επίδραση απόσβεσης για το σχηματισμό NO, ίσως λόγω της υψηλής συγγένειάς τους με το NO.



Παρακολούθηση του NO στον εγκέφαλο μέσω ποντικών. Το NO ανιχνεύθηκε εύκολα στους εγκεφάλους των αρουραίων (Σχήμα 8). Επιπλέον, όπως αναμενόταν στο φλεβικό αίμα, τα επίπεδα ανιχνεύσιμου NO αυξήθηκαν όπως στην περίπτωση του Viagra. Εντούτοις, πρέπει να σημειώσουμε ότι οι αυξήσεις που εμφανίστηκαν με χορήγηση Viagra ήταν ουσιαστικά μικρότερες από εκείνες που παρατηρήθηκαν στο αίμα στην jugular φλέβα. Επιπλέον, η σύγχρονη έγχυση της Hb είχε πολύ μικρή επίδραση στο ανιχνεύσιμο NO στον εγκέφαλο (Σχήμα 8).

Σχήμα 8 Επίδραση του Viagra μέσω της παρακολούθησης του εγκεφάλου.



Βαθμονόμηση αισθητήρων. Βαθμονομήσαμε αρχικά το σύστημα ανίχνευσης NO χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα NO που παρασκευάστηκαν βάσει κάποιας τροποποίησης των δημοσιευμένων μεθόδων [179]. Εν συντομία, πρότυπα διαλύματα NO παρασκευάστηκαν πρόσφατα σε ένα λουτρό πάγου. Τρία φιαλίδια gastight των 4ml, που σφραγίζονται με ένα διάφραγμα σιλικόνης, συνδέθηκαν με PTFE σωλήνες. Το πρώτο φιαλίδιο περιείχε την πυρογαλλόλη 0,1M σε κεκορεσμένο διάλυμα KOH για να παγιδεύσει τα ίχνη οξυγόνου. Το δεύτερο φιαλίδιο περιείχε KOH 10% (w/v) για να παγιδεύσει τα υψηλότερα οξείδια αζώτου. Το τρίτο φιαλίδιο γέμισε με 3ml απιονισμένο αποσταγμένο νερό. Στα τρία φιαλίδια, που συνδέονται στη σειρά, διαβιβάστηκε πρώτα αργό για 30 min και έπειτα καθαρό NO αέριο για άλλο min. Κατόπιν, το φιαλίδιο 3, αποσυνδέθηκε έκλεισε καλά για να μην διαφύγει το αέριο. Η συγκέντρωση του διαλύματος NO σε αυτό το φιαλίδιο εκτιμήθηκε ότι είναι ~ 2,00mM. Για την παρασκευή των προτύπων NO στη περιοχή 0.5nM-5μM, οι διαφορετικοί όγκοι εγχύθηκαν από το παραπάνω διάλυμα σε άλλα καλά κλεισμένα φιαλίδια αερίου τα οποία περιείχαν 3ml νερό στο οποίο διαβιβάστηκε αργό χρησιμοποιώντας μια στεγανή για το αέριο μικροσύριγγα. Ο δειγματοληπτικός αισθητήρας NO προ-εγκαταστάθηκε σε αυτά τα φιαλίδια. Για τη βαθμονόμηση των αισθητήρων της απόκρισης NO – CL, ακολουθήθηκε η διαδικασία ανίχνευσης όπως περιγράφεται για την in vivo παρακολούθηση στα ζώα. Όταν η γραμμή βάσης γίνεται σταθερή, η αντλία σταμάτησε για 35 δευτερόλεπτα, που είναι ο χρόνος δειγματοληψίας η σχετική απόκριση από την κορυφή του καταγραφέα. Η απόκριση στη συνέχεια ελήφθη του συστήματος (mV) παρουσιάζεται διαγραμματικά εναντίον της συγκέντρωση του NO και δίνει μια ημι-λογαριθμική γραμμική παράσταση δόσης απόκρισης. Η γραμμική απόκριση για την περιοχή συγκεντρώσεων 5nM ως 1μM NO επιτεύχθηκε με όριο ανιχνευσιμότητας 1nM. Η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς (με συντελεστή συσχέτισης $\rho=0.9993$) είναι η εξής:

$$Y=21664(\pm 3.11)+23.12\lg X(\pm 0.43)$$

όπου Y=NO CL απόκριση (mV), X=Συγκέντρωση του NO (M).

Στα in vivo πειράματα βρίσκουμε ότι η συγκέντρωση του NO στο αίμα ή τον ιστό είναι στην περιοχή 8.2-16mV, μια συγκέντρωση έξω από τη γραμμική περιοχή αλλά ουσιαστικά μεγαλύτερη από το όριο ανιχνευσιμότητας. Με βάση τα αποτελέσματα με τα πρότυπα διαλύματα εκτιμούμε ότι οι πραγματικές NO συγκεντρώσεις in vivo πρέπει να βρίσκονται στην περιοχή 1-5nM ή σε ακόμα μικρότερη.

3.6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ ΚΑΙ ΧΟΛΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΝΕΥΡΙΚΟ ΙΣΤΟ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΩΝ ΜΕ ΣΥΝΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΑ

3.6.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ακετυλοχολίνη παίζει σημαντικό ρόλο σαν νευροδιαβιβαστής στο περιφερειακό αλλά και στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η καλύτερη κατανόηση της χολινεργικής νευρομετάδοσης , που περιλαμβάνει την ακετυλοχολίνη και του μεταβολίτη του χολίνη θα δώσει περισσότερες πληροφορίες για την κατανόηση του ρόλου του στην φυσιολογία , την παθολογία , την φαρμακολογία και την τοξικολογία. Ο ρόλος της ακετυλοχολίνης στο περιφερειακό σύστημα είναι καλά γνωστός , περιλαμβάνει την ρύθμιση της μυϊκής σύσπασης , της γαγγλιονικής μετάδοσης , το διεγερτική και αναχαιτιστική δράση στις μεμβράνες, και την ανασταλτική δράση στα κανάλια ιόντων από τους δέκτες της ακετυλοχολίνης.. Η αναγνώριση του ρόλου του στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι πολύ λιγότερη , και ακόμη γενικά θεωρείται ότι λαμβάνει μέρος στην ρύθμιση της θερμοκρασίας , της πίεσης του αίματος , στον συντονισμό των κινήσεων , στην μάθηση την μνήμη κ.λ.π. Ακόμη πολλές από τις ασθένειες αποδίδονται σε χολινεργικές δυσλειτουργίες, όπως ασθένεια της στεφανιαίας αρτηρίας, γνώση γήρατος, ασθένεια Parkinson κ.λ.π.[182-186]. Για τους πιο πάνω λόγους και για την καλύτερη κατανόηση των αρχών της δράσης της ακετυλοχολίνης και χολίνης είναι αναγκαίο να αναπτυχθεί μια απλή και γρήγορη μέθοδος ανίχνευσης με υψηλή ευαισθησία .

Για την μέτρηση της ακετυλοχολίνης και χολίνης έχουν αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός αναλυτικών μεθόδων που περιλαμβάνουν μεθόδους βιοανάλυσης, αέριας χρωματογραφίας (GC) με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας , ή με ανιχνευτή φασματόμετρο μάζας (GC-MS), υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή(ED) ή με ανιχνευτή φασματόμετρο μάζας (HPLC-MS) κ.λ.π. Ακόμη και σχετικοί βιοαισθητήρες με βάση τα συνακινητοποιημένα ένζυμα κατασκευάστηκαν. Γενικά, όμως, οι πιο πάνω αναφερθέντες μέθοδοι έχουν τους περιορισμούς τους όπως χαμηλή εξειδίκευση και ευαισθησία. Ειδικότερα , οι μέθοδοι GC-MS και HPLC-MS χρησιμοποιούν απαιτητικό τρόπο καθαρισμού του δείγματος και επίπονο μέθοδο εκχύλισης ενή το όργανο είναι υψηλού κόστους. Η μέθοδος ED με τα συνακινητοποιημένα ένζυμα φαίνεται πιο ελκυστική, αλλά η ευαισθησία της δεν

αγοράστηκαν από τη Sigma. Το NaIO₄ (Fluka), Nafion (5% σε αλειφατική αλκοόλη), η PU (πολυουρεθάνη) 88 % w/w και η GA (γλουταραλδεύδη 50%) αγοράστηκαν από την Aldrich. Τα παραπάνω αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή μεμβρανών.

Η Λουμινόλη (Sigma), το H₂O₂ 30% w/v (προτυποποιήθηκαν με τιτλοδότηση με KMnO₄) και το K₃Fe(CN)₆ αγοράστηκαν από τη Merck και χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση χημειοφωταύγειας.

Βιοχημικά αντιδραστήρια

AchE (Ακετυλοχολινεστεράση), ChOD (οξειδάση της χολίνης), SA (στρεπταβιδίνη), NH₂-Βιοτίνη, BSA (αλβουμίνη του ορού των βοοειδών) αγοράστηκαν από τη Sigma.

Χημικές αντιδραστήρια

Η AchI (χλωριούχος ακετυλοχολίνη), CH (χολίνη), Βεταΐνη, AA (ασκορβικό οξύ), ντοπαμίνη, δ-γλυκόζη, ουρικό οξύ, Κυστεΐνη, NH₄Cl αγοράστηκαν από τη Sigma. Το SDS (Δωδεκυκλικό θειικό άλας νατρίου) αγοράστηκε από τη Pharmacia Biotech.

Μεμβράνη

Η καθαρή νιτροκυτταρινική μεμβράνη αγοράστηκε από την Millipore, η σωλήνωση διαπίδυσης (SPECTRA/POR) με MWCO 100, 500 και 3500 αγοράστηκαν από τη SERVA. Η μεμβράνη (CA) του οξικής κυτταρίνης με MWCO 100 παρασκευάστηκε στο εργαστήριό μας.

Αέρια

Υψηλού βαθμού καθαρότητας αέριο N₂ αγοράστηκε από την Air-Liquid, της Γαλλίας Ζώα

Το άσπρο κουνέλι της Νέας Ζηλανδίας (4kg) χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του εκχυλίσματος του νευρικού ιστού.

Συσκευή.

Μια σχηματική παράσταση της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της Ach και της CH φαίνεται στο Σχήμα 1a. Η διάταξη αποτελείται από μια συσκευή FIA/ανίχνευσης χημειοφωταύγειας συνδεδεμένη με έναν ευαίσθητο δειγματολήπτη μεμβράνης με τα συνακινητοποιημένα ένζυμα, τα οποία σταθεροποιήθηκαν με δύο κομμάτια PTFE. (Σχήμα 1b). Η εκπομπή χημειοφωταύγειας (CL) λήφθηκε από την FIA διάταξη που είναι εξοπλισμένη με έναν UV-ευαίσθητο φωτοπολλαπλασιαστή (PM) και τα σχετικά ηλεκτρονικά. Η

Διαδικασίες.

Παρασκευή της ευαίσθητης μεμβράνης.

Προκειμένου να προσδιορίσουμε την Ach στον βιολογικό ιστό, ειδικά στον νευρικό ιστό, πρέπει να παρασκευάσουμε μια ευαίσθητη και ελεύθερη παρεμποδίσεων μεμβράνη. Αυτό το είδος μεμβράνης πρέπει να έχει πολύ υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα για την Ach ή τη CH. Σε αυτή την εργασία, αναπτύξαμε μια νέα μέθοδο για την παρασκευή μεμβρανών και την ακινητοποίηση των ενζύμων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση της ενεργοποιημένης σωλήνωσης διαπίδωσης ως ταινία υποστήριξης, και τα σχετικά ένζυμα (AchE και ChOD) είναι ακινητοποιημένα στην επιφάνεια με τη βοήθεια της πηκτής του πολυακρυμιδίου που βρίσκεται στο σύστημα βιοτίνης-στρεπταβιδίνης. Επιπλέον, η επίστρωση Nafion επιλέχτηκε ως εξωτερική ταινία για να απομακρύνει τις παρεμποδίσεις.

Ενεργοποίηση της ταινίας υποστήριξης.

Στην εργασία μας, η σωλήνωση διαπίδωσης με MACO 100 (DT3) επιλέχτηκε ως κατάλληλη ταινία υποστήριξης, η οποία μπορεί να παρέχει ικανοποιητική ταχύτητα διάχυσης για το H_2O_2 και απομάκρυνση των παρεμποδίσεων. Με μερική τροποποίηση της σχετικής βιβλιογραφίας [209, 210], η σωλήνωση διαπίδωσης ενεργοποιήθηκε με τα ακόλουθα βήματα: α. Η μεμβράνη ($20 \times 5 \text{ cm}^2$) εκπλύθηκε με απεσταγμένο νερό και έβρασε σε διάλυμα EDTA 1mM και 1mM $NaHCO_3$, pH 8,0 για 30 min. Στη συνέχεια αιωρήθηκε σε 0.01M NaOH για 30 min και εκπλύθηκε καλά με απεσταγμένο νερό. β. Η μεμβράνη αιωρήθηκε σε 20ml διαλύματος 0.1M $NaIO_4$ σε pH 4,0 στο σκοτάδι για 2 h με συνεχή ανάδευση και ύστερα εκπλύθηκε καλά με ύδωρ. γ. Η μεμβράνη αιωρήθηκε σε διάλυμα ουρίας 10% (w/v) για 5h παρουσία θεικού οξέος 0,9% (v/v) στους 60 °C σταθερή ανάδευση και έπειτα επλύθηκε καλά με νερό. δ. Η μεμβράνη κατεργάστηκε με 20ml 12% διαλύματος φορμαλδεύδης (pH= 7.2) σε 45 °C με συνεχή ανάδευση για 2 h. Η μεμβράνη εκπλύθηκε λεπτομερώς με νερό σε σύντομο χρόνο και ήταν έτοιμη για το επόμενο βήμα.

Επίστρωση για τις παγιδευμένες πρωτεΐνες.

Σε αυτό το βήμα, η SA παγιδεύτηκε από την πηκτή του PA παρουσία ιχνών του GA προκειμένου να επιτευχθούν ισχυρότερες δεσμευτικές ιδιότητες. Τα ακόλουθα βήματα, τα οποία βασίστηκαν στην τροποποίηση των σχετικών μεθόδων

Προετοιμασία της εξωτερικής ταινίας.

Δύο είδη εξωτερικής ταινίας χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία. α. Ταινία Nafion: Η ανωτέρω μεμβράνη βυθίστηκε σε ένα διάλυμα Nafion (5% σε αλειφατική αλκοόλη για 10 min και το διάλυμα αφέθηκε να στεγνώσει στον αέρα για 2 ώρες. Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, διαμορφώθηκαν 5 διαδοχικά στρώματα. β. PU μεμβράνη [211]: Η επιθυμητή μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε διάλυμα 5% PU σε 98% THF και 2% DMF για 10 min, κατόπιν ξηράνθηκε στον αέρα για 6h σε θερμοκρασία δωματίου. Η ίδια διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί για το επιθυμητό πάχος. Σύμφωνα με το πείραμά μας, η επίστρωση Nafion είναι περισσότερο χρήσιμη δεδομένου ότι ελαχιστοποιεί την επίδραση του ασκορβικού οξέος.

Η ανωτέρω μεμβράνη εκπλύθηκε πλήρως με απεσταγμένο νερό, διατηρήθηκε στους 4°C με διάλυμα PBS και ήταν έτοιμη να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή του αισθητήρα.

Κατασκευή των αισθητήρων και μέτρηση CL.

Η μεμβράνη τοποθετήθηκε μεταξύ δύο στηριγμάτων PTFE και ο αισθητήρας χημειοφωταύγειας κατασκευάστηκε όπως φαίνεται στο Σχήμα 1. Όλες οι γραμμές μεταφοράς αντλούνταν συνεχώς με ταχύτητα ροής 0.76ml.min⁻¹(για S1, S2) και 0.86ml.min⁻¹(για S3, S4) αντίστοιχα. Όταν γραμμή βάσης σταθεροποιήθηκε, τα διαλύματα των προτύπων ή των δειγμάτων εισήχθησαν σε δόσεις όγκου των 120μl μέσω της βαλβίδας εγχύσεων. Το H₂O₂, που προήλθε από την ενζυματική αντίδραση παρουσία των ουσιών της Ach ή της CH, διαχύθηκε μέσω της εκλεκτικής μεμβράνης στη γραμμή μεταφοράς S3. Το H₂O₂ μεταφέρθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα HEPES και συγχωνεύτηκε με το μίγμα από τις γραμμές μεταφοράς S1 και S2 ώστε να γίνει η αντίδραση χημειοφωταύγειας.

Προετοιμασία του εκχυλίσματος του νευρικού ιστού.

Το αρσενικό άσπρο κουνέλι της Νέας Ζηλανδίας (4kg) εμβολιάστηκε με επαρίνη και αναισθητοποιήθηκε με ενδοπεριτοναϊκό πεντοβαρβιτουρικό. 4ml φρέσκου αίματος συλλέχθηκε μέσω της φλέβας του αυτιού και ψύχθηκε αμέσως σε υγρό άζωτο. Ο ιστός εγκεφάλου τεμαχίστηκε, συλλέχθηκε και ψύχθηκε σε υγρό άζωτο αμέσως μόλις άνοιξε το κρανίο του σε συνθήκες ζωής. Ο κατεψυγμένος ιστός ζυγίστηκε άμεσα (ήταν 4.6g) και έπειτα κονιοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ιγδίο παρουσία μικρής

Έχουν δημοσιευτεί διάφορες μέθοδοι για ανίχνευση H_2O_2 , όπως της λουμινόλης- HPR χημειοφωταυγούς αντίδρασης [213, 214], της υπεροξυοξαλικής χημειοφωταυγούς αντίδρασης [215], της λουμινόλης- $NaOCl$ χημειοφωταυγούς αντίδρασης [216] κ.λ.π.. Σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία, η πιο ευαίσθητη μέθοδος που αναφέρεται είχε ευαισθησία 200fmol ($10\text{nM} \times 20\mu\text{l}$) [217].

Επιπλέον, αναφέρθηκε ένα σύστημα χημειοφωταύγειας ροής με τη χρήση της αντίδρασης λουμινόλης- εξακυανοσιδηρικού με όριο ανιχνευσιμότητας $7 \times 10^{-9}\text{M}$. Στην εργασία μας, που βασίζεται στην τελευταία αντίδραση, μεταβάλλοντας τις συνθήκες της αντίδρασης, αναπτύξαμε ένα εν ροή σύστημα ανίχνευσης με χημειοφωταύγεια για τον προσδιορισμό του H_2O_2 . Το όριο ανιχνευσιμότητας είναι (σήμα:θόρυβος = 3) από 30fmol H_2O_2 ($0.25\text{nM} \times 120\mu\text{l}$). Σύμφωνα με την προηγούμενη εργασία μας [80], βρέθηκαν οι ακόλουθες βέλτιστες συνθήκες για το σύστημά μας. S1 ρεύμα: Λουμινόλη 1mM διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα Τρις- HCl 10mM σε $\text{pH} = 9,0$, S2 ρεύμα: $K_3Fe(CN)_6$ 20mM διαλυμένη σε ρυθμιστικό 10mM Τρις- HCl σε $\text{pH} = 9,0$, S3 ρεύμα: 1mM ρυθμιστικού διαλύματος $HEPES$ στο οποίο προστέθηκε διάλυμα $NaOH$ έως $\text{pH} = 7.2$. S4 ρεύμα: Απεσταγμένο νερό για την μεταφορά του διαλύματος ή το πλύσιμο της μεμβράνης. Σε αυτήν την εργασία, ο τελευταίος στόχος μας ήταν η ανάπτυξη μιας μεθόδου για την περαιτέρω ανίχνευση του νευρικού ιστού *in vivo*. Το ρεύμα S3 σχεδιάστηκε ώστε να επικοινωνεί απευθείας με τα βιολογικά υγρά μέσω μιας μεμβράνης. Στην περίπτωσή μας, το ρεύμα S3 ρυθμίστηκε με 1mM $HEPES$. Προηγουμένως, από το ρεύμα S3 είχε διέλθει απεσταγμένο νερό ως μεταφορέας του H_2O_2 . Τότε πήραμε ένα υψηλότερο όριο ανίχνευσης για το H_2O_2 , αλλά το pH του S3 μεταβαλλόταν εύκολα όταν χρησιμοποιήθηκαν βιολογικά δείγματα που είχε σαν αποτέλεσμα μεγάλη διακύμανση στην απόκριση του σήματος της χημειοφωταύγειας. Θεωρούμε ότι στα βιολογικά δείγματα, κάποιο μικρό μόριο, ειδικά το CO_2 , μπορεί να περάσει μέσω της μεμβράνης S3 εύκολα. Επίσης, η ενζυμική ουσία, Βεταΐνη, που είναι ένα ισχυρό αλκάλιο, μπορεί επίσης να μειώσει το pH του S3 ρεύματος. Επιπλέον, μερικά άλλα υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί για την προετοιμασία των ρυθμιστικών, όπως το Τρις ρυθμιστικό, PBS , ρυθμιστικό βορικών αλάτων κ.λπ... Δεδομένου ότι έχουν μικρό μοριακό βάρος (μικρότερο από 130), ίχνη από τη διάχυσή τους στο ρεύμα S4 θα αλλάξει τα συστατικά των βιολογικών υγρών. Στην περίπτωσή μας, το ρυθμιστικό $HEPES$ δεν εμφανίζει αυτό το πρόβλημα δεδομένου ότι έχει μεγάλο FW της τάξεως του 238 . Το ρεύμα S3 δεν πρέπει επίσης να περιλαμβάνει K^+ , ή Ca^{2+} αφού ίχνη

και η επιφάνεια του DT3 ενεργοποιήθηκε ώστε να επιτύχει μια υψηλότερη πρωτεϊνική δεσμευτική δυνατότητα.

Ενζυμικό στρώμα

Σε αυτήν την εργασία, τα ένζυμα (της AchE ή ChOD) ακινητοποιήθηκαν στην ταινία υποστήριξης ώστε να επιτύχουν μια ευαίσθητη απόκριση για τις Ach ή το CH. Για την καλύτερη δραστικότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων, έχουν ακολουθηθεί διαφορετικές μέθοδοι ακινητοποίησης: Α. Τα ένζυμα (της AchE ή ChOD) με διάλυμα BSA περιτυλίγονται στην ταινία υποστήριξης απευθείας (E+BSA). Β. Τα ένζυμα με διάλυμα BSA περιτυλίγονται στην ταινία υποστήριξης παρουσία GA (E+BSA+GA) Γ. Τα ένζυμα παγιδεύονται από την πηκτή PA, και περιτυλίγονται στην ταινία υποστήριξης χωρίς το GA (E+PA) Δ. Τα ένζυμα παγιδεύονται από την πηκτή PA, και έπειτα περιτυλίγονται στην ταινία υποστήριξης παρουσία ιχνών του GA (E+PA+GA). Ε. Το SA παγιδεύεται από την πηκτή PA παρουσία GA και κατόπιν συζεύγνυται με Βιοτίνης-AchE ή Βιοτίνης-ChOD (E+PA+SA+GA). Περισσότερες λεπτομέρειες φαίνονται στον πίνακα 2. Τα αποτελέσματα της απόκρισης των παραπάνω αισθητήρων ελήφθησαν από πρότυπο διάλυμα Ach συγκέντρωσης $1 \times 10^{-5} M$, από τον αισθητήρα της Ach, με τις υπόλοιπες παραμέτρους στις βέλτιστες συνθήκες. Από τον πίνακα 2, λάβαμε καλή απόκριση από τη μέθοδο Α, αλλά η απόκριση των αισθητήρων μειώθηκε πολύ γρήγορα με το χρόνο. Θεωρούμε ότι τα ακινητοποιημένα ένζυμα έχουν προβλήματα δύλισης. Η μέθοδος β είναι λιγότερο δραστική σε σχέση με τη μέθοδο Α, αλλά η δραστικότητα είναι σταθερή με το χρόνο. Η μέθοδος γ έχει υψηλότερη απόκριση, αλλά η σταθερότητα είναι μικρή. Η μέθοδος δ έχει υψηλότερη απόκριση από τη μέθοδο γ. Από τη μέθοδο ε, πήραμε την υψηλότερη τιμή απόκρισης με μεγάλη σταθερότητα αισθητήρα. Ο αισθητήρας διατήρησε το 65% της τιμής απόκρισής του μετά από τη συνεχή λειτουργία για έναν μήνα. Με τις μεθόδους γ, δ και ε, πήραμε μεγαλύτερο χρόνο απόκρισης. Ο χρόνος απόκρισης υπολογίστηκε από το πλάτος της βάσης της κορυφής. Θεωρούμε ότι με ότι η πηκτή PA αύξησε το πάχος του ενζυμικού στρώματος, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την μεγαλύτερη απόσταση για διάχυση του H_2O_2 που παράγεται. Σχετικά με το πρόβλημα δύλισης, αναφέρεται ότι Η AchE είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη με MW (μοριακό βάρος) περίπου 260.000, αλλά η ChOD είναι μια μικρή πρωτεΐνη με MW από 83.000 μέχρι 95.000. Το μέγεθος πόρων της πηκτής PA δεν είναι αρκετά ικανό για να κρατήσει τη ChOD και επομένως το πρόβλημα δύλισης οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στη δύλιση του ChOD. Στην

είναι αρνητικά φορτισμένη, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να διέλθει το ασκορβικό οξύ.

Αισθητήρες για το H₂O₂, την CH και την Ach.

Στην εργασία μας, αναπτύχθηκαν τρία συστήματα για την ανίχνευση του H₂O₂, της CH και της Ach. Όταν δεν χρησιμοποιήθηκε η μεμβράνη, το δείγμα H₂O₂ εγχύθηκε απευθείας στο ρεύμα S3. Η απόκριση του συστήματος (mV) παρίσταται γραφικά έναντι της συγκέντρωσης του H₂O₂ σε μια λογαριθμική γραφική παράσταση. Η γραμμική απόκριση του H₂O₂ επιτεύχθηκε στην περιοχή 5X10⁻⁹ έως 1X10⁻⁵ M. Τα δεδομένα προσαρμόζονται καλύτερα στην εξίσωση (1) με συντελεστή συσχέτισης, $r = 0,9997$.

$$\text{Lg}Y = 5,96 + 0,49 (\pm 0.01) \text{Lg}X \quad (1)$$

όπου Y = σήμα χημειοφωταύγειας του H₂O₂ σε mV, X = συγκέντρωση του H₂O₂.

Το όριο ανιχνευσιμότητας είναι 0.03pmol (0.25nMX120μl) για ένα σήμα προς θόρυβο σε αναλογία 3. Επιπλέον, εάν θέλουμε να ανιχνεύσουμε H₂O₂ σε πραγματικό δείγμα, η εκλεκτική μεμβράνη είναι απαραίτητη. Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η μεμβράνη DT3 με την επικάλυψη Nafion. Ο αισθητήρας Ch κατασκευάστηκε από την ακινητοποίηση της ChOD στη μεμβράνη μέσω της μεθόδου E. Η απόκριση ήταν χαμηλότερη από εκείνη του αισθητήρα του H₂O₂ και περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση (2).

$$\text{Lg}Y = \text{Lg} 5,71 (\pm 0.05) + 0,58 (\pm 0.01) \text{Lg}X \quad (2)$$

Η γραμμική απόκριση ήταν στην περιοχή 4X10⁻⁸ έως 1X10⁻⁴ M. Ο συντελεστής συσχέτισης, $r = 0.9995$ όπου Y = σήμα χημειοφωταύγειας της Ch σε mV, X = συγκέντρωση της Ch. Το όριο ανιχνευσιμότητας είναι 0.6pmol (5.0nM 120μl). Ο αισθητήρας της Ach κατασκευάστηκε με την ακινητοποίηση της AchE και της ChOD στη μεμβράνη μέσω της μεθόδου E. Λάβαμε την χαμηλότερη απόκριση των ανωτέρω δύο αισθητήρων σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση (3).

Η γραμμική απόκριση είναι στην περιοχή 6X10⁻⁸ ως 1X10⁻⁴M με συντελεστή συσχέτισης, $r = 0.997$.

$$\text{Lg}Y = 5,26 (\pm 0.13) + 0,54 (\pm 0.02) \text{Lg} X \quad (3)$$

όπου Y = σήμα χημειοφωταύγειας της Ach σε mV, X = συγκέντρωση της Ach. Το όριο ανιχνευσιμότητας είναι 1.2pmol (10nMX120μl). Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τους παραπάνω τρεις αισθητήρες φαίνονται στον πίνακα 3 και η καμπύλη βαθμονόμησης φαίνεται στον πίνακα 2.

ελαχιστοποιήσουμε αυτό το είδος παρεμπόδισης, είναι απαραίτητο ένα εξωτερικό στρώμα από Nafion. Οι λεπτομέρειες φαίνονται στον πίνακα 4. Η επίστρωση PU και η επίστρωση Nafion τοποθετήθηκαν σαν εξωτερική ταινία στον αισθητήρα της Ach. Η απόκριση του αισθητήρα για πρότυπα διαλύματα Ach $1 \times 10^{-5} \text{M}$ θεωρήθηκε ως 100. Από τον πίνακα 4, η επίστρωση με Nafion έχει καλύτερο αποτέλεσμα από την επίστρωση με PU. Επιπλέον, η Βεταίνη, δεν παρεμποδίζει το σύστημά μας.

Πίνακας 4. Επίδραση παρεμποδίσεων για το assay της ακετυλοχολίνης

Interference	Formula weight (Dalton)	Relative response value %	
		Polyurethane outer layer	Nafion outer layer
Uric acid	168	92	99
Cysteine	121	88	97
Glucose	180	100	100
Dopamine	190	94	101
Ascorbate	176	35	97
Betaine	117	101	101

Ανίχνευση των βιολογικών δειγμάτων.

Προκειμένου να υπάρξει ένας ακριβής προσδιορισμός της Ach και της CH στον νευρικό ιστό, δεδομένου ότι η Ach μπορεί να υδρολυθεί από τη χολινεστεράση πολύ γρήγορα και εύκολα, μια χρήσιμη μέθοδος να απενεργοποιήσει αυτό το είδος ενζύμου είναι αρκετά σημαντική. Μερικές πρότυπες μέθοδοι που βασίζονται στη φάση οργανικών διαλυτών αποδείχθηκαν επιτυχείς στη διαδικασία διαχωρισμού για το HPLC ή την αέρια χρωματογραφία (GC-CD). Στην εργασία μας, αναπτύξαμε μια μέθοδο διαχωρισμού για την απενεργοποίηση της εστεράσης στην υδρόφιλη φάση. Δύο μέθοδοι είναι κατάλληλες για να απενεργοποιήσουν την εστεράση. Η μια είναι με τη χρησιμοποίηση διαλύματος EDTA σε χαμηλό pH και η άλλη είναι με τη χρησιμοποίηση διαλύματος EDTA-SDS σε χαμηλό pH.

Με τη χρησιμοποίηση αισθητήρων της Ach ή CH, η μέση τιμή 3 μετρήσεων για κάθε δείγμα φαίνεται στον πίνακα 5. Από τον πίνακα 5 φαίνεται ότι δεν λάβαμε καμία απόκριση από τον αισθητήρα της Ach στον σωλήνα A. Αυτό σημαίνει ότι η Ach έχει

Πίνακας 5. Παρασκευή δειγμάτων νευρικού ιστού και ανίχνευση σε αισθητήρες Ach, Ch.

Sample operation procedure	Centrifuge tube		
	No. A	No. B	No. C
Nerve tissue samples preparation			
Centrifuge tube weight m_1 (g)	0.89	0.87	0.92
Add 0.5ml dissolve solution	PBS 1mM	EDTA 1mM	EDTA, SDS 1mM
Dissolve solution pH	7.2	3.5	3.5
Dissolve solution weight m_2 (g)	0.5	0.5	0.5
Total weight m_t (g)	2.91	3.00	2.89
Nerve tissue weight m (g)	1.52	1.63	1.47
$m = m_t - m_1 - m_2$			
Sonication			
Add water volume v_1 (ml)	0.11	0.15	0.09
Total solution volume v (ml)	0.61	0.65	0.59
$v = v_1 + 0.5$			
Concentration of nerve tissue C ($g \cdot ml^{-1}$) $C = m : v$	2.5	2.5	2.5
Centrifuge			
Add 1M NaOH volume (μl)	0	2	2
Last solution pH	7.2	7.2	7.2
Incubation samples in 37 for 20min			
Samples detection by Ch, Ach sensors			
Ch sensor response (M1)	6.3×10^{-7}	0.7×10^{-7}	0.5×10^{-7}
Ach sensor response (M2)	6.3×10^{-7}	6.5×10^{-7}	6.6×10^{-7}
Ach concentration ($M = M2 - M1$)	0	5.8×10^{-7}	6.1×10^{-7}

22. Pellat C., Henry Y. and Drapier J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 166/1: 119-25
23. Green L.C., Wagner D. A. and Glogowski J. *Anal. Biochem.* 1982; 126: 131-8
24. Pai T.G., Payne W.J. and Legall J. *Anal. Biochem.* 1987; 166: 150-7
25. Mordvintcev P., Mulsch A., Busse R. and Vanin A. *Anal. Biochem.* 1991; 199: 142-6
26. Maliski T., Taha Z. *Nature.* 1992; 358: 676-8
27. Kikuchi K., Nagano T., Hayakawa H, Hirata Y, Hirobe M, *Anal. Chem.* 1993; 65: 1794-9
28. Maskus M., Pariente F., Wu Q., Toffanin A., Shapleigh J.P. and Abruna H.D. *Anal. Chem.* 1996; 68: 3128-34
29. Zhou X., Arnold M.A. *Anal. Chem.* 1996; 68: 1748-54
30. Kelm M., Dahmann K., Wink D. and Feelisch M. *J. Biol. Chem.* 1997; 272/15: 9922-32
31. Malinski T., Mesáros S., Tomboulían P. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 58-69
32. Christodoulou D., Kudo S., Cook J. A. Krishna M.C., Miles A., Grisham M.B., Murugesan R., Ford P.C., Wink D.A. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 69-83
33. Brien J.F., Mclaughlin B.E., Nakatsu K., Marks G.S. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 83-93
34. Nims R.W., Cook J.C, Krishna M.C. Christoduulou D. Poore C.M.B., Miles A.M., Grisham M., Wink D.A. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 93-105
35. Miles A.M., Wink D.A., Cook J.C., Grisham M.B. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 105-20
36. Wink D.A., Grisham M.B., Miles A.M., Nims R.W. Krishna M.C., Pacelli R., Teague D., Poore C.M.B., Cook J.A., Ford P.C. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 120-30
37. Wishnok J.S., Glogowski J.A., Tannenbaum S. R. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 130-42
38. Granger D.L., Taintor R.R., Boockvar K.S., and Hibbs J.B. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 142-52
39. Yokoi I., Habu H., Kabuto H. and Mori A. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 152-9
40. Gross S.S. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 159-68
41. Kalyanaraman B. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 168-88

66. Piacentini G.L.; Suzuki Y.; Bodini A. *BioDrugs*, 2000, 13, 279-288
67. Tsukahara H.; Hiraoka M.; Kobata R.; Hata I.; Ohshima Y.; Jiang M.Z.; Noiri E.; Mayumi M. *Redox Report*, 2000, 5, 23-28
68. Silkoff P.E. *Clin. Chest Med.*, 2000, 21, 345-360
69. Bruckheimer E.; Rimar S.; Dubois A.B.; Douglas J.S. *J Clin. Monitor Comput.* 2000, 16, 21-23
70. Palm J.P.; Graf P.; Lundberg J.O.N.; Alving K., *Eur. Respir. J*, 2000, 16, 236-241
71. Cooper C.S.; Laurendeau N.M., *Combust Flame*, 2000, 123, 175-188
72. Qian W.; Chatkin J.M.; Zamel N.; Djupesland P.G.; Irish J.C.; McClean P.; Haight J.S.J. *Ann Otol. Rhinol Laryngol*, 2000, 109, 952-957
73. Woitzik J.; Abromeit N.; Schaefer F. *Anal. Biochem.*, 2001, 289, 10-17
74. Tunçel M, Dogrukol-Ak D. Erkasap N. *J. Chromatogr. B*: 2001, 751, 257-263
75. Itoh Y.; Fu Hai Ma; Hoshi H.; Oka M.; Noda K.; Ukai Y.; Kojima H.; Nagano T.; Toda N. *Anal. Biochem.* 2000, 287, 203-209
76. Pinelli E, Gebhard D, Mommaas A. M, Hoeij M., Langermans J.A.M., Ruitenberg E.J., Rutten V.P.M.G. *Veterin. Parasitol*, 2000, 92, 181-189
77. Leshem Y.Y.; Pinchasov Y. *J. Exp. Botany*, 2000, 51, 1471-1473
78. Kinoue T.; Asai S.; Ishii Y.; Ishikawa K.; Fujii M.; Nakano K.; Hasumi K. *Environ Health Prevent. Med*, 2000, 5, 97-102
79. Evmiridis N.P., Yao D. *Anal. Chim Acta*, 2000, 410: 167-175
80. Yao D., Prodromidis M.I, Vlessidis A.G, Karayannis M.I, Evmiridis. N.P. *Anal. Chim. Acta* (submitted)
81. Yao D., Vlessidis A.G., Evmiridis N.P. *Anal. Chim. Acta*. 2001, 435, 273-280.
82. W.L. Miller and D.R. Kester. *Mar. Chem.* 48 (1994), p. 17.
83. J.W. Moffett and R.G. Zika. *Environ. Sci. Technol.* 21 (1987), p. 804.
84. R.G. Zika, in: N.V. Blough, R.G. Zepp (Eds.). *Inst. Tech. Rep. WHOI-90-09*, 1990
85. W.J. Cooper, R.G. Zika, R.G. Petasne and J.M.C. Plane. *Environ. Sci. Technol.* 22 (1988), p. 1156.
86. W.J. Cooper, C. Shao, D.R.S. Lean, A.S. Gordon and F.E. Scully, Jr.. *Adv. Chem. Series 237* (1994), p. 391.
87. W.J. Cooper and R.G. Zika. *Nature* 220 (1983), p. 711.
88. W.J. Cooper, E.S. Saltzman and R.G. Zika. *J. Geophys. Res.* 92 (1987), p. 2970.
89. W.J. Cooper and D.R.S. Lean. *Environ. Sci. Technol.* 23 (1989), p. 1425.
90. R. Szymczak and T.D. Waite. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 39 (1988), p. 289.

116. Guerrieri, G.E. De Benedetto, F. Palmisano and P.G. Zambonin. *Analyst* 120 (1995), p. 2731.
117. Riklin and I. Willner. *Anal. Chem.* 67 (1995), p. 4118.
118. E.N. Navera, K. Sode, E. Tamiya and I. Karube. *Biosens. Bioelectron.* 6 (1991), p. 675.
119. R. Rouillon, N. Mionetto and J.-L. Marty. *Anal. Chim. Acta* 268 (1992), p. 347.
120. W. Stavinoha and S.T. Weintraub. *Anal. Chem.* 46 (1974), p. 757.
121. H. Stadler and T. Nesselhut. *Neurochem. Int.* 9 (1986), p. 127.
122. O. Niwa, T. Horiuchi, M. Morita, T. Huang and P.T. Kissinger. *Anal. Chim. Acta* 318 (1996), p. 167.
123. M. Gotoh, E. Tamiya, M. Momoi, Y. Kagawa and I. Karube. *Anal. Lett.* 20 (1987), p. 857.
124. K. Honda, K. Miyaguchi, H. Nishino, H. Tanaka, T. Yao and K. Imai. *Anal. Biochem.* 153 (1986), p. 50.
125. J.R. Wetherell and M.C. French. *Biochem. Soc. Trans.* 14 (1986), p. 1148.
126. E.A. Van Der Zee, P.G.M. Luiten. *Progr. Neurobiol.*, 1999, 58, 409-471
127. R.M.J. Palmer, A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nature* 327 (1987) 524
128. R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki, *Nature* 288 (1980) 373.
129. L.J. Ignarro, G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns, and G. Chaudhuri, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 9265
130. R. B. Silverman, H. Huang, M.A. Marletta, and P. Martasek, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 2813
131. R.G. Knowles, M. Palacios, R.M.J. Palmer, and S. Moncada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 5159
132. K. Kikuchi, T. Nagano, H. Hayakawa, Y. Hirata, and M. Hirobe, *Anal. Chem.* 65(1993) 1794
133. G.L. Petriconi, H.M. Papee, *Can. J. Chem.*, 44 (1966) 977
134. M. Massom, A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, 166 (1984) 111
135. M. Hecker, J.A. Mitchell, H.J. Harris, M. Katsura, C. Thiemermann, J.R. Vane, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 167(3) (1990) 1037
136. V.K. Svedas, I.J. Galev, I.L. Borisov, I.V. Berezin, *Anal. Biochem.*, 101 (1980) 188
137. H.Q. Zhang, W. Fast, M.A. Marletta, P. Martasek, R.B. Silverman, *J. Med. Chem.*, 40 (1997) 3869

162. Barton M. *Cardiovasc. Res.* 2000, 46, 20-23
163. Qian M. Eaton J. W. *Free Rad. Biol. Med.* 2000, 28, 652-656
164. Pieper G.M, *Hypertension*, 1998,31, 1047-1060
165. Willenborg D.O.; Staykova M.A.; Cowden W.B. *J. Neuroimmunol.*, 1999,100, 21-35
166. Yao D. Evmiridis N.P. *Microchimic Acta* (Submitted)
167. Woitzik J.; Abromeit N.; Schaefer F. *Anal. Biochem.*, 2001, 289, 10-17
168. Tunçel M, Dogrukol-Ak D. Erkasap N. *J. Chromatogr. B:* 2001, 751, 257-263
169. Kitamura Y.; Uzawa T.; Oka K.; Komai Y.; Ogawa H.; Takizawa N.; Kobayashi H.; Tanishita K., *Anal. Chem.*, 2000, 72, 2957-2962
170. Campanella L., Tomassetti, L.P.M. *Sens. Actuators, B.* 2000, 68, 351-359
171. Rivot J.P. , Barraud J., Montecot C., Jost B., Besson J.M. *Brain Res.* 1997; 773: 66-75
172. Maskus M., Pariente F., Wu Q., Toffanin A., Shapleigh J.F. and Abruna H.D. *Anal. Chem.* 1996; 68: 3128-34
173. Broillet M.C., Randin O., Chatton J. Y. *FEBS Lett.* 2001, 491, 227-232
174. Fang Q, Shi X, Sun Y, Fang Z. *Anal. Chem.* 1997, 69, 3570-3577
175. Glossmann H., Petrischor G., Bartsch G. *Experimental Gerontology* 1999, 34, 305-318
176. Feng Q., Lu X., Fortin A.J., Pettersson A., Hedner T., Kline R.L., Arnold J.M.O. *Cardiovasc. Res.* 1998, 37, 667-675
177. Nappi A.J., Vass E. *Biochimica Biophys. Acta* 1998, 1380, 55-63
178. Silverman R.B., Huang H., Marletta M.A., Martasek P. *J. Med. Chem.* 1997, 40, 2813-2817
179. Park J., Tran P.H., Chao J.K.T., Ghodadra R., Rangarajan R., Thakor N.V. *Biosensors and Bioelectronics* 1998, 13, 1187-1195
180. Minning D.M.; Gow A.J.; Bonaventura J.; Braun R.; Dewhirst M.; Goldberg D.E.; Stamler J.S. *Nature*, 1999, 401, 497-502
181. M.I. Davies. *Anal. Chim. Acta*, 1999, 379, 227-249
182. T. Tsai. *J. Chromatogr. B.* 747 (2000) 111-122
183. L. Doretti, D. Ferrara, S. Lora, F. Schiavon, F. M. Veronese. *Enzyme and Microbial Technology.* 27 (2000) 279-285
184. J. Marty, K. Sode, I. Karube. *Anal. Chim. Acta.* 228 (1989) 49-53
185. T. Yao. *Anal. Chim. Acta.* 153 (1983) 169-174

210. Y. Kostov, S. Tzonkov, L. Yotova, M. Krysteva. *Anal. Chim. Acta.* 280 (1993) 15-19
211. D. S. Bindra, Y. Zhang, G. S. Wilson, R. Sternberg, D. R. Thevenot, D. Moatti, G. Reach. *Anal. Chem.* 63 (1991) 1692-1696
212. M. Xu, R. V. Lewis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 (1990) 7120-7124
213. R. W. Marshall T. D. Gibson. *Anal. Chim. Acta.* 266 (1992) 309-315
214. J. Li, S. N. Tan, H. Ge. *Anal. Chim. Acta.* 335 (1996) 137-145
215. M. S. Abedel-Latif, G. G. Guibault. *Anal. Chem.* 60 (1988) 2671-2674
216. S. Mueller. *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 410-415
217. K. Yamamoto, T. Ohgaru, M. Torimura, H. Kinoshita, K. Kano, T. Ikeda. *Anal. Chim. Acta.* 406 (2000) 201-207
218. S. Jung, G.S. Wilson. *Anal. Chem.* 68 (1996) 591-596

σταθερού pH. Το NO μπορεί να παράγεται μέσω ανόργανων μεθόδων και να καθαρίζεται (on-line) συνεχώς. Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν πρότυπη μέθοδος παραγωγής αερίου NO για την βαθμονόμηση.

Σχεδιάστηκε μια ειδική εκλεκτική μεμβράνη για το NO που βρίσκεται σε βιολογικά υγρά. Η μεμβράνη αποτελείται από μια ταινία οξικής κυτταρίνης με MWCO 100 και μια επίστρωση από Nafion. Η μεμβράνη βελτιώθηκε ώστε να είναι ελεύθερη από παρεμποδίσεις. Με την χρησιμοποίηση αυτής της ελεύθερης από παρεμποδίσεις μεμβράνης που συνδέεται με το σύστημα χημειοφωταύγειας, επιτεύχθηκε ανίχνευση του NO από βιολογικά υγρά με υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Επιπλέον, τα αναγωγικά αντιδραστήρια όπως το NADPH, το ασκορβικό οξύ κ.λ.π. χρησιμοποιήθηκαν για να παρατείνουν το χρόνο ημιζωής του NO που παράγεται εργαστηριακά (in vitro), (on-line) με παγίδευση ιχνών οξυγόνου. Με αυτή τη μέθοδο επιτεύχθηκε μεγάλη αύξηση της ευαισθησίας του NO.

Ένας ειδικός δειγματοληπτικός αισθητήρας διαπίδυσης που συνδέθηκε με το σύστημα χημειοφωταύγειας, εμφυτεύτηκε στο αγγειακό σύστημα του ιστού του εγκεφάλου για την απευθείας παρακολούθηση του NO εν ζωή (in vivo). Ο αισθητήρας βελτιώθηκε ώστε να είναι ελεύθερος από παρεμποδίσεις και αυτό το σύστημα ήταν αρκετά ευαίσθητο για να ελέγχει τη διακύμανση του NO in vivo με αύξηση του χρόνου δειγματοληξίας. Περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι ο σχηματισμός του NO in vivo επηρεάζονταν από την θερμοκρασία σώματος και ότι οι σχετικοί δότες NO, το Viagra, οι συμπαράγοντες NO, οι ενεργοποιητές NO προκαλούν αύξηση του NO in vivo. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση σχετικών αναστολέων όπως η Hb και CAT. Τελικά, περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι το σύστημά μας δεν επηρεάζονταν από το οξυγόνο που θεωρείται σαν η σημαντικότερη παρεμπόδιση.

Για την ανίχνευση H_2O_2 χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα αντίδρασης με χημειοφωταύγεια που στηρίζεται στη λουμινόλη και το $K_3[Fe(CN)_6]$. Η ευαισθησία της ανίχνευσης του H_2O_2 αυξήθηκε σημαντικά όταν μεταβάλλαμε τις σχετικές συνθήκες εργασίας όπως pH, ρυθμιστικά διαλύματα και τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων. Το σύστημα χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση διάφορων σχετικών βιολογικών υλικών τα οποία παράγουν H_2O_2 μέσω ενζυμικής αντίδρασης, όπως η Ach. Για την ανίχνευση της Ach έγινε ακινητοποίηση των σχετικών ενζύμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Γίνεται μελέτη της καταλυτικής δράσης της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) στην μετατροπή της αργινίνης σε NO και κιτρουλίνη. Ο στόχος είναι να αναπτυχθεί μία μέθοδος για ταυτόχρονη (on-line) παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης χρησιμοποιώντας την χημειοφωταύγεια (CL) που παράγεται από το NO στο σύστημα λουμινόλη-H₂O₂. Η καταλυτική δραστηριότητα βρέθηκε ότι ελαττώνεται με τον χρόνο σε έναν ενζυματικό αντιδραστήρα αλλά η δραστηριότητα ανακάθεται με προηγούμενη κατεργασία με ανανέωση του διαλύματος. Όταν η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με ταυτόχρονη (on-line) ανίχνευση του NO που σχηματίζεται in situ, χρησιμοποιώντας FIA/CL ανίχνευση, βρέθηκε ότι η απόκριση είναι περισσότερο ευαίσθητη όταν ακολουθείται μια παλμική διαδικασία δειγματοληψίας παρά όταν ακολουθείται μια μέθοδος συνεχούς ροής. Το δείγμα στην πρώτη περίπτωση είναι μικρό και εγχέεται περιοδικά μεταξύ περιοδικών κύκλων. Προσδιορίστηκαν οι συνθήκες βελτιστοποίησης για το pH, την θερμοκρασία και την ταχύτητα ροής. Η πρότυπη καμπύλη στις βέλτιστες συνθήκες είναι γραμμική με κλίση 0,127 για την συγκέντρωση της αργινίνης και ο σταθερός όρος δεν διαφέρει αξιοσημείωτα από το μηδέν. Η ακρίβεια είναι καλύτερη από 1% και η επίδραση από τα παρεμποδίζοντα που υπάρχουν στα βιολογικά υγρά βρέθηκε ότι είναι πολύ διαφορετική από μελέτες που έγιναν με απλό ένζυμο σε διάλυμα. Επιπλέον ο ακινητοποιημένος NOS-αντιδραστήρας βρέθηκε ότι έχει μεγάλο χρόνο ζωής.

Περιγράφεται μια μέθοδος on-line παρακολούθησης που στηρίζεται σε διάταξη έγχυσης δείγματος σε ροή με ανίχνευση χημειοφωταύγειας. Η μέθοδος προσαρμόζεται για τον προσδιορισμό του NO, μέσω των συμπλόκων του με βιοχημικά υλικά που φέρουν πορφυρινικό δακτύλιο. Η μέθοδος βελτιστοποιείται για μέγιστη δυνατή ευαισθησία και καλύτερο όριο ανίχνευσης. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη, απλή, γρήγορη και ακριβής. Οι αναλυτικοί παράμετροι της προτεινόμενης μεθόδου είναι: ευαισθησία περίπου $2.63 \times 10^5 \text{ mV} \cdot \text{mole}^{-1} \text{ NO}$, περιοχή εργασίας μεταξύ 2.0×10^{-5} και $1.0 \times 10^{-2} \text{ mole NO}$ (στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν), επαναληπτικότητα 1.0% σε περιοχή από 1.0×10^{-3} έως $1.0 \times 10^{-2} \text{ mole NO}$, συχνότητα περίπου πέντε δειγμάτων το λεπτό και όριο ανιχνευσιμότητας $1.0 \times 10^{-5} \text{ mole NO}$.

Αναπτύχθηκε επιτυχώς μια μέθοδος ανίχνευσης με χημειοφωταύγεια για την παρακολούθηση της ακετυλοχολίνης (ACh) και της χολίνης (Ch) στο νευρικό ιστό με ανίχνευση της ποσότητας του H₂O₂ που παράγεται έμμεσα από το σύστημα αντίδρασης Λουμινόλη- Εξακυανοσιδηρικό. Αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος ακινητοποίησης ενζύμου και παρασκευάστηκε μια ελεύθερη παρεμποδίσεων μεμβράνη προκειμένου να επιτευχθεί υψηλότερη απόκριση αισθητήρων με καλή εκλεκτικότητα και σταθερότητα για την ανίχνευση της ACh και της Ch. Σχεδιάστηκε μία νέα μέθοδος παρασκευής των δειγμάτων στην υδρόφιλη φάση με σκοπό να εκχυλίσουμε αποτελεσματικά την ACh και τη Ch από τους νευρικούς ιστούς. Η ACh και η Ch ανιχνεύθηκαν με αισθητήρες ACh, και Ch με πολύ υψηλή ευαισθησία. Ο αισθητήρας της Ch έχει όριο ανιχνευσιμότητας 0.03pmol (0.25nM X 120μl) με γραμμική περιοχή μεταξύ 4×10^{-8} και 1×10^{-4} M. Ο αισθητήρας της ACh έχει όριο ανιχνευσιμότητας 1,2pmol (10nM X 120μl) με γραμμική περιοχή μεταξύ 6×10^{-8} και 1×10^{-4} M.

NO in biological fluids is described. Horseradish peroxidase (HRP) was used as NO trapping solution, forming the stable compound HRP-NO. The HRP was denatured and the trapped NO was released from HRP-NO complex and detected by using luminol-H₂O₂ system. Using a mixed (size-exclusion and polar-based) transport control, the interference effect of various compounds was minimized. The method was used for NO monitoring in simulated samples, by using blood specimen as sample matrix. The detection limit is 0.9×10^{-6} mol and a calibration curve, linear in the range of 1.8×10^{-6} - 2.7×10^{-3} mol NO was constructed. The applied methodology was further used to prolong the NO lifetime in order to increase sensitivity in its determination. This was based on the increase of the response in the presence of certain reductive species, which act as NO preservatives in biological fluid ~~samples~~.

A new method employing a combination of microdialysis sampling and chemiluminescence detection was developed to monitor nitric oxide (NO) in vivo. A special probe was designed with an interference-free membrane to achieve a very high selectivity for NO. High sensitivity was achieved by optimizing the working system and improving the NO sampling time. This system was used in vivo to monitor blood and brain tissue in rats and rabbits. The system is sensitive enough to detect variations of NO formation under different physiological states. The linear valid range of NO determination is 5 nM-1 μ M, with a detection limit of 1 nM; real NO concentrations in test animals used in this work, were found to be in the range of 1-5 nM or even less. Finally, the effects of body temperature, NO donors, Viagra, NO activators, NO cofactors, NO interference (such as O₂) were investigated carefully in different physiological situations.

A chemiluminescence monitoring of acetylcholine (Ach) and choline (Ch) in the nerve tissue was developed successfully by detecting the quantity of H₂O₂ based on luminol-hexacyanoferrate reaction system. A new enzyme immobilization method was developed and an interference free membrane was prepared to achieve a higher sensor response with good selectivity and stability for the detection of Ach and Ch. A new sample preparation methods in hydrophilic phase was designed to extract Ach and Ch from nerve tissue efficiently, Ach and Ch were detected by related sensors accurately with very high sensitivity. The Ch sensor has detection limit of 0.03 pmol

(0.25nM×120μl) with linear range of 4×10^{-8} to 1×10^{-4} M. The Ach sensor has detection limit of 1.2pmol (10nM×120μl) with linear range of 6×10^{-8} to 1×10^{-4} M.

ABSTRACT

A study of the catalytic activity of ^mNitric oxide synthase (NOS) on the conversion of arginine to NO and citrulline is made. The target of this report is to establish a method for on-line monitoring the reaction process using the chemiluminescence (CL) generated from NO in the luminol-H₂O₂ system. The NOS-catalytic activity is found to be decreased with time on stream in a flow enzymatic reactor but the activity is recovered by proper treatment with restoring solution. The reaction process when monitored by on-line detection of NO formed in-situ, using FIA/CL-detection, the response is found more sensitive if a pulsed sampling procedure is employed rather than a continuous flow one; the sample in the former is small and is injected periodically between regeneration cycles. The optimized conditions of pH, of temperature, of flow rate were determined. The calibration curve under optimized conditions is linear with a slope of 0.127 mV.mM⁻¹ of arginine concentration and the intercept is not significantly different from zero; the precision is better than 1% and the effect of interferences present in biological fluids is found much different than ⁱⁿ studies made with ^{the} native enzyme in solution. Furthermore the immobilized NOS-reactor was found to be long lived.

An on-line NO monitoring method is described employing flow injection manifold with CL-detection. The method is tailored for monitoring the NO from its complexes with porphyrinic ring bearing biochemical materials. The method is optimized for optimum sensitivity and better detection limit. The method is quite sensitive, simple, rapid, and precise. A sensitivity of around 2.63x10⁵ mV.mole⁻¹ NO, a valid range of 2.0x10⁻⁵ up to 1.0x10⁻² mole of NO (under conditions used), a reproducibility of 1.0% at the range of 1.0x10⁻³ up to 1.0x10⁻² mole of NO, a frequency of around five samples per minute and a detection limit of 1.0x10⁻⁵ mole of NO are the analytical parameters for the proposed method.

The development of a chemiluminescence method based on the perm-selective properties of a Nafion-Cellulose acetate composite membrane for the monitoring of

Περιγράφεται η ανάπτυξη μιας μεθόδου χημειοφωταύγειας που βασίζεται στις περιμ-εκλεκτικές ιδιότητες μιας σύνθετης μεμβράνης Nafion-οξικής κυτταρίνης για την παρακολούθηση του NO στα βιολογικά υγρά. Η υπεροξειδάση (HRP) χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα παγίδευσης του NO, σχηματίζοντας την σταθερή σύνθεση ένωση HRP-NO. Η HRP μετουσιώθηκε και το παγιδευμένο NO απελευθερώθηκε από την σύμπλοκη ένωση HRP-NO και ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα λουμινόλη-H₂O₂. Η παρεμποδιστική δράση διαφόρων ενώσεων ελαχιστοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας έναν μικτό έλεγχο μεταφοράς, όσον αφορά τον αποκλεισμό μεγέθους και την πολικότητα. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση του NO σε προσομοιωμένα δείγματα με δείγμα αίματος ως μήτρα δειγμάτων. Το όριο ανιχνευσιμότητας είναι 0.9×10^{-6} mol και κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης που είναι γραμμική στην περιοχή 1.8×10^{-6} - 2.78×10^{-3} mole NO. Η μεθοδολογία, που εφαρμόστηκε, χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω για να παρατείνει τη διάρκεια ζωής του NO, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου προσδιορισμού του. Αυτό βασίστηκε στην αύξηση της απόκρισης παρουσία ορισμένων αναγωγικών ειδών, τα οποία ενεργούν ως συντηρητικό του NO στα υγρά βιολογικά δείγματα.

Αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος που συνδυάζει δειγματοληψία με μικροδιαπίδυση και ανίχνευση με χημειοφωταύγεια, προκειμένου να προσδιοριστεί το οξειδίο του αζώτου (NO) in vivo. Σχεδιάστηκε ένας δειγματοληπτικός αισθητήρας με μια ελεύθερη παρεμποδίσεων μεμβράνη για να επιτευχθεί πού υψηλή εκλεκτικότητα NO. Η υψηλή ευαισθησία επιτεύχθηκε με τη βελτιστοποίηση του συστήματος και την βελτίωση του χρόνου δειγματοληψίας του NO. Αυτό το σύστημα χρησιμοποιήθηκε in vivo για την παρακολούθηση του αίματος και του ιστού του εγκεφάλου στα ποντίκια και τα κουνέλια. Το σύστημα είναι αρκετά ευαίσθητο για να ανιχνεύει μεταβολές στην παραγωγή NO σε διαφορετικές φυσιολογικές καταστάσεις. Το σύστημα μπορεί να ανιχνεύσει το NO στη γραμμική περιοχή 5nM-1μM με όριο ανιχνευσιμότητας 1nM. Οι πραγματικές συγκεντρώσεις NO στα πειραματόζωα βρέθηκε ότι είναι στην περιοχή 1-5nM ή και μικρότερη. Τέλος μελετήθηκαν προσεκτικά σε διαφορετικές φυσιολογικές καταστάσεις, οι επιδράσεις από την θερμοκρασία του σώματος, από τους δότες NO, από το Viagra, από τους ενεργοποιητές NO, από τους συμπαράγοντες NO, από παρεμποδιστές του NO (όπως το O₂).

(AChE και ChOD) σε μια ειδική ελεύθερη παρεμποδίσων μεμβράνη και τελικά η ACh ανιχνεύτηκε από βιολογικές πηγές (ιστό εγκεφάλου) με μεγάλη ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Επιπλέον, αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος ακινητοποίησης ενζύμου με σκοπό να επιτύχουμε την βέλτιστη δραστηριότητα του ενζύμου. Επίσης αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος παρασκευής μεμβρανών ώστε να έχουμε ανίχνευση μεγάλης εκλεκτικότητας και ελεύθερη από παρεμποδίσεις. Τελικά, αναπτύχθηκε επιτυχώς μια νέα διαδικασία παρασκευής δείγματος ACh από τον ιστό εγκεφάλου με εκχύλιση στην υδρόφιλη φάση.

Συμπερασματικά, το σχετικό σύστημα για ανίχνευση βιολογικών υλικών *in vitro* ή *in vivo* σε συνδυασμό με τεχνικές χημειοφωταύγειας σχεδιάστηκε επιτυχώς και είχε μεγάλη ευαισθησία και εκλεκτικότητα.

4. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αντίδραση χημειοφωταύγειας και οι σχετικές τεχνικές μας προσφέρουν ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση βιολογικών υλικών με υψηλή ευαισθησία, εκλεκτικότητα και επαναληπτικότητα.

Η διάταξη έγχυσης δείγματος σε ροή αντιδραστήριου συνδεδεμένη με σύστημα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας και σχετικές τεχνικές μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ανιχνεύσει βιολογικά υλικά σε εργαστηριακές εφαρμογές (in vitro), με ταυτόχρονη (on-line) παρακολούθηση, υψηλή ευαισθησία και επαναληπτικότητα. Οι δειγματολήπτες διαπίδυσης που συνδέονται με το σύστημα χημειοφωταύγειας και οι σχετικοί αισθητήρες διαπίδυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας για την ανίχνευση βιολογικών υλικών εν ζώη (in vivo) με πολύ μεγάλη ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Οι νέοι μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων και παρασκευής μεμβρανών μας προσφέρουν ικανοποιητική δραστηριότητα του ενζύμου και ελεύθερο από παρεμποδίσσεις βιολογικών παραγόντων σύστημα ανίχνευσης.

Η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) μπορεί να ακινητοποιηθεί σε ελεγχόμενων πόρων γυάλινα σφαιρίδια (CPG) με υψηλή δραστηριότητα και το NO παράγεται μέσω του NOS από την L-αργινίνη παρουσία EDTA-Ca²⁺. Η δραστηριότητα του ακινητοποιημένου NOS ήταν ανεξάρτητη από το NADPH, την καλμοδουλίνη και την H4BP που θεωρούνται σαν απαραίτητοι συμπαράγοντες του NOS. Οι χαρακτήρες του ακινητοποιημένου NOS έδειξαν μεγάλες διαφορές σε σχέση με εκείνους του ελεύθερου NOS. Το NOS μπορεί να παράγει ικανοποιητικά NO σε εργαστηριακή εφαρμογή (in vitro) στις βέλτιστες τιμές pH, θερμοκρασίας και ρυθμιστικής ικανότητας, και το NO μπορεί να ανιχνευτεί ταυτόχρονα (on-line) με υψηλή ευαισθησία, χρησιμοποιώντας την αντίδραση χημειοφωταύγειας. Το παραχθέν NO ποσοτικοποιείται με έλεγχο της διακύμανσης της L-αργινίνης με φασματοσκοπία υπεριώδους ή φθορισμού.

Το μονοξείδιο του αζώτου παγιδεύεται από πορφυρινικά υλικά (Hb, HRP, CAT) που θεωρούνται ότι έχουν υψηλή συγγένεια με το NO. Οι συζευγμένες με NO πορφυρινικές ενώσεις αποικοδομούνται με όξινο διάλυμα EDTA και το NO απελευθερώνεται. Τελικά, το NO ανιχνεύτηκε με χημειοφωταύγεια εντός διαλύματος

186. J. D. Salamone, D. B. Neill. *Anal. Chim. Acta.* 146 (1983) 149-159
187. M. Mascini, D. Moscone. *Anal. Chim. Acta.* 179 (1986) 439-444
188. J. Z. Stemple, K. M. Rusin, T. L. Fare. *Anal. Chem.* 63 (1991) 1050-1052
189. Y. Ikarashi, T. Sasahara, Y. Maruyama. *J. Chromatogr.* 322 (1985) 191-199
190. M. G. Garguilo, N. Huynh, A. Proctor, A. C. Michael. *Anal. Chem.* 65 (1993) 523-528
191. W. R. Seitz. *Methods Enzymol.* 57(1978) 445-462
192. K. F. O'Driscoll. *Methods Enzymol.* 44 (1976) 169-183
193. G. P. Hicks, S.J. Updike. *Anal. Chem.* 38(1966) 726-730
194. M. Wilchek, E. A. Bayer. *Anal. Biochem.* 171 (1988) 1-32
195. J. Anzai, H. Takeshita, Y. Kobayashi, T. Osa, T. Hoshi. *Anal. Chem.* 70 (1998), 811-817
196. H. Ji, E. Wang. *J. Chromatogr.* 410 (1987) 111-120
197. P. Trocellier. *Annales de Chimie Science des Matériaux*, 2000, 25, 321-337
198. S. Cosnier. *Biosens. Bioelectr.* 1999, 14, 443-456
199. R. A. De Lorenzo. *J. Emergency Med.* 1996, 14, 603-613
200. M. L. D. Gougar, B. E. Scheetz, D. M. Roy. *Waste Management*, 1996, 16, 295-303
201. B. E. Scheetz, D. K. Agrawal, E. Breval, R. Roy. *J. Rock Mechanics Mining Sci. & Geomechanics Abstr.* 1995, 32, 213A
202. F. U. Gast, I. Franke, G. Meiss, A. Pingoud. *J. Biotechnol.* 2001, 87, 131-141
203. J. E. Ramírez-Vick, A. A. García, J. Lee. *Reactive and Functional Polymers*, 2000, 43, 53-62
204. Q. Yang, X. Liu, J. Miyake, H. Toyotama. *Molecular Electronics and Biocomputing; Supramolecular Science*, 1998, 5, 769-772
205. Q. Yang, X. Liu, S.I. Ajiki, M. Hara, P. Lundahl, J. Miyake. *J. Chromatogr. B: Biomedical Applications*, 1998, 707, 131-141
206. B. Priem, G. Chambat, K. Ruel, J. Joseleau. *J. Carbohydr. Chem.* 1997, 16, 625-634
207. C. Wang, S. Hitz, J. D. Andrade, R. J. Stewart. *Biochemistry*, 1997, 246, 133-139
208. Cordiano, A. Steffan, M. L. Randi, P. Pradella, A. Girolami, F. Fabris. *J. Immunol. Methods*, 1995, 178, 121-130
209. M. A. Krysteva, S. R. Blagov. T. T. Sokolov. *J. Appl. Biochem.* 6 (1984) 367-373

138. D.S. Bredt, S.H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1990) 682
139. R. Wilson, D.J. Sohiffrin, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1254
140. S. Moncada, R.M.J. Palmer and E.A. Higgs, *Pharmacol. Rev.*, 43 (1991) 109.
141. J.P. Rivot, J. Barraud, C. Montecot, B. Jost, J. Besson, *Brain Res.* 773 (1997) 66
142. H. Kosaka, M. Watanabe, H. Yoshihara, N. Harada and T. Shiga, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184 (1992) 1119
143. M. Sonoda, J. Kobayashi, M. Takezawa, T. Miyazaki, T. Nakajima, H. Shimomura, K. Koike, A. Satomi, H. Ogino, R. Omoto and T. Komoda, *Anal. Biochem.*, 247 (1997) 417
144. J. Meyer, N. Richter and M. Hecker, *Anal. Biochem.* 247 (1997) 11
145. P.J. Durrant and B. Durrant *Introduction to Advanced Inorganic Chemistry* 2nd edition Longman Group LTD, London, 1970, pp. 685
146. R-K. Smith *Handbook of Environmental Analysis*, 2nd Edition, Genium Publishing Corporation, 1994, p.p.173-4
147. R. J. Gryglewski, R.M.J. Palmer and S. Moncada, *Nature*, 320 (1986) 454
148. J. S. Stamler, D. J. Singel, J. Loscalzo, *Science* 258 (1992) 1898.
149. S. Moncada, R. M. Palmer E. A. Higgs, *Pharm. Rev.* 43 (1991) 109.
150. X., Zhang L., Cardosa M., Broderick Fein Harry J. Lin, *Electroanalysis* 12 (2000) 1113.
151. L.J. Anderson, L.A. Coury Jr., J. Leddy, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 519.
152. B. Benko, N. Yu., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 7042.
153. J. Wang, P. Tuzhi, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 3257.
154. M. N. Szentirmay C. R. Martin, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 1898.
155. T. Aoki, M. Wakabayashi. *Anal. Chim. Acta.* 308 (1995) 308.
156. A.B. Florou, M.I. Prodromidis, M.I. Karayannis, S. M. Tzouwara-Karayanni, *Electroanalysis*, 12 (2000)113.
157. M. I. Prodromidis, S. M. Tzouwara-Karayanni, M.I. Karayannis, P. M. Vadgama, *Analyst* 122 (1997)1101.
158. S. Moncada, R. M. J. Palmer, R. J. Gryglewski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (1986) 9164.
159. N. S. Kwon, C. F. Nathan, D. J. Stuehr, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 20496.
160. R. G. Knowles, M. Palacios, R. M.J. Palmer, S. Moncada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (1989) 5159.
161. Buzard G.S.; Kasprzak K.S. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2000,19, 179-199

91. K.G. Zika, J.W. Moffett, R.G. Petasne, W.J. Cooper and E.S. Saltzman. *Geochim. Cosmochim. Acta* 49 (1985), p. 1173.
92. R. Weller and O. Schrems. *Geophys. Res. Lett.* 20 (1993), p. 125.
93. B. Palenik and F.M.M. Morel. *Limnol. Oceanogr.* 33 (1988), p. 1606.
94. S.E. Stevens Jr, C.O.P. Patterson and J. Myers. *J. Phycol.* 9 (1973), p. 427.
95. W.J. Cooper and R.G. Zepp. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 47 (1990), p. 888.
96. J.W. Moffett and G.C. Zafiriou. *J. Geophys. Res.* 98 (1993), p. 2307.
97. P. Westbroek, E. Temmerman, F. Govaert and B. Van Haute. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 106 (1997), pp. 755-758.
98. H. Frebel, G.-C. Chemnitz, K. Cammann, R. Kakerow, M. Rospert and W. Mokwa. *Sens. Actuators, B* 43 (1997), pp. 87-93.
99. S. Gamburgzev, P. Atanasov, A.L. Ghindils, E. Wilkins, A. Kalsheva and I. Iliev. *Sens. Actuators, B* 43 (1997), pp. 70-77.
100. H. Huang and P.K. Purnendu. *Talanta* 44 (1997), pp. 605-615.
101. Y. Hahn and C.L. Olson. *Anal. Chem.* 51 (1979), p. 444.
102. J.J. Kulys, M.V. Pesliakiene and A.S. Samalius. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 8 (1981), p. 81.
103. F.A. Armstrong and A.M. Lannon. *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987), p. 7211.
104. Furness, J.B. and Costa, M., *The Enteric Nervous System*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1987, 61 pp.
105. K. McConalogue and J.B. Furness, *Gastrointestinal neurotransmitters*, Baillière's *Clin. Endocrinol. Metabol.* 8 (1994), pp. 51-76
106. P. Durand, A. David and D. Thomas. *Biochim. Biophys. Acta* 527 (1978), p. 277.
107. R. Tor and A. Freeman. *Anal. Chem.* 58 (1986), p. 1042.
108. C. Tran-Minh, P.C. Pandey and S. Kumaran. *Biosens. Bioelectron.* 5 (1990), p. 461.
109. K. Stein and G. Schwedt. *Anal. Chim. Acta* 272 (1993), p. 73.
110. C. Eppelsheim and N. Hampp. *Analyst* 119 (1994), p. 2167.
111. J.-L. Marty, K. Sode and I. Karube. *Anal. Chim. Acta* 228 (1989), p. 49.
112. R.M. Morelis and P.R. Coulet. *Anal. Chim. Acta* 231 (1990), p. 27.
113. U. Loeffler, U. Wollenberger, F. Scheller and W. Goepel. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 335 (1989), p. 295.
114. M. Mascini and D. Moscone. *Anal. Chim. Acta* 179 (1986), p. 439.
115. M. Masoom. *Anal. Chim. Acta* 214 (1988), p. 173.

42. Osipov A. N., Gorbunov N. V., Day B.W., Elsayed N.M., Kagan V.E. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 193-203
43. Ichimori K., Arroyo C.M., Nakazawa H. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 203-11
44. Akaike T., Maeda H. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 211-22
45. Kotake Y. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 222-9
46. Kozlov A., Bini A., Iannone A., Zini I. Tomasi A. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 229-37
47. Grisham M.B., Johnson G.G., Lancaster J.R. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 237-47
48. Lewis R.S., Deen W.M. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 247-59
49. Thomsen D.D., Laurendeau N.M. *Combust Flame*, 2001, 124, 350-369
50. Woitzik J.; Abromeit N.; Schaefer F. *Anal. Biochem.*, 2001, 289, 10-17
51. Latovika J. *Journal of Atmospheric and Solar-Terrestrial Physics*, 2001, 63, 21-28
52. Liu Z., Liu X, Yim A.P.C., He G, *Ann. Thoracic Surgery*, 2001, 71, 133-137
53. Lastovicka J. *Journal of Atmospheric and Solar-Terrestrial Physics*, 2001, 63, 21-28
54. Liu Z.-G.; Liu X.-C.; Yim A.P.C.; He G.-W. *Ann Thoracic Surgery*, 2001, 71, 133-137
55. Clayton S. Cooper and Normand M. Laurendeau, *Combust Flame*, 2000, 123, 175-188
56. Ravikrishna R.V. Laurendeau N.M, *Combust Flame*, 2000, 122, 474-482
57. Kitamura Y.; Uzawa T.; Oka K.; Komai Y.; Ogawa H.; Takizawa N.; Kobayashi H.; Tanishita K., *Anal. Chem.*, 2000, 72, 2957-2962
58. McMurtry, M.S.; Kim, D.H.; Dinh-Xuan, Tuan; Archer, S.L. *Analysis*, 2000, 28, 455-465
59. Xian Y.; Zhang W.; Xue J.; Ying X.; Jin L *Anal. Chim. Acta*, 2000, 415, 127-133
60. Ravikrishna R.V, Laurendeau N.M. *Combust Flame*, 2000, 120, 372-382
61. Berkels R.; Dachs C.; Roesen R.; Klaus W. *Cell Calcium*, 2000, 27, 281-286
62. Xian Y.; Zhang W.; Xue J.; Ying X.; Jin L.; Jin J. *Analyst*, 2000, 125, 1435-1439
63. Yamada K.; Nabeshima T. *Folia Pharmacologica Japonica*, 2000, 115, 99-104
64. Lopez B.L.; Davis-Moon L.; Ballas S.K.; Ma X.-J. *Am. J. Hematol.*, 2000, 64, 15-19
65. Combet S.; Balligand J.-L.; Lameire N.; Goffin E.; Devuyst O., *Kidney Int*, 2000, 57, 332-338

3.7 ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Djamgoz M.B.A.; Sekaran S.; Angotzi A.R.; Haamedi S.; Vallerga S.; Hirano J.; Yamada M, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 2000,355,1199-1203
2. Buzard G.S.; Kasprzak K.S. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2000,19, 179-199
3. Ashutosh K, *Current Opin. Pulmon. Med*, 2000, 6, 21-25
4. Conway P.J.; Jones N.S. *Clin. Otolaryngol. Allied Sei.* 2000, 25, 337-341
5. Lecomte P.V.; De Mulder P.A.; Adriaensen H.F.; De Hert S.G., *Acta Anaesthesiol Belgica*, 1999,50,105-112
6. Willenborg D.O.; Staykova M.A.; Cowden W.B. *J. Neuroimmunol.*, 1999,100, 21-35
7. Mavroudis C. *Crit. Care Med*, 1999,27, 877
8. Perner A.; Rask-Madsen J. *Aliment. Pharmac. Therapeut.* 1999,13,135-144
9. Zidek Z. Maek K. *Intern. J. Immunopharmacol.*, 1998, 20, 319-343
10. Weinberg J.B. *Mol. Med.*, 1998, 4, 557-591
11. Pieper G.M, *Hypertension*, 1998,31, 1047-1060
12. De Groote K.; Van Overmeire B, *Tijdschrift voor Geneeskunde*, 1998,54, 817-823
13. Weight S.C.; Nicholson M.L, *Eur. J Vas. Endovas. Surgery*,1998,16, 98-103
14. Bruch-Gerharz D.; Ruzicka T.; Kolb-Bachofen V. *Arch. Dermatol Res.*, 1998,290, 643-651
15. Goldman A.; Brown L.R.; Schoenfeld W.G.; Spencer M.N.; Chackerian C.Jr; Giver L.P.; Dothe H.; Rinsland C.P.; Coudert L.H.; Dana V.; Mandin J.-Y. *J Quantit. Spectroscopy and Radiative Transfer*, 1998, 60, 825-838
16. Aarna I. Suuberg E.M. *Fuel*, 1997, 76, 475-491
17. Petr V. Gustav E. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1997, 62, 1355-1384
18. Krafft P.; Metnitz P.G.H.; Fridrich P.; Krenn C.G.; Hammerle A.F.; Steltzer H. *Clin. Intens. Care*, 1997, 8,27-32
19. Burnett A.L. *Urology*, 1995,45, 1071-1083
20. Barton M. *Cardiovasc. Res.* 2000, 46, 20-23
21. Kosaka H., Watanabe M., Yoshihara H., Harada N. and Shiga T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 184/2: 1119-24

υδρολυθεί σε CH από ίχνη εστεράσης. Αφ' ετέρου, η απόκριση του αισθητήρα της Ach στο σωλήνα β και γ είναι υψηλότερη. Πιθανόν η εστεράση έχει απενεργοποιηθεί πλήρως. Η μέθοδος με τη χρησιμοποίηση διαλυμάτων EDTA-SDS εμφάνισε καλύτερα αποτελέσματα απ' ότι χρησιμοποιώντας EDTA. Το όξινο διάλυμα EDTA-SDS είναι αρκετά ικανό ώστε να απενεργοποιήσει το ένζυμο της εστεράσης του νευρικού ιστού. Επιπλέον, η ολική συγκέντρωση της Ach και της CH σε τρία δείγματα δεν εμφάνισε μεγάλη διαφορά. Αυτό δείχνει ότι η μέθοδος ανίχνευσής μας είναι αξιόπιστη και ακριβής. Επίσης, στην εργασία μας, το δείγμα αίματος, έχει ελεγχθεί επίσης από αισθητήρες Ach και CH, αλλά καμία απόκριση δεν λαμβάνεται. Αυτό δείχνει ότι η συγκέντρωση στο αίμα για την Ach και τη CH είναι πολύ χαμηλή, μικρότερη από το όριο ανιχνεσιμότητας των 5nM CH και 10nM της Ach.

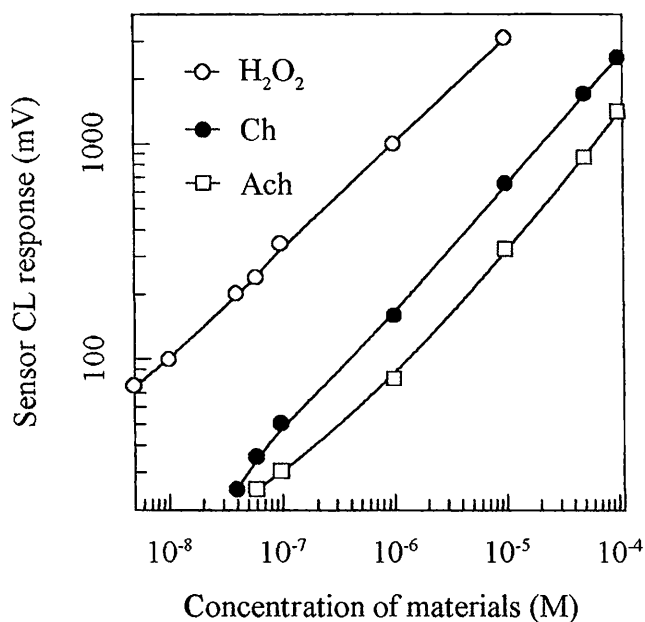
Σταθερότητα των αισθητήρων.

Η σταθερότητα των αισθητήρων εξαρτάται κυρίως από τη δραστικότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου και το λέρωμα της εξωτερικής επίστρωσης Nafion. Τα ακινητοποιημένα ένζυμα είναι σταθερά και διατηρούν 65% τη δραστικότητάς τους μετά από έναν μήνα. (Βλ.πίνακα 2). Στην πράξη, η μεμβράνη διατήρησε την επιθυμητή δραστικότητα και σταθερότητα όταν αποθηκεύτηκε σε PBS 4°C.

Πίνακας 3. Ιδιότητες απόκρισης για αισθητήρες H₂O₂, Ach και Ch.

Sensor	sample volume (μl)	detection limit (M)	detection limit (pmol)	linear range (M)	Linear regression (lgY=a+blgX)		
					Intercept (±std. Err)	Slope (±std. Err)	correlation coefficient (r)
					a	b	(r)
H ₂ O ₂	120	2.5×10 ⁻¹⁰	0.03	5×10 ⁻⁹ - 1×10 ⁻⁵	5.962±0.040	0.494±0.006	0.9997
Ch	120	5.0×10 ⁻⁹	0.6	4×10 ⁻⁸ - 1×10 ⁻⁴	5.711±0.048	0.579±0.008	0.9995
Ach	120	1.0×10 ⁻⁸	1.2	6×10 ⁻⁸ - 1×10 ⁻⁴	5.260±0.128	0.543±0.022	0.997

Σχήμα 2 Καμπύλες βαθμονόμησης για αισθητήρες H₂O₂, Ch και Ach.



Μελέτη των παρεμποδίσεων.

Για την ανίχνευση της CH και της Ach, το ενδιαφέρον προϊόν μας είναι το H₂O₂. Η επιτυχής διάχυσή του στο ρεύμα S3 μέσω της μεμβράνης μπορεί να επιτυγχάνει υψηλότερη απόκριση. Σε αυτήν την εργασία, υπάρχουν δύο δυνατότητες απώλειας του H₂O₂. Η μια είναι ότι το H₂O₂ μπορεί να εκπλυθεί μέσω του εξωτερικού στρώματος Nafion από το ρεύμα S4 πριν από τη επιτυχή διάχυσή του. Δεύτερο είναι ότι το H₂O₂ καταστρέφεται εύκολα από κάποια πιθανή παρεμπόδιση, ειδικά από το ασκορβικό οξύ. Σύμφωνα με προηγούμενη εργασία μας [80], προκειμένου να

εργασία μας, με την προσθήκη ιχνών GA, το πρόβλημα διύλισης ελαχιστοποιήθηκε. Από τη μέθοδο ε, με τη χρησιμοποίηση του συστήματος Βιοτίνης-στρεπταβιδίνης, το ένζυμο απέκτησε την υψηλότερη δραστικότητα. Αυτό το είδος μεθόδου ακινητοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε άλλα ένζυμα για περαιτέρω εφαρμογές.

Σαν συμπέρασμα, η μέθοδος ε θεωρήθηκε η καλύτερη μέθοδος ακινητοποίησης με την υψηλότερη δραστικότητα και σταθερότητα .

Πίνακας 2. Διάφοροι μέθοδοι ακινητοποίησης με την τιμή απόκρισης του αισθητήρα και την σταθερότητα.

Immobilization method	Response time (seconds)	Response value in 1h (mV)	Response value in 5 h (mV)	Response value in 12 h (mV)	Response value in 1week (mV)	Response value in 1month (mV)
Method A (E+BSA)	45	310	250	150	100	75
Method B (E+BSA+GA)	55	250	245	240	200	150
Method C (E+PA)	75	310	280	200	120	80
Method D (E+PA+GA)	75	300	290	260	220	180
Method E (E+SA+PA+GA)	70	320	310	300	260	210

Εξωτερική ταινία προστασίας.

Η εξωτερική ταινία χρησιμοποιήθηκε για να προστατεύσει το ενζυμικό στρώμα και για να απομακρυνθούν κάποιες παρεμποδίσεις. Στην εργασία μας, δύο είδη ταινίας χρησιμοποιήθηκαν. Η μια είναι ταινία Nafion, και η άλλη είναι ταινία πολυουρεθάνης (PU). Στην πράξη, η τιμή απόκρισης για την ταινία PU ήταν μικρή. Αυτό πιθανώς συνέβη επειδή αναγωγικά αντιδραστήρια στα βιολογικά ρευστά, ειδικά το ασκορβικό οξύ, πέρασαν διαμέσου της ταινίας PU και κατέστρεψαν μερικώς το H₂O₂. Τελικά, πήραμε καλή τιμή απόκρισης από την ταινία Nafion, δεδομένου ότι η ταινία Nafion

διάχυσής τους στο αγγειακό σύστημα του πειραματόζωου, ειδικά το K^+ είναι θανάσιμο για το ζώο. Στην περίπτωση μας, λίγο Na^+ είναι αποδεκτό λόγω της χρήσης διαλύματος $NaOH$ για τη ρύθμιση του pH του HEPES. Επιπλέον, το ρεύμα S3 έχει όσο το δυνατόν χαμηλότερη ιονική ισχύ Na^+ . Αυτό θα οδηγήσει σε μια υψηλότερη ωσμωτική πίεση μεταξύ S4 και S3 και σε μεγαλύτερη ταχύτητα διάχυσης του H_2O_2 .

Προετοιμασία μεμβρανών.

Η μεμβράνη από από τρία διαφορετικά στρώματα. Αυτά τα τρία διαφορετικά στρώματα έχουν διαφορετική λειτουργία, αλλά γενικά, η μεμβράνη πρέπει να επιτυγχάνει μεγαλύτερη ταχύτητα διάχυσης για το H_2O_2 , να είναι ελεύθερη από παρεμποδίσεις, να έχει υψηλή δραστηριότητα για ακινητοποίηση ενζύμων .

Πίνακας 1. Ιδιότητες διαφορετικών ειδών υποστηρικτικών ταινιών.

Support film	Pore size	thickness (μm)	MWCO (Dalton)	mechanic strength and flexibility	protein binding ability	interference proof ability
Pure Nitrocellulose (NC)	0.22 μm	120 μm	>20,000	Good	Good	Very poor
Cellulose acetate (CA)	0.6nm	20 μm	100-150	Poor	Poor	Good
Dialysis tubing 1 (DT1)	2.5nm	60 μm	3500	Good	Poor	Poor
Dialysis tubing 2 (DT2)	1nm	70 μm	500	Good	Poor	Poor
Dialysis tubing 3 (DT3)	0.5nm	80 μm	100	Good	Poor	Good
Activated DT3	0.6nm	65-70 μm	100-150	Good	Good	Good

Ταινία υποστήριξης.

Αυτή η επίστρωση επιλέχθηκε για να αυξήσει την μηχανική αντοχή και να επιτρέπει ικανοποιητική ταχύτητα διάχυσης για το $[H_2O_2]$. Επιλέχθηκαν διαφορετικά είδη ταινιών τα οποία περιλαμβάνουν: Καθαρή Νιτροκυτταρινική μεμβράνη (NC), μεμβράνη οξικής κυτταρίνης (CA), μεμβράνη διαπίδυσης με MWCO 3500 (DT1) 500 (DT2) και 100 (DT3). Περισσότερες λεπτομέρειες παρουσιάζονται στον πίνακα. 1. Τα καλύτερα αποτελέσματα τα πήραμε από τη ενεργοποιημένη σωλήνωση διαπίδυσης με MWCO στο 100 (ενεργοποιημένο DT3) εφαρμόζοντας μερικά περαιτέρω βήματα ενεργοποίησης και τροποποίησης. Στο πείραμά μας, το DT3 υδρολύθηκε από διάλυμα $NaOH$ ώστε να αποκτήσει ένα μεγαλύτερο μέγεθος πόρων,

ποσότητας υγρού αζώτου [212]. Η σκόνη χωρίστηκε σε τρεις προζυγισμένους σωλήνες φυγοκέντρησης (A, B, C) ομοιόμορφα. Άμεσα, στο σωλήνα A προστέθηκε αποσταγμένο νερό 0.5ml, στο σωλήνα β προστέθηκε διάλυμα EDTA. (0.5ml 1mM EDTA, το pH ρυθμίστηκε σε 3,5 με χρήση 0.1M NaOH) και στο σωλήνα γ προστέθηκε διάλυμα EDTA-SDS (0.5ml 1mM EDTA, 2mM SDS σε pH 3,5). Χρησιμοποιήθηκε μια χειροκίνητη φορητή συσκευή υπερήχων με μικροπιπέτα και κάθε δείγμα βομβαρδίστηκε για 10 δευτερόλεπτα ώστε συνθλιβεί. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές στους 4°C. Μετά από τα βήματα του πίνακα 5, ο νευρικός ιστός ρυθμίστηκε ώστε να έχουμε την ίδια συγκέντρωση ακριβώς για κάθε σωλήνα προσθέτοντας μικρή ποσότητα απεσταγμένου νερού. Οι ανωτέρω τρεις σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν σε 20.000 g στους 4°C για 15 min. Έπειτα το υπερκείμενο νερό συλλέχθηκε και το pH ρυθμίστηκε σε pH= 7,2 χρησιμοποιώντας 1M NaOH. Τρεις σωλήνες επωάστηκαν σε 37°C για 20 min ώστε να καταστρέψουν το H₂O₂, το οποίο προέρχεται πιθανώς από την αποικοδόμηση της Ach και της CH παρουσία εστεράσης, δεδομένου ότι η Ach και η CH είναι σταθερές σε αυτή τη θερμοκρασία. Έπειτα τα δείγματα ήταν έτοιμα για την ανίχνευση.

3.6.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Σε αυτήν την εργασία, η Ach ή CH ανιχνεύτηκαν έμμεσα με παρακολούθηση της ποσότητας H₂O₂, το οποίο είναι προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης των AchE και ChOD. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση της Ach ή της CH στον νευρικό ιστό είναι πολύ χαμηλή, και στο αίμα ή στον εγκεφαλονωτιαίο (ΚΠΣ) είναι ακόμη χαμηλότερη (περίπου <20nM), πρέπει να αναπτυχθεί ένα πολύ ευαίσθητο σύστημα ανίχνευσης για το H₂O₂ προκειμένου να επιτευχθεί η παρακολούθηση της Ach ή της CH στα βιολογικά υγρά. Στο σύστημά μας, το όριο ανιχνευσιμότητας επηρεάζεται από τους ακόλουθους παράγοντες. α. Η ευαισθησία του συστήματος ανίχνευσης με χημειοφωταύγεια για το H₂O₂. β. Το ποσοστό διάχυσης του H₂O₂ μέσω της μεμβράνης στη γραμμή μεταφοράς S3. γ. Η δραστηριότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων (AchE και ChOD). δ. Οι παρεμποδίσεις.

Βελτιστοποίηση των συνθηκών εργασίας για το σύστημα ανίχνευσης H₂O₂ με χημειοφωταύγεια.

αποδείχτηκαν πολύ επιτυχή. 0.2ml 30% ακρυλαμιδίου και 0.4ml 3% μεθυλεν-Bis-ακρυλαμιδίου τα οποία διαλυτοποιήθηκαν με 0.1M PBS ρυθμιστικού διαλύματος όξινων σε pH 7,2, αναμίχθηκαν σε έναν σωλήνα φυγοκέντρησης υπό συνεχή διέλευση αερίου N₂ για 20 min. Προστέθηκαν 3 ml 50% GA και 1g/l SA (που διαλύεται με 0.1M PBS, pH 7,2) και συνέχισαν να αναδεύονται για άλλα 10 min. Έπειτα προστέθηκαν 10% (w/v) K₂S₂O₈ 11μl και 1 μl TEMED. Το ανωτέρω διάλυμα περίπου 0.72ml επικάλυψε τον ενεργοποιημένο σωλήνα διαπίδυσης με γρήγορη περιστροφή (250rpm) για 60 sec. Η μεμβράνη εξατμίστηκε αργά και πολυμερίστηκε στο φώς για τουλάχιστον 10 h σε 4 °C. Έπειτα εκπλύθηκε με TBS (20mMTris, 0.5M NaCl, pH 7.5) και ήταν έτοιμη για χρήση.

Η προετοιμασία συζευγμένων ενζύμων με την Βιοτίνη.

Τα ένζυμα της AchE ή ChOD, 20 μονάδες αντίστοιχα, διαλύθηκαν σε 0,5 ml, 0.5M ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου σε pH= 9,0 και 1mg NHS-Βιοτίνη διαλύθηκε σε 0.2ml DMF. Τα ένζυμα και η NHS-Βιοτίνη επωάστηκαν σε ένα αεροστεγές φιαλίδιο για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Προστέθηκαν 0.2ml 1M διαλύματος NH₄Cl για να σταματήσει η αντίδραση. Η ελεύθερη Βιοτίνη απομακρύνθηκε από το διάλυμα σε 1mM pH 7,2 ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Τα συζευγμένα ένζυμα AchE-Βιοτίνη ChOD-Βιοτίνη (περίπου 1.5ml) είναι έτοιμα να χρησιμοποιηθούν.

Αντίδραση σύζευξης της στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-ενζύμων.

Η πολυμερισμένη μεμβράνη επωάστηκε σε 20ml διαλύματος (TBS + 3% BSA, w/v) για 2h με μικρή ανατάραξη σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη εκπλύθηκε σε 20ml TBST (TBS + 0.05%Tween-20, w/v) για 10 min με ήπια ανατάραξη και το βήμα επαναλήφθηκε δύο φορές. Τα ανωτέρω ένζυμα (AchE-Βιοτίν ή ChOD-Βιοτίν) αραιώθηκαν σε 15ml με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος (TBST + 1% BSA, w/v) και η μεμβράνη επωάστηκε στο αραιωμένο διάλυμα των ενζύμων με ήπια ανατάραξη για τουλάχιστον 10h. Η μεμβράνη εκπλύθηκε με 20ml ρυθμιστικού διαλύματος TBST για 10 min δύο φορές. Έπειτα εκπλύθηκε καλά με απεσταγμένο νερό.

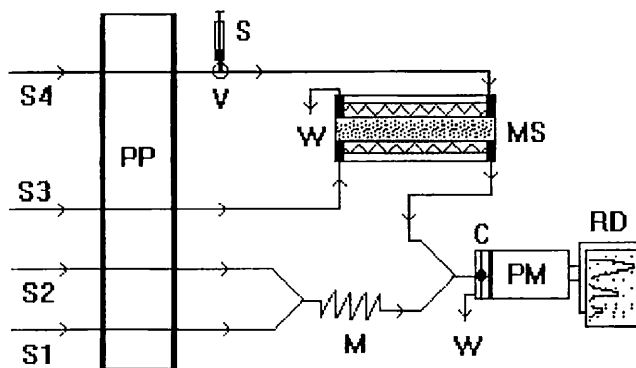
Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού για 5 min για να απομακρυνθεί η περίσσεια του νερού. Έπειτα ξηράνθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και διατηρήθηκε στους 4 °C σε υγρές συνθήκες. Αυτή η μεμβράνη είναι έτοιμη για τη χρήση στο επόμενο βήμα.

κυψελίδα είναι ιδιοκατασκευής, κοχλιωτή και τοποθετείται ακριβώς μπροστά από το παράθυρο του φωτοπολλαπλασιαστή.

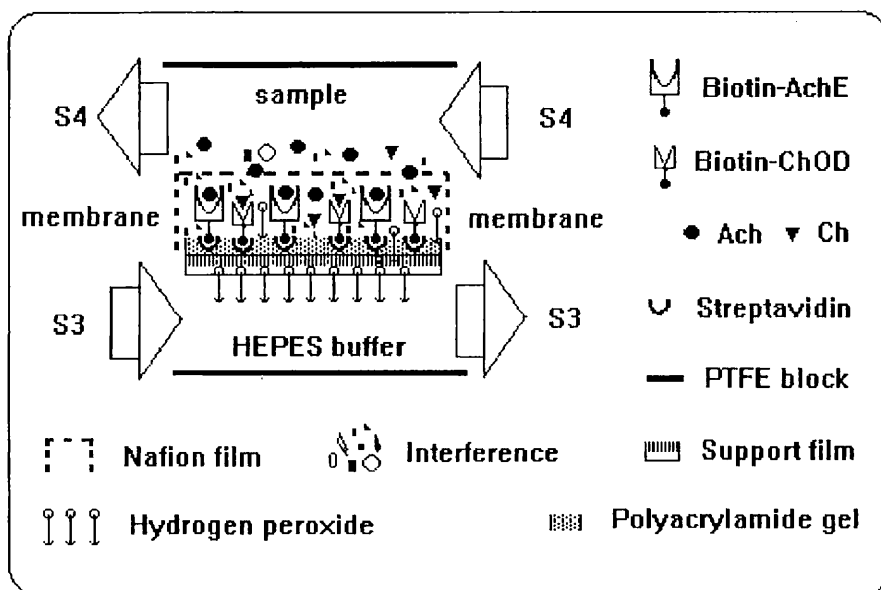
Σχήμα 1 (α) Διάταξη FI/CL-ανίχνευσης εφοδιασμένη με **(β)** δειγματολήπτη μεμβράνης.

Συνοτμήσεις: C=κοχλιωτή κυψελίδα; M=μίκτης; MS=δειγματολήπτης μεμβράνης; PM=φωτοπολλαπλασιαστής (THORN EMI 9789 B); PP=περισταλτική αντλία; RD=καταγραφέας; S=σύριγγα για έγχυση δείγματος; S1=διάλυμα λουμινόλης; S2=διάλυμα $K_3Fe(CN)_6$; S3=ρυθμιστικό διάλυμα HEPES; S4=απεσταγμένο νερό; V=εξάπορτη βαλβίδα; W=απόβλητο.

(1a)

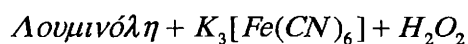
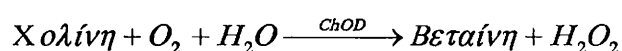
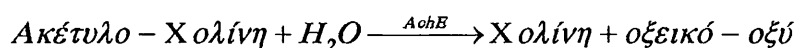


(1b)



αρκετά υψηλή για τον ακριβείς προσδιορισμούς. Οι μέθοδοι αυτοί, ακόμη δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της Ach και Ch in vivo σε πραγματικούς χρόνους, και ιδίως στον νευρικό ιστό [187-190].

Σ' αυτή την εργασία σχεδιάστηκε μια συσκευή που συνίσταται από σύστημα ροής τύπου-FIA με ΧΦ-ανίχνευση για ευαισθησία και επαναληψιμότητα και εφοδιασμένο με μεμβρανικό δειγματολήπτη με ακινητοποιημένα ένζυμα για διήθηση των παρεμποδίσεων από τα βιολογικά υγρά και μετατροπή της αναλυομένης σε προϊόν που ανιχνεύεται με ΧΦ-αντίδραση με βάση τις πιο κάτω αντιδράσεις:



Τα ένζυμα ακετυλοχολινεστεράση (AchE) και χολινο-οξειδάση (ChOD) συνακτινοποιήθηκαν στην επιφάνεια της πολυακρυλαμίδικης πηκτής διαμέσου της χρήσης του ζεύγους βιοτίνης αβιδίνης και η παραχθείσα μεμβράνη διήθησης/αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε σε συσκευή δειγματοληψίας μικροποσοτήτων βιολογικών υγρών [197-208]. Η συσκευή αυτή βελτιστοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ακετυλοχολίνης.

3.6.2 Πειραματικό μέρος

Υλικά

Χημικά αντιδραστήρια

Το Τρις (τρι-(Υδροξυμέθυλ)αμμινομεθάνιο), EDTA (αιθυλενοδιάμινο τετραοξικό οξύ), Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaOH, H₃BO₃ αγοράστηκαν από τη Merck, Tween 20 (Pharmacia Biotech), HEPES (ν-[2-υδροξυεθυλ]πιπεραζίνη- N'-[2-αιθανοσουλφονικό οξύ]) αγοράστηκαν από τη Sigma. Τα ανωτέρω αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων. Το ακρυλαμίδιο, μεθυλενεβις-ακρυλαμίδιο, K₂S₂O₈, TEMED (N', N', N', N'-Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη) αγοράστηκαν από την Pharmacia Biotech. Η ουρία, η φορμαλδεύδη, το DMF (διμεθυλοφορμαμίδιο), το THF (Τετραυδροφουράνιο)

Σταθερότητα του αισθητήρα NO. Η σταθερότητα του NO αισθητήρα εξαρτάται πρώτιστα από τη σταθερότητα των NO εκλεκτικών δειγματοληπτικών αισθητήρων. Οι επιφάνειες των δειγματοληπτικών αισθητήρων είναι καλυμμένες με Nafion ένα αρνητικά φορτισμένο υλικό και το λέρωμα της επιφάνειας του δειγματοληπτικού αισθητήρα επηρεάζει την NO διάχυση. Εντούτοις, ελέγχθηκε η απόκριση του αισθητήρα του 0.1μM πρότυπο διάλυμα NO, πριν και μετά την εμφύτευση στην jugular φλέβα ή τον ιστό του εγκεφάλου ακολουθώντας τουλάχιστον 10 ώρες συνεχούς in vivo παρακολούθηση του NO (Πίνακας 2). Παρατηρήθηκαν μερικές μειώσεις στην απόκριση του NO των αισθητήρων και αυτό πρέπει να οφείλεται πρώτιστα στο λέρωμα της επιφάνειας των αισθητήρων επειδή η λεπτομερής πλύση των ανακτημένων αισθητήρων αποκατέστησε μερικώς αυτήν την απώλεια ευαισθησίας. Από τον Πίνακα 2, διαπιστώσαμε ότι ο αισθητήρας του εγκεφάλου έχασε πολύ περισσότερη δραστηριότητα απ' ότι ο αγγειακός μετά από την in vivo παρακολούθηση. Επίσης, μετά από την ανάκτηση η δραστηριότητα του αγγειακού αισθητήρα ήταν ακόμα υψηλότερη απ' ότι του αισθητήρα του εγκεφάλου. Γενικά μερική απώλεια της ευαισθησίας οφείλεται στο επιφανειακό λέρωμα αλλά η σταθερότητα είναι αρκετά καλή.

Πίνακας 2. Διερεύνηση της σταθερότητας των NO δειγματοληπτικών αισθητήρων.

Probe Properties	Before implantation		After implantation		After recovery	
	Sensor Response	Relative Activity	Sensor Response	Relative Activity	Sensor Response	Relative Activity
	(mV)	(%)	(mV)	(%)	(mV)	(%)
Vascular probe response	56	100	46	82	50	89
Brain probe response	56	100	41	73	45	80

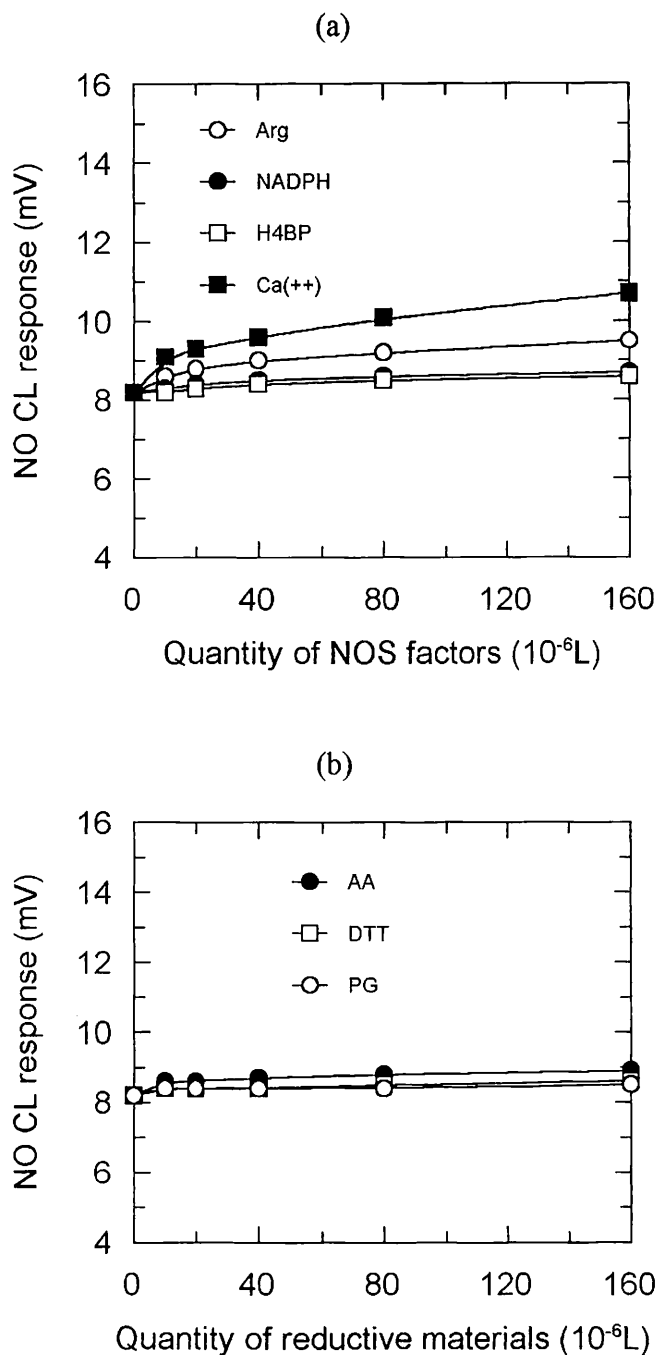
Ιn vivo παρακολούθηση του NO στα κουνέλια. Σε αυτό το πείραμα, προσπαθούμε να προσδιορίσουμε το σύστημά μας θα μπορούσε να ανιχνεύσει τις αρτηριοφλεβικές διαφορές για τις συγκεντρώσεις NO και περαιτέρω, εάν οι επιδράσεις του Viagra – παρόμοιες με εκείνες που σημειώνονται ανωτέρω στους αρουραίους, μπορούν να ανιχνευθούν σε ένα άλλο είδος. Οι συγκεντρώσεις NO στο αίμα των κουνελιών παρακολουθήθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές θέσεις όπως περιγράφεται προηγουμένως. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, η φλεβική συγκέντρωση NO είναι υψηλότερη από την αρτηριακή. Αυτή πιθανώς είτε οφείλεται στη παραγωγή NO από το endothelium στο χαμηλότερο αγγειακό δέντρο, είτε ίσως, στην απελευθέρωση του NO από μια συνδεδεμένη Hb μορφή όπως έχει υποστηριχτεί από τον Stamler και τους άλλους συνεργάτες του. Μετά από την έγχυση Viagra, τόσο η φλεβική όσο και η αρτηριακή συγκέντρωση NO αυξήθηκε. Εντούτοις, η αύξηση ήταν πολύ μεγαλύτερη στην περίπτωση του αρτηριακού NO . Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μια πνευμονική προέλευση που προκλήθηκε από το Viagra κατά τον σχηματισμού του NO. Επιπλέον, το NO στην αρτηρία παρουσίασε υψηλότερη συγκέντρωση από ότι στη φλέβα, ακόμη και η πίεση οξυγόνου στην αρτηρία είναι υψηλότερη από ότι στη φλέβα. Θεωρούμε ότι το σύστημά μας μπορεί να ανιχνεύσει NO ανεξάρτητα της παρουσίας του O₂. Άλλη μια φορά, οι αυξανόμενες ποσότητες NO που εμφανίζονται στην κυκλοφορία ελαχιστοποιήθηκαν με την ταυτόχρονη έγχυση ελεύθερης Hb.

Πίνακας 1. Παρακολούθηση του NO μέσω των κουνελιών και διερεύνηση των παρεποδίσεων.

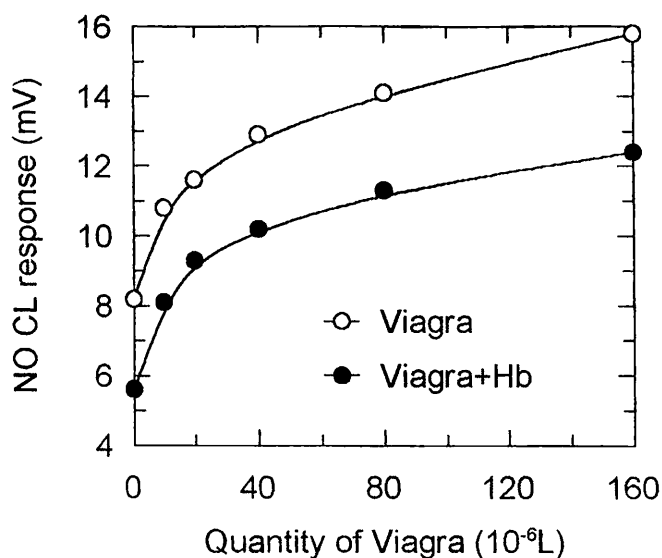
Physiological situation & analysis parameters	Initial situation	Viagra injection	Viagra+Hb injection
Total blood pressure (artery mm Hg)	135	125	120
PO ₂ (artery, mm Hg)	95	90	85
PCO ₂ (artery, mm Hg)	38	41	42
pH (artery)	7.36	7.38	7.42
NO CL response in central ear artery (mV)	7.4	12.2	10.4
NO CL response in marginal ear vein (mV)	8.5	9.2	8.3
NO CL response in Femoral artery (mV)	7.2	13.3	11.3
NO CL response in Jugular vein (mV)	8.3	8.7	7.8

Σε αυτό το πείραμα, η Hb παρουσίασε ισχυρότερη συγγένεια με το NO από ότι η HRP, αλλά στην εργασία μας, επιλέξαμε το HRP ως ρεύμα μεταφοράς επειδή το HRP είναι ευκολότερο μετουσιωθεί και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός πολύ μικρού υποβάθρου από το CL σύστημα Λουμινόλη -H₂O₂.

Σχήμα 7 Επίδραση των συμπαραγόντων του NO. α. για συμπαραγόντες NOS. β. για αναγωγικά υλικά γ. για πορφυρινικά υλικά.

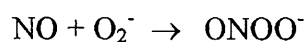


Σχήμα 5 Επίδραση του Viagra μέσω της αγγειακής παρακολούθησης.



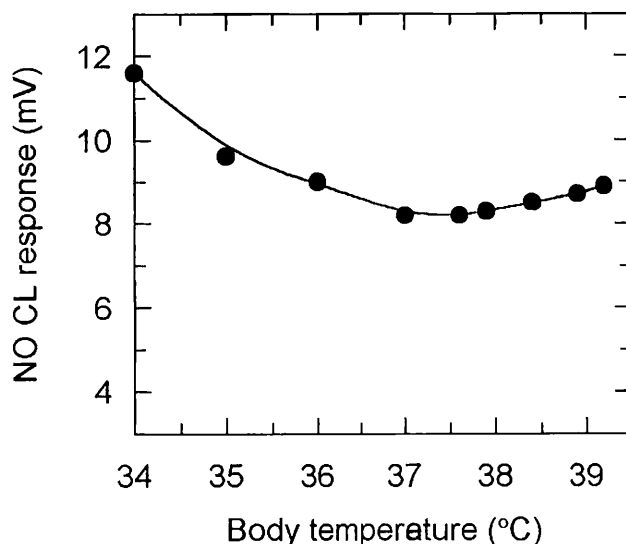
Επίδραση ενεργοποιητών του NO.

Η Ach, το ATP το BK (που βοηθούν την παραγωγή NO) και το SOD (που, με την παγίδευση του υπεροξειδίου, αυξάνει το βιοδιαθέσιμο NO εξετάστηκαν όσο αφορά την επίδραση στα επίπεδα του NO στο αίμα σε αυτό το σύστημα [176]. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6, το BK αύξησε το επίπεδο του ανιχνεύσιμου NO στο αίμα αποτελεσματικότερα. Το ATP ήταν σχεδόν αποτελεσματικό. Η Ach στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναποτελεσματική, ίσως λόγω της γρήγορης in vivo υδρόλυσης της Ach από τις ακετυλοχολινεστεράσες. Τελικά, το SOD δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στα ανιχνεύσιμα επίπεδα του NO στο αίμα, γεγονός που ίσως οφείλεται στη μικρή παγίδευση του NO σύμφωνα με την αντίδραση [177]



του NO. Αν και ελάχιστη, θα μπορούσε να οφείλεται σε μια μεγαλύτερη περιφερειακή αγγειακή διαστολή στις υψηλότερες θερμοκρασίες.

Σχήμα 3 Επίδραση της θερμοκρασίας του σώματος.



Επίδραση δόση NO.

Στους αρουραίους που εξετάστηκαν σε κανονική θερμοκρασία σώματος, μελετήθηκαν διαφορετικοί δότες NO όσο αφορά την επίδρασή τους στην in vivo παραγωγή NO και στην ανίχνευση in vivo. Οι ακόλουθοι δότες NO: SNC, SNP και τα νιτρώδη εγχύθηκαν μέσω της jugular, φλέβας αντίστοιχα. Οι αποκρίσεις NO-CL σε αυτά τα αντιδραστήρια παρακολούθηθηκαν. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4 με αυξανόμενες δόσεις των δοτών NO το SNC είχε μια αρκετά καλή απόκριση δόσης το SNP όχι τόσο καλή και τα νιτρώδη ήταν αρκετά ανενεργά. Φαίνεται ότι το SNC είναι αποτελεσματικότερο από το SNP και τα νιτρώδη υποστηρίζοντας οι δύο τελευταίοι δότες NO δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί δότες NO για in vivo παρακολούθηση.

δειγματοληπτικού αισθητήρα, το NO παρακολούθηθηκε συνεχώς έως ότου η φυσιολογική κατάσταση των αρουραίων σταθεροποιηθεί μετά από 3 ώρες. Ύστερα εγχύθηκαν διαφορετικές ποσότητες Viagra μέσω της Jugular φλέβας παρουσία ή απουσία Hb.

Παρακολούθηση το NO στα κουνέλια

Το αρσενικό άσπρο κουνέλι της Νέας Ζηλανδίας που ζυγίζει 3.5-4.0Kg αναισθητοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα πειράματα με τα ποντίκια. Η θερμοκρασία του σώματος διατηρήθηκε σε 37°C από έναν ζωικό ρυθμιστή θερμοκρασίας (από την BAS) και παρακολούθηθηκε μέσω ενός πρωκτικού αισθητήρα.

Τα δείγματα αίματος (εννιά δείγματα 5ml) προήλθαν από την αριστερή κεντρική αρτηρία του αυτιού για τις μετρήσεις του O₂ και του CO₂ (PO₂ και PCO₂) και pH. Ενδοφλέβιες εγχύσεις ορισμένων φαρμάκων έγιναν μέσω μιας κάνουλας που τοποθετήθηκε σε μια οριακή φλέβα αυτιού (αριστερά). Η πίεση αίματος και οι κτύποι της καρδιάς παρακολούθηθηκαν από έναν αισθητήρα μέσω της αριστερής μηριαίας αρτηρίας. Τέλος, ο αγγειακός δειγματοληπτικός αισθητήρας διαπίδωσης εμφυτεύτηκε στη δεξιά κεντρική αρτηρία του αφτιού και στην φλέβα του αυτιού στη δεξιά μηριαία αρτηρία και στην jugular φλέβα αντίστοιχα για την in vivo παρακολούθηση. Τα πειράματα άρχισαν όταν τα ζώα είχαν σταθεροποιηθεί περίπου 4 ώρες μετά από τη χειρουργική επέμβαση.

Ύστερα εγχύθηκαν 0.4ml viagra μέσω της φλέβας των αυτιών. Παρακολούθηθηκε η μεταβολή του NO και ελήφθησαν 5ml αίματος για την ανάλυση. Στη συνέχεια εγχύθηκε η ίδια ποσότητα Viagra, αλλά προστέθηκαν και 10mg στη Hb, που διαλύθηκαν σε 1ml αποσταγμένο νερό μέσω της φλέβας αυτιών, και παρακολούθηθηκε η μεταβολή του NO. Ελήφθησαν 5ml αίματος για την ανάλυση. Περισσότερες λεπτομέρειες φαίνονται στον πίνακα 1.

3.5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρακολούθηση του NO στο αίμα μέσω των ποντικιών

Στα παρακάτω πειράματα, οι αγγειακοί δειγματοληπτικοί αισθητήρες εμφυτεύθηκαν στην jugular φλέβα μέσω των ποντικιών και παρακολούθηθηκε το NO σε διαφορετικές φυσιολογικές καταστάσεις.

Επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας.

κουνελιού προκειμένου να ερευνήσουμε αυτό το πρόβλημα. Περισσότερες λεπτομέρειες φαίνονται στον Πίνακα 1.

Βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών

Με βάση προηγούμενη εργασία μας [79, 81] οι ακόλουθες τροποποιημένες πειραματικές συνθήκες θεωρήθηκαν σαν οι καλύτερες. Ρεύμα S1: 0.2mM Λουμινόλη, 2mM H₂O₂ διαλύθηκαν σε 200mM Tris, ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,4. Ρεύμα S2: 1mM EDTA το pH ρυθμίστηκε σε 3,5 με διάλυμα NaOH 1M. Ρεύμα S3: 0.01mg/l-1 HRP διαλύθηκε σε 1mM HEPES σε pH 7,2 ρυθμίστηκε με διάλυμα 1M NaOH. Σε αυτό το σύστημα, όλα τα διαλύματα διηθήθηκαν και απαερώθηκαν πολύ καλά πριν από την ανίχνευση. Το ρεύμα S1 χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση NO Cl. Το pH ρυθμίστηκε σε 7,4, δεδομένου ότι σε αυτό το pH, το NO έχει την υψηλότερη απόκριση. Προκειμένου να διατηρήσουμε το pH σταθερό, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 100mM Tris, που είναι 100 φορές υψηλότερης συγκέντρωσης από εκείνο του ρεύματος S1 και S2, ώστε να επιτύχει ένα σταθερό pH μετά από ανάμιξη των τριών ρευμάτων. Το S2 ρεύμα χρησιμοποιήθηκε για την αποικοδόμηση του HRP. Με βάση προηγούμενη εργασία μας, βρήκαμε ότι όξινο διάλυμα με διάλυμα 1mM EDTA ήταν αποδοτικότερο για να μετουσιώσει το ένζυμο HRP. Σε αυτήν την περίπτωση, το υπόβαθρο Cl από το σύστημα λουμινόλη - H₂O₂ - HRP ήταν πολύ μικρότερο όταν χρησιμοποιούμε όξινο διάλυμα χωρίς EDTA.

Το S3 ρεύμα χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά του NO, χρησιμοποιώντας HRP, το οποίο έχει υψηλή συγγένεια με το NO. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 1mM HEPES για να διατηρήσει σταθερό pH, δεδομένου ότι το αέριο CO₂ από τις βιολογικές πηγές επηρεάζει το pH. Επιπλέον, το pH του ρυθμιστικού διαλύματος ρυθμίστηκε σε 7,2 με NaOH χωρίς K⁺ (το K⁺ είναι τοξικό για το ζώο), η ιονική ισχύς όλου του διαλύματος διατηρήθηκε όσο το δυνατόν χαμηλότερη για να επιτευχθεί υψηλότερη ωσμωτική πίεση από τις βιολογικές πηγές στο ρεύμα μεταφοράς S3, έτσι ώστε το NO να έχει μεγαλύτερη δυνατότητα να διαχυθεί.

Μέτρηση του NO που στηρίζεται σε CL

Ο δειγματοληπτικός αισθητήρας διαπίδυσης συνδέθηκε με το σύστημα NO-CL αντίδρασης όπως φαίνεται στο Σχήμα 1. Όλα τα διαλύματα στη σύριγγα S1-S3 διηθήθηκαν και απαερώθηκαν ώστε να βελτιώσουν την ανίχνευση. Πριν από τη χρήση, ο δειγματοληπτικός αισθητήρας τοποθετήθηκε σε αποσταγμένο νερό

Διαλύματα πορφυρινικών πρωτεϊνών και ενζύμων Hb, καταλάσης (CAT), και HRP, που έχουν υψηλή συγγένεια με το NO παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 10mg.ml⁻¹.

Περισσότερες λεπτομέρειες φαίνονται στο Σχήμα 7.

Πειραματόζωα

Οι αρουραίοι Wistar (αρσενικό, 250-300g) και τα άσπρα κουνέλια της Νέας Ζηλανδίας (αρσενικό 2.0-2.5Kg) χρησιμοποιήθηκαν σαν πειραματόζωα. Όσον αφορά τα πειραματόζωα, ακολουθήθηκαν όλες οι διαδικασίες που καθαρίζονται από τη Φυσιολογική Ένωση της Ελλάδας και της Ζωικής Επιτροπής Ηθικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Συσκευές

Το σύστημα για ανίχνευση του NO που αναπτύξαμε φαίνεται στο Σχήμα 1. Αποτελείται από ένα σύστημα δειγματοληψίας με διαπίδυση (BAS, Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette IN, USA) που συνδέεται με μια συσκευή ανίχνευσης CL. Τρεις σύριγγες του 1ml Bee Stinger gastright (από BAS) συμβολίζονταν σαν S1, S2 και S3 στο Σχήμα 1). Καθοδηγούνται από ένα Baby Bee οδηγό συρίγγων (από BAS) με σταθερή ταχύτητα ροής 2μl.min⁻¹. Χρησιμοποιήθηκε αγγειακός δειγματοληπτικός αισθητήρας διαπίδυσης (μεμβράνη 10mm από BAS) που τροποποιήθηκε όπως περιγράφεται κατωτέρω, προκειμένου να γίνει in vivo παρακολούθηση στον υποδόριο ιστό ή στον εγκέφαλο.

Τα μέλη αυτού του συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των συρίγγων, των δειγματοληπτικών αισθητήρων διαπίδυσης και της διάταξης αντίδρασης χημειοφωταύγειας που συνδέθηκαν με PEEK σωλήνωση (0,65mm OD, 0,12mm ID από την BAS) χρησιμοποιώντας συνδετήρες σωληνώσεων (0,65mm OD από την BAS) που εξασφάλισαν στεγανές συνδέσεις αερίου. Η απόσταση, ειδικά από τους δειγματοληπτικούς αισθητήρες διαπίδυσης μέχρι την κυψελίδα της αντίδρασης χημειοφωταύγειας ήταν όσο το δυνατόν μικρότερη. Το τροφοδοτικό THORN EMIPM 28B για τον φωτοπολλαπλασιαστή THORN EMI 9789B που ανιχνεύει την CL ρυθμίστηκε σε 1.0kV.

3.5. ΜΙΑ ΝΕΑ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΟΥ ΝΟ ΙΝ ΒΙΒΟ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΔΙΑΠΙΔΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

3.5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Λόγω της σπουδαιότητας του ΝΟ στην διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές λειτουργίες του οργανισμού είναι απαραίτητη η παρακολούθησή της εκλυόμενης ποσότητάς του όταν ο οργανισμός βρίσκεται υπό διαφορετικές συνθήκες [161-163]. Ο μικρές συγκεντρώσεις του στα βιολογικά υγρά και η επίδραση των πολλών παραγόντων όπως του περοξειδικού ανιόντος , των μεταλλοιόντων, των ενζύμων ή νευροδιαβιβαστών όπως της ακετυλοχολίνης στην βιολογική τους δραστηριότητα κάνουν αδύνατο τον προσδιορισμό του [164-166].

Διάφοροι άμεσοι και έμμεσοι μέθοδοι έχουν αναφερθεί για τον προσδιορισμό του ΝΟ που βασίζονται στις αρχές της φασματοσκοπίας, και ηλεκτροχημείας και κατασκευάστηκαν διάφοροι τύποι αισθητήρων σε πολλές προσπάθειες να βελτιώσουν την αναλυτική απόδοση σε προσδιορισμούς in vivo λόγω των περιορισμών των [173]. Παραμένει, λοιπόν, η ανάγκη για την σχεδίαση μίας νέας αξιόπιστης αναλυτικής μεθόδου για την παρακολούθηση τη συγκέντρωσης του ΝΟ in vivo σε πραγματικό χρόνο.

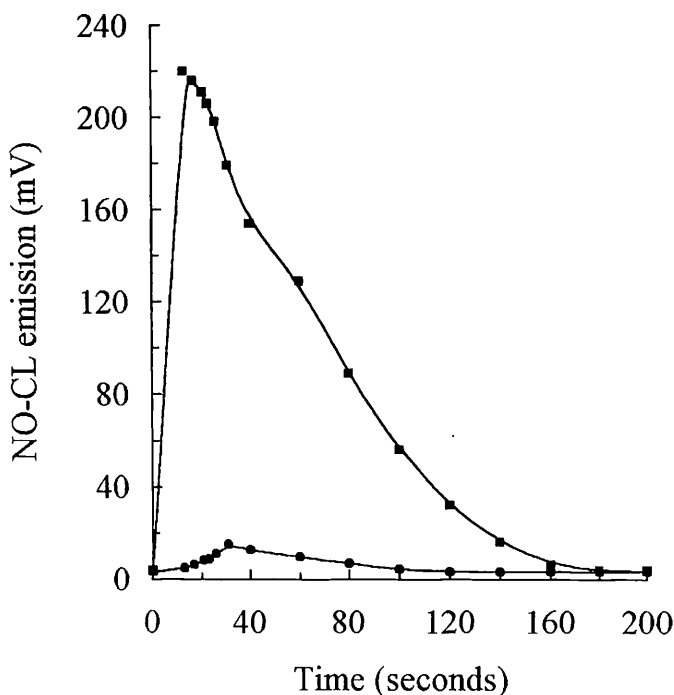
Σ' αυτή την εργασία αναπτύξαμε μια νέα μέθοδο ανίχνευση του ΝΟ βασισμένη από την προηγούμενη ερευνητική μας εμπειρία, που χρησιμοποιεί τον συνδιασμό της δειγματοληπτικής μεμβράνης δια μέσου συστήματος μικροδιαπίδυσης [174,181] και ΧΦ-ανίχνευση. Στην αναφορά αυτή η προτεινόμενη μέθοδος βελτιστοποιείται και εφαρμόζεται για την παρακολούθηση των μεταβολών στην συγκέντρωση του ΝΟ in vivo μετά από χορήγηση φαρμάκων δια μέσου έγχυσης των στο κυκλοφοριακό σύστημα των πειραματοζώων. Τα αποτελέσματα με αυτό το σύστημα δείχνουν πως η μέθοδος είναι αρκετά ευαίσθητη για να καταγράψει της μεταβολές του ΝΟ σε διαφορετικές φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες.

3.5.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά

Λουμινόλη (SIGMA) και H_2O_2 30% w/v (Merck) χρησιμοποιήθηκαν ως αντιδραστήρια CL. Η Horseradish υπεροξειδάση (HR.), η αιμογλοβίνη (Hb), η υπεροξειδική βισμούτιαση από βοοειδή (SOD) και η καταλάση από *aspergillus niger* (CAT) αγοράστηκαν από τη SIGMA. Η βραδικινίνη (BK) αγοράστηκε από την Serva.

Σχήμα 5 NO CL προφίλ εκπομπής χρησιμοποιώντας CA-Nafion ταινία (■) και DT1 (●) μεμβράνη στη συσκευή δειγματοληψίας με μεμβράνη.



Βαθμονόμηση του NO

Χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συνθήκες κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις του NO σε εγγενή δείγματα αίματος, προσομοιώνοντας κατά συνέπεια την πραγματική μήτρα όταν το σύστημα πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για μετρήσεις σε ζώντα οργανισμό.

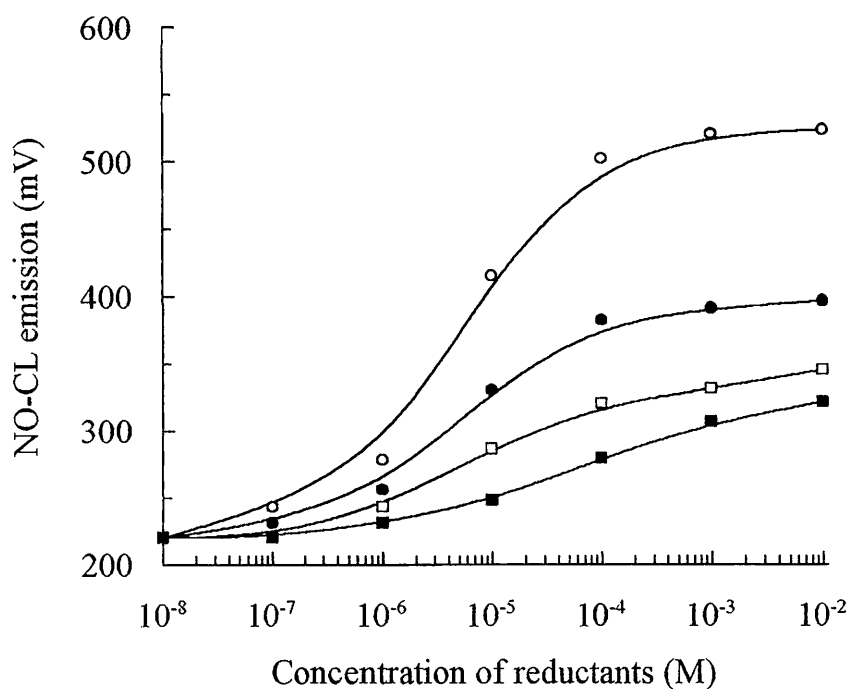
Η απόκριση του συστήματος (mV) παραστάθηκε γραφικά έναντι των moles του παραχθέντος NO σε μια ημι-λογαριθμική γραφική παράσταση. Εμφανίστηκε γραμμική απόκριση για περιοχή συγκεντρώσεων μεταξύ 1.8×10^{-6} και 2.7×10^{-3} mol NO. Η εξίσωση που περιγράφει την καλύτερη ευθεία είναι η (2) με συντελεστή συσχέτισης $r=0.9962$.

$$y = 42,5 \times 10 (\pm 10) + 69,9 (\pm 2) \log(n_{NO}) \quad (2)$$

όπου n_{NO} - αριθμός moles του NO σήματος προς θόρυβο.

Το όριο ανιχνευσιμότητας είναι 9×10^{-7} mol NO για λόγο θορύβου προς σήμα 3.

Σχήμα 4 NO CL εκπομπή έναντι συγκέντρωσης αναγωγικών αντιδραστηρίων χρησιμοποιώντας CA-Nafion ταινία μεμβράνης στη συσκευή δειγματοληψίας με μεμβράνη. NADPH (○), H4BP (●), DTT (■) και ασκορβικό οξύ (□).



Η δράση αυτών των πρόσθετων ουσιών, εντούτοις, περιορίζεται από την περιεκτική μεμβράνη στο διαμέρισμα του δείγματος της συσκευής με μεμβράνη που διατηρεί έτσι την υψηλή επιλεκτικότητα του συστήματος. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στο Σχήμα 4. Το NADPH έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα και χρησιμοποιήθηκε για τα περαιτέρω πειράματα σε συγκέντρωση 0.1mM. Σε αυτήν την συγκέντρωση, η επίδραση του NADPH ερευνήθηκε περαιτέρω κάτω από πραγματικές συνθήκες με τη χρησιμοποίηση δείγματος αίματος ως μήτρα για τα NO δείγματα. Τα αποτελέσματα από έξι, διαφορετικά δείγματα αίματος (με ή χωρίς NADPH) φαίνονται στον Πίνακα 2. Όπως φαίνεται από την υψηλή απόκριση του NO-CL, η διάρκεια ζωής του NO αυξάνεται στα δείγματα που περιέχουν NADPH.

όταν χρησιμοποιείται η μεμβράνη CA ή CA-Nafion. Τέτοια συστατικά είναι η γλυκόζη, η κυστεΐνη και το ουρικό οξύ (Πίνακας 1). Εντούτοις στην περίπτωση του ασκορβικού οξέος η NO CL-εκπομπή ενισχύεται 1,5 φορά (Πίνακας 1). Έτσι η συνεισφορά από τις ενώσεις της κατηγορίας B στη συνολική επίδραση των συστατικών του αίματος είναι θετική. Τα συστατικά του αίματος από τις ενώσεις της κατηγορίας C είναι κυρίως πρωτεΐνες όπως BSA, η Hb και διάφορα ένζυμα. Η BSA δεν έχει καμία επίδραση στην απόκριση. Από την άλλη πλευρά η Hb προκαλεί μια μείωση της CL-εκπομπής ανεξάρτητα από τη μεμβράνη που χρησιμοποιείται. Αυτή η συνεισφορά μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή συγγένεια της Hb με το NO που αλλάζει το συντελεστή κατανομής μεταξύ των δύο ρευστών συστημάτων του στοιχείου της μεμβράνης.

Στα πραγματικά δείγματα η Hb είναι ένας από τους παράγοντες που ελέγχει την ποσότητα του ελεύθερου NO. Η συνεισφορά στη συνολική επίδραση της CL-εκπομπής από την κατηγορία των ενώσεων είναι αρνητική. Εάν υποθεθεί ότι δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών του αίματος που μεταβάλλουν την επίδραση των μεμονωμένων ενώσεων στην CL-εκπομπή, κάποιος θα υπολόγιζε τη συνολική επίδραση των συστατικών του αίματος από την Eq. (1):

Συνολική επίδραση = { Σ (μεμονωμένη επίδραση / συγκέντρωση του συστατικού στον Πίνακα 1) X (συγκέντρωση του συστατικού στο αίμα) } / n

(1)

όπου το n είναι ο αριθμός συστατικών στο δείγμα αίματος. Βάσει των δεδομένων του Πίνακα 1, αυτός ο υπολογισμός θα οδηγούσε σε μια τιμή που δίνει αμελητέα ή μικρή επίδραση στην NO CL-εκπομπή.

Η επίδραση των αναγωγικών ειδών.

Η επίδραση παρεμπόδισης των διάφορων αναγωγικών ειδών όπως DTT [158], BME, H4BP [159], ασκορβικό οξύ, και NADPH [160] ερευνήθηκε σε σχέση με την συγκέντρωσή τους στο δείγμα. Ακόμη και στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, η παρουσία τους προκάλεσε μια εντυπωσιακή μείωση της απόκρισης του συστήματος όταν χρησιμοποιήθηκε η μεμβράνη διαπίδυσης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3 το σύστημα είναι πολύ ευαίσθητο σε 10⁻⁷ MNADPH, H4BP και ασκορβικό οξύ. Το DTT και BME είχαν επίσης κάποια επίδραση, αλλά δεν ήταν τόσο έντονη. Από την άλλη πλευρά όταν χρησιμοποιήθηκε η μεμβράνη CA-Nafion ως περμ-εκλεκτική μεμβράνη, οι προαναφερθείσες αναγωγικές ενώσεις, (εκτός από το BME), δεν

ίχνη οξυγόνου που μπορούν να διαπεράσουν το διαμέρισμα του δείγματος, ή μπορούν να διευκολύνουν τη μεταφορά NO μέσω της μεμβράνης.

Ενώσεις μεγαλύτερου μοριακού βάρους >4000 (κλάση Γ):

Αυτές δεν μπορούν να περάσουν μέσω της μεμβράνης και είναι συνήθως πρωτεΐνες χωρίς ή με κάποια ενζυματική δράση όπως η Hb, HRP και CAT. Αυτά τα μεγάλα μόρια εμφανίζουν συνήθως ασήμαντη επίδραση όταν χρησιμοποιούνται μεμβράνες με σχετικά υψηλό MWCO και μέτρια επίδραση, λόγω της μικρότερης ταχύτητας μεταφοράς – ή πιθανού μερικού φραξίματος-στους μικρότερους πόρους των μεμβρανών με χαμηλό MWCO.

διαλύματος της παρεμποδίζουσας ένωσης, το διάλυμα παγίδευσης Hb αναλύθηκε για NO, όπως περιγράφεται σε προηγούμενη εργασία μας [81]. Για υδατικά διαλύματα κάθε παρεμποδίζουσας ένωσης, υπό τους πειραματικούς όρους που χρησιμοποιούνται σ' αυτήν την εργασία, το % NO που παγιδεύεται στο διάλυμα Hb ήταν 40 %. Εντούτοις, στην περίπτωση της Hb ή HRP άλλων διαλυμάτων των ενώσεων-παγίδευσης, δεν βρέθηκε NO που να διαφεύγει στο υδατικό διάλυμα της Hb.

ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΕΙΣ

Η εκπομπή χημειοφωταύγειας μπορεί να επηρεαστεί από ενώσεις που, (α) αντιδρούν ή αλληλεπιδρούν με τα CL-αντιδραστήρια HRP ή NO, (β) μεταβάλλουν τις σταθερές ισορροπίας των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα, όπως την σταθερά αστάθειας της σύμπλοκης ένωσης HRP-NO ή την σταθερά κατανομής του NO μεταξύ της μήτρας του δείγματος και του υδατικού διαλύματος HRP, (γ) τροποποιούν τις κινητικές των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα, όπως π.χ. την ταχύτητα διάχυσης του NO μέσω της μεμβράνης ή σταθερά ταχύτητας της CL-αντίδρασης, (δ) μεταβάλλουν την κβαντική αποδοτικότητα του CL-ανιχνευτικού συστήματος. Ενώσεις αντιπροσωπευτικές των κατηγοριών που αναφέρθηκαν παραπάνω και που βρίσκονται συνήθως στα βιολογικά υγρά και έχουν διαφορετικό μοριακό βάρος, (MW), χρησιμοποιήθηκαν για να βρεθεί η επίδρασή τους στην CL-εκπομπή. Η μεταβολή της επίδρασής τους μελετήθηκε με τη χρησιμοποίηση μεμβρανών με ανοίγματα που επιτρέπουν το πέρασμα ενώσεων διαφορετικού μοριακού βάρους (MWCO). Επιπλέον εξετάζεται η επίδραση στη χημειοφωταύγεια ενώσεων που είναι συστατικά του αίματος, όπως τα ανόργανα άλατα. Η επίδραση της παρεμπόδισης κάθε ένωσης που βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα ερευνάται με την τοποθέτησή του στο διαμέρισμα του δείγματος της συσκευής με μεμβράνη και διοχετεύοντας μέσω αυτού 1 mmol NO με την βοήθεια Ar από τον αντιδραστήρα NO. Οι παρεμποδίζουσες ενώσεις εξετάστηκαν στο μέγιστο επίπεδο συγκέντρωσης της υγιούς ή θεραπευτικής περιοχής. Η μέση απόκριση 3 μετρήσεων 1mmol NO λήφθηκε ως 100% και όλες οι επόμενες αποκρίσεις συγκρίθηκαν σχετικά με αυτήν την τιμή. Στον πίνακα 1 φαίνονται οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν τα μοριακά βάρη τους, οι συγκεντρώσεις των υδατικών διαλυμάτων τους, το % ποσοστό CL- εκπομπής (μέση τιμή από τρεις επαναληπτικές μετρήσεις) που ελήφθη με τη χρησιμοποίηση τριών διαφορετικών ειδών μεμβρανών: Μεμβράνη διαπίδυσης με MWCO 3.500 dalton, ταινία οξικής κυτταρίνης με MWCO < 150 και

στο επιθυμητό μέγεθος, πλύθηκε με 0,01 M PBS, pH 7,0 και μετά υδρολύθηκε σε 0,01 M KOH για 10 min, προκειμένου να επιτευχθεί ένα υψηλότερο ποσοστό διάχυσης του NO. Σ' αυτόν τον χρόνο υδρόλυσης το MWCO είναι περίπου 150 Dalton, διατηρώντας κατά συνέπεια τις ιδιότητες αποκλεισμού μεγέθους ως προς τις διάφορες ενώσεις [156, 157].

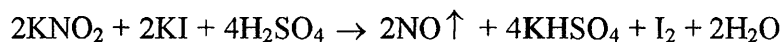
Επίστρωση Nafion: Η ταινία CA βυθίστηκε σε διάλυμα Nafion (5% σε αλειφατική αλκοόλη) για 10 λεπτά και το διάλυμα αφέθηκε να στεγνώσει στον αέρα για 2 ώρες. Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία διαμορφώθηκαν 5 επιτυχή στρώματα. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες το πάχος της ταινίας είναι περίπου 10 μm. Η τελική επενδυμένη με Nafion ταινία οξικής κυτταρίνης έχει πάχος περίπου 30 μm και προσαρμόστηκε σε έναν σωλήνα PTFE.

Αισθητήρας και μέτρηση NO-CL.

Πρότυπα διαλύματα KNO₂ εγχύθηκαν ως μικρές δόσεις των 500 μl μέσω της ακριβούς σύριγγας εγχύσεων στο σωλήνα παραγωγής NO. Το παραγόμενο NO παρασύρθηκε με το AR στη δειγματοληπτική συσκευή μεμβράνης και πέρασε εκλεκτικά μέσω της σύνθετης μεμβράνης και παγιδεύτηκε έπειτα από το διάλυμα HRP (0,2 mg l-1 HRP σε 1 mM Tris-HCl, pH 7.2) που ήταν ακόμα κατά τη διάρκεια του χρόνου δειγματοληψίας. Η γραμμή ροής της HRP-NO ένωσης αντλήθηκε έπειτα με ταχύτητα ροής 0,15 ml min⁻¹ και το ελεύθερο NO αποδεσμεύτηκε από το HRP παρουσία από της γραμμής ροής χαμηλού pH C2 (10 mM γλυκίνη- HCl, pH 3.5) στο δεύτερο σημείο συγχώνευσης. Η γραμμή ροής του ελεύθερου NO οδηγήθηκε στον ανιχνευτή μετά από ανάμιξη με τα αντιδραστήρια CL (Cl, 1x10⁻⁵ M Λουμινόλη και 2x10⁻³ M H₂O₂ σε 100 mM Tris HCl, pH 7.2) και καταγράφηκε η εκπομπή NO-CL. Το ύψος της κορυφής του σήματος λήφθηκε ως μέτρηση της συγκέντρωσης.

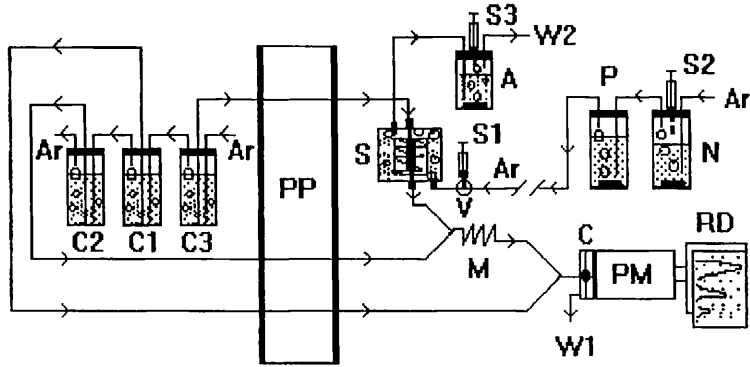
Παρασκευή προτύπου NO.

Το NO παρήχθη σύμφωνα με την ακόλουθη χημική αντίδραση:

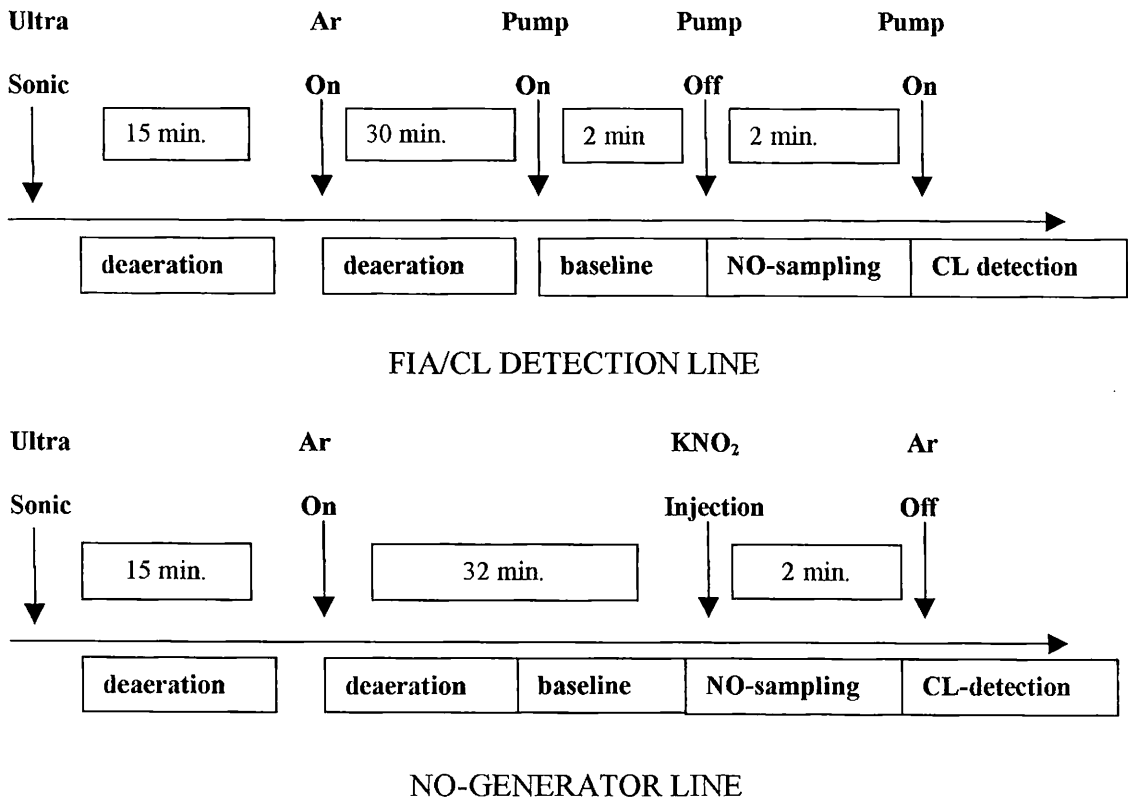


Το σύστημα παραγωγής NO παράγει NO με την προσθήκη διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων KNO₂ μέσω της σύριγγας S2 στο σωλήνα του αντιδραστήρα N, ο οποίος περιέχει τετραπλάσια περίσσεια KI και H₂SO₄. Οι σωλήνες N και A έγιναν σε αέριο και ο αέρας ταπομακρύνθηκε με τη διάβαση αργού για 30 min. Το παραχθέν

(a)



(b)



3.4.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Χρησιμοποιήθηκαν υλικά KNO_2 και KI (SIGMA) για παραγωγή του NO , σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στη βιβλιογραφία [155]. Ως αντιδραστήρια CL χρησιμοποιήθηκαν λουμινόλη (SIGMA) και H_2O_2 30% ζ/ω (MERCK). Η Horseradish υπεροξειδάση (HRP), η αιμογλοβίνη (Hb) και η Bovine Serum Albumin (BSA) αγοράστηκαν από τη SIGMA. Το Tris (hydroxymethyl)aminomethane (MERCK) και η γλυκίνη (IGMA) χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (H4BP), η dithiothreitol (DTT), η β-mercaptoethanol (BME) αγοράστηκαν από τη SIGMA. Το ασκορβικό οξύ (AA) και το NADPH (β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, ανοιγμένη μορφή) αγοράστηκε από την MERCK. Η οξική κυτταρίνη (SIGMA), το polyvinyl acetate (PVA), υψηλού μοριακού βάρους, 160000 Daltons, και το Nafion (5% σε αλειφατική αλκοόλη) αγοράστηκαν από την ALDRICH και χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των μεμβρανών. Η σωλήνωση διαπίδυσης (SPECTRA/POR) ήταν από την SERVA. Τα μη-ενισχυμένα βουλκανισμένα Matt/Matt φύλλα σιλικόνης αγοράστηκαν από την Specialty Manufacturing Inc. Η ντοπαμίνη, η cysteine, το HEPES και η ουρία αγοράστηκαν από την SIGMA. Το ουρικό οξύ, η β-D-γλυκόζη και η πυρογαλόλη αγοράστηκαν από την MERCK. Το αργό αγοράστηκε από την Air-Liquide Ltd. Όλα τα άλλα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού. Χρησιμοποιήθηκε το διπλά απεσταγμένο νερό (DDW).

ΣΥΣΚΕΥΗ.

Η σχηματική παράσταση της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιείται για την απευθείας παρακολούθηση του NO , καθώς επίσης και της διάταξης παραγωγής NO φαίνεται στο Σχήμα 1a. Η διάταξη αποτελείται από μία συσκευή FI/CL-ανίχνευσης, που συνδέεται με τη συσκευή παραγωγής NO και χρήση ενός δειγματολήπτη μεμβρανών διαπίδυσης. Η δειγματοληπτική συσκευή αποτελείται από δύο τμήματα που χωρίζονται από μια μεμβράνη. Το ένα τμήμα χρησιμοποιείται για να φιλοξενήσει το διάλυμα παγίδευσης του NO και το άλλο δείγμα NO . Σε αυτή τη εργασία, το τμήμα του δείγματος χρησιμοποιήθηκε για να φιλοξενήσει τα υδατικά διαλύματα διαφόρων παρεμποδίζουσών ενώσεων, δια μέσου των οποίων διέρχεται το He και το NO . Το NO παγιδεύτηκε από το HRP (που χρησιμοποιείται ως παγίδα του NO σε αυτή την εργασία) περνώντας μέσω της περμ-εκλεκτικής μεμβράνης (Σχήμα 2) και η

Επίδραση των I_2 και I^-

Η παρασκευή NO με την χημική αντίδραση (α), σχηματίζει ιώδιο, το οποίο είναι διαλυτό στην περίσσεια KI , αλλά κατά την διάρκεια της αντίδρασης το KI καταναλώνεται και το ιώδιο γίνεται αδιάλυτο και ένα μέρος του εξατμίζεται. Σε κάποιες περιπτώσεις έντονης αντίδρασης, κάποια ποσότητα I^- μπορεί επίσης να διαφύγει από το δοχείο της αντίδρασης, αλλά αυτή παγιδεύεται στο διάλυμα KOH . Για αυτό το λόγο, διερευνήθηκε η επίδραση στο σήμα χημειοφωταύγειας, της παρουσίας I_2 και I^- στο σύστημα. Πραγματοποιήθηκαν δύο τεστ: το πρώτο με προσθήκη I_2 μέχρι το σημείο κορεσμού στο διάλυμα του υποκαταστάτη PRB ή σε καθαρό νερό (τυφλό), και το δεύτερο με προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων KI στο διάλυμα του υποκαταστάτη PRB, ώστε να επιτευχθούν διαφορετικές, σταθερές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα της επίδρασης στην ένταση του σήματος χημειοφωταύγειας, διαφόρων συγκεντρώσεων KI στο ρεύμα μεταφοράς Hb δίνονται στο Σχήμα 5. Από το Σχήμα 5 είναι φανερό ότι το ιόν I^- μειώνει σημαντικά την ένταση του σήματος. Αντιθέτως, η παρουσία ιωδίου στο υδατικό διάλυμα Hb ή στο τυφλό αυξάνει κατά πολύ το σήμα χημειοφωταύγειας πράγμα που αποκαλύπτει την ισχυρή επίδραση που ασκεί το I_2 στο σύστημα της λουμινόλης εξαιτίας της οξειδωτικής του ικανότητας.

Στον αέρα το NO μπορεί να αντιδράσει με το O₂ και να σχηματίσει καστανού χρώματος ατμούς NO₂. Το NO₂ με το νερό σχηματίζει NO₂⁻ και NO₃⁻. Όταν όμως το NO αναμιγνύεται με νερό παρουσία O₂ σχηματίζεται σχεδόν αποκλειστικά NO₂⁻. Το O₂ στο σύστημα μας μπορεί να επιδράσει στο σήμα της χημειοφωταύγειας με δύο τρόπους.

- Μπορεί να αντιδράσει με το NO απευθείας, πριν αυτό να φτάσει στη γραμμή μεταφοράς C3, και επομένως να μειώσει την ποσότητα NO με αποτέλεσμα χαμηλής έντασης σήμα χημειοφωταύγειας.
- Μπορεί να οξειδώσει το NO προς NO₂ που με το νερό (στα υδατικά διαλύματα του υποκαταστάτη PRB) θα δώσει ανιόντα NO₂⁻ και NO₃⁻ τα οποία μπορούν να επιδράσουν αρνητικά στην ένταση του σήματος χημειοφωταύγειας. Αυτό φαίνεται στα Σχήματα 4 και 5.

Η αρνητική επίδραση των δύο αυτών ανιόντων στο σήμα κατά την προσθήκη τους στο διάλυμα των υποκαταστατών PRB πριν από το NO είναι φανερή από τα Σχήματα 4 και 5. Στο Σχήμα 4 φαίνεται ότι το KNO₂ που προστέθηκε στο διάλυμα των υποκαταστατών PRB (τελικής συγκέντρωσης 1.0x10⁻³M) πριν το NO μπορεί να μειώσει την ένταση του σήματος. Η προσθήκη KNO₃ και KNO₂ στο ρεύμα μεταφοράς Hb C3 (τελικής συγκέντρωσης 1.0x10⁻³ M) απουσία NO μειώνει επίσης το σήμα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.

Εάν τα O₂, NO₂⁻, NO₃⁻, δεν απομακρυνθούν πλήρως, θα εμφανισθεί αρνητικό σήμα στη διαδικασία παρακολούθησης του κινητικού προφίλ του NO. Στα πειράματά μας παρατηρήθηκε ότι το αρνητικό σήμα διαρκεί έως ότου όλη η ποσότητα O₂ καταναλωθεί από το NO (προς σχηματισμό NO₂⁻ και NO₃⁻). Κατόπιν η ένταση του σήματος αρχίζει να αυξάνεται εξαιτίας της νέας ποσότητας NO που εισέρχεται στο διάλυμα του υποκαταστάτη PRB. Για την εξουδετέρωση του προβλήματος, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω τεχνικές (όπως περιγράφηκαν στο πειραματικό μέρος), με σκοπό τον καθαρισμό του NO και την απομάκρυνση ιχνών οξυγόνου.

- Σε όλα τα διαλύματα της αντίδρασης έγινε κατεργασία με υπερήχους για 15 min στους 4 ° C και κατόπιν κατεργασία με Ag για την απομάκρυνση του οξυγόνου.
- Το O₂ που πιθανόν να υπήρχε στους ελεύθερους χώρους του συστήματος παραγωγής NO (C3, A, N1, N2), απομακρύνθηκε με διέλευση Ag για 10 min προ της έναρξης της αντίδρασης.

Πίνακας 1 Δεδομένα για την καμπύλη βαθμονόμησης NO

Absorbance of remained nitrite	0	0	0	0	0	0	0	0,009	0,137	0,430	0,689	0,892
Remained nitrite amount (mole)	0	0	0	0	0	0	0	1×10^{-4}	2×10^{-4}	1.2×10^{-3}	5.2×10^{-3}	0.017
Total nitrite amount (mole)	1×10^{-5}	2×10^{-5}	5×10^{-5}	1×10^{-4}	2×10^{-4}	5×10^{-4}	1×10^{-3}	2×10^{-3}	5×10^{-3}	0,01	0,02	0,05
NO conversion ratio from nitrite	1	1	1	1	1	1	1	0.95	0.96	0.88	0.74	0.66
NO formation amount (mole)	1×10^{-5}	2×10^{-5}	5×10^{-5}	1×10^{-4}	2×10^{-4}	5×10^{-4}	1×10^{-3}	1.9×10^{-3}	4.8×10^{-3}	8.8×10^{-3}	0.0148	0.0330
NO CL signal (mV)	0.9	3.9	9.9	19.9	40.3	102	206	416	1056	2127	2884	3104

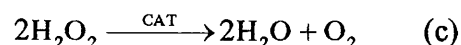
2.0×10^{-5} και 1.0×10^{-2} mole NO και το δείγμα που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό είναι 140 μl. Έτσι το όριο του προσδιορισμού είναι 7.0×10^{-7} mole ή 21 μg ή 15.7×10^{-2} cm³ NO. Ο προσδιορισμός του NO είναι αρκετά απλός και μπορούν να αναλυθούν πέντε με έξι δείγματα το λεπτό.

Επίδραση των υποκαταστατών PRB (HRP, Hb, CAT) στο σήμα χημειοφωταύγειας του NO

Το NO που παράγεται στον αντιδραστήρα με τη χρήση της χημικής αντίδρασης (α) παγιδεύτηκε σε διάλυμα υποκαταστατών PRB. Η συγκέντρωση του NO στο διάλυμα των υποκαταστατών PRB παρακολουθήθηκε και καταγράφηκε με τη συσκευή FIA και ανίχνευση με χημειοφωταύγεια του σχήματος 1α, στις βέλτιστες συνθήκες ανίχνευσης. Το σχήμα 2 δείχνει ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα της συγκέντρωσης του NO στην παγίδα των υποκαταστατών PRB. Στην πραγματικότητα είναι το κινητικό προφίλ της αντίδρασης παραγωγής NO. Το μέγιστο της καμπύλης εμφανίζεται στο πέρας της αντίδρασης και το σήμα χημειοφωταύγειας που λήφθηκε στο μέγιστο είναι αντίστοιχο με το ποσό του NO που παρήχθη από το KNO₂. Αυτά τα πειράματα έγιναν με διαφορετικές ποσότητες KNO₂ και με διαφορετικούς υποκαταστάτες.

Τα σήματα χημειοφωταύγειας που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετικούς υποκαταστάτες PRB (HRP, Hb, CAT) και νερό, για την παγίδευση του NO, παρίστανται διαγραμματικά έναντι του ποσοστού KNO₂ (το KI ήταν σε περίσσεια) και παρουσιάζονται στο Σχήμα 3. Από το Σχήμα 3 είναι εμφανές ότι το τυφλό διάλυμα (μόνο νερό χωρίς υποκαταστάτη PRB) δίνει σήμα αρκετά χαμηλότερης έντασης από τα διαλύματα των υποκαταστατών PRB. Κατά τη χρήση CAT ως υποκαταστάτη PRB, βρέθηκε ότι στις χαμηλές συγκεντρώσεις (<0.001g l⁻¹) το σήμα χημειοφωταύγειας είναι χαμηλότερης έντασης από ότι το σήμα του τυφλού, αλλά αυξάνεται με πολύ μεγαλύτερη ταχύτητα με την αύξηση της συγκέντρωσης CAT.

Είναι γνωστό ότι η CAT μετατρέπει το H₂O₂ σε O₂:



Επομένως μεγάλη ποσότητα H₂O₂ στη γραμμή μεταφοράς C2 μετατρέπεται σε O₂ πράγμα το οποίο μπορεί να είναι και ο λόγος για το χαμηλότερο σήμα του υποβάθρου σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις CAT. Οι HRP και Hb δίνουν σήμα χημειοφωταύγειας παρόμοιο με του τυφλού σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες του 0.0005 g l⁻¹, αλλά το σήμα τους αυξάνει με πολύ μεγαλύτερη ταχύτητα σε υψηλότερες

(γ) σε αναλογία $[H_2O_2]/[\text{λουμινόλη}] > 50$. Λαμβάνοντας ως βάση τις βέλτιστες τιμές για την ανίχνευση του NO, προσπαθήσαμε να μειώσουμε το σήμα χημειοφωταύγειας του υποβάθρου, που προέρχονταν από τον υποκαταστάτη PRB. Από τα πειράματα βελτιστοποίησης που πραγματοποιήθηκαν (βελτιστοποιώντας μία παράμετρο τη φορά) απουσία NO, βρέθηκε ότι το σήμα χημειοφωταύγειας ελαχιστοποιούνταν κάτω από τα 10 mV, όταν : (α) το pH ρυθμίζονταν στο 7.10 (14.3 mM Universal) και $[\text{λουμινόλη}] = 1.0 \times 10^{-5}$ M, στη γραμμή μεταφοράς C1, (β) το υδατικό διάλυμα H_2O_2 ήταν 2.0×10^{-3} M στη γραμμή μεταφοράς C2, και (γ) το υδατικό διάλυμα Hb ήταν 2.0×10^{-4} $g\ l^{-1}$ στη γραμμή μεταφοράς C3. Τέλος έγινε μια προσπάθεια μείωσης του ελαχίστου του σήματος του υποβάθρου μεταβάλλοντας το pH της γραμμής μεταφοράς C2 με ρυθμιστικό διάλυμα (1.43 mM Universal). Από τη διερεύνηση αυτή προέκυψε ότι μία ελάχιστη μείωση του σήματος του υποβάθρου συμβαίνει στο $pH = 4.10$ κατά τη χρήση Hb ως υποκαταστάτη PRB. Η μείωση του σήματος του υποβάθρου ήταν ακόμη μεγαλύτερη με τη χρήση ως υποκαταστατών PRB, HRP και CAT.

Καμπύλη βαθμονόμησης NO και αναλυτικοί παράμετροι

Η καμπύλη βαθμονόμησης του NO κατασκευάστηκε βάσει της αντίδρασης (β) όπως περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος. Διαφορετικές ποσότητες KNO_2 (ίσοι όγκοι 1.0 έως 10.0 M υδατικών διαλυμάτων) και περίσσεια Hg χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή διαφορετικών mole NO. Το NO κατόπιν παγιδεύτηκε στους δύο σωλήνες που περιείχαν διάλυμα Hb (ίσους όγκους σταθερής συγκέντρωσης). Μετά το πέρας της αντίδρασης λήφθηκαν δείγματα από τους σωλήνες P1 και P2 και μετρήθηκε το σήμα χημειοφωταύγειας που έδωσαν. Τα εναπομείναντα νιτρώδη στο σωλήνα της αντίδρασης N_2 , προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο diazo και χρήση καμπύλης βαθμονόμησης νιτρωδών, και η ποσότητα του NO που παρήχθη υπολογίστηκε υποθέτοντας 100% μετατροπή. Τα πειραματικά δεδομένα για την καμπύλη βαθμονόμησης των νιτρωδών, έδωσαν ευθεία γραμμή στην περιοχή μεταξύ 1.0×10^{-5} και 1.0×10^{-3} M και η γραμμική συμμεταβολή (regression treatment) των μέσων τιμών (εις τριπλούν) έδωσε τις βέλτιστες τιμές για τις παραμέτρους (best fit parameters) και τις τυπικές αποκλίσεις που φαίνονται στην εξίσωση (1)

$$Y = 1.987 (\pm 0.01) + 0.395 (\pm 0.003) \lg x \quad (1)$$

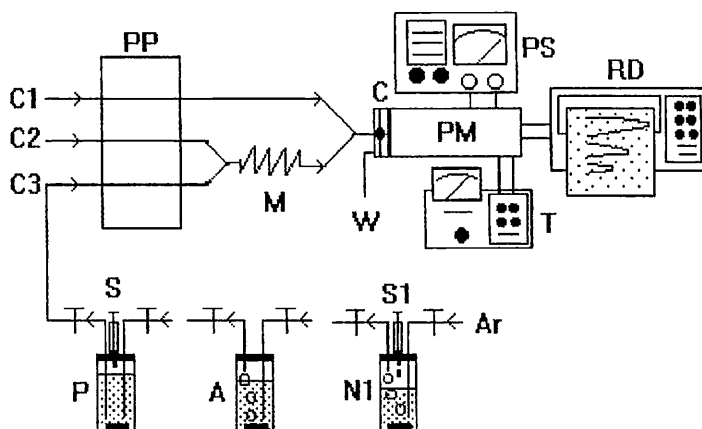
Ο αντιδραστήρας παράγει NO μέσω της χημικής αντίδρασης (α) με προσθήκη διαφορετικών όγκων υδατικού διαλύματος KNO_2 με τη βοήθεια της σύριγγας S1 στον κλειστό και αναδευόμενο σωλήνα του αντιδραστήρα N1, που περιέχει διάλυμα KI και περίσσεια H_2SO_4 . Το περιεχόμενο των σωλήνων (N1, A, P) καθώς και των γραμμών μεταφοράς C1, C2, C3 απαερώθηκαν, με τη βοήθεια δονητή υπερήχων για 15 min στους 4°C και έπειτα με διαβίβαση φυσαλίδων Ar , το οποίο προηγουμένως είχε διέλθει από διάλυμα 0.01M KOH και 0.1M πυρογαλλόλης, για την απομάκρυνση ιχνών οξυγόνου. Πριν την έναρξη της αντίδρασης παραγωγής NO, τα περιεχόμενα των δοκιμαστικών σωλήνων (N1, A, P) αναδευτήκαν, σφραγίστηκαν αεροστεγώς και ρεύμα Ar διήλθε από το εσωτερικό τους για 30 min με σκοπό την απομάκρυνση του αέρα. Το παραγόμενο NO στο σωλήνα N1, με τη βοήθεια της διαφοράς πίεσης, διέρχονταν από το σωλήνα A ο οποίος περιείχε υδατικό διάλυμα 10% KOH για την απομάκρυνση αέριων παραπροϊόντων και προσμειξέων, και κατόπιν από το διάλυμα του υποκαταστάτη PRB.

Η χημική αντίδραση (β) παράγει NO καθαρότητας 99.7% και χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του σήματος της χημειοφωταύγειας έναντι των mole NO στα διαλύματα Hb. Η μεθοδολογία της διεργασίας έχει ως εξής: Στο σωλήνα της αντίδρασης N2 (5ml) προστέθηκαν, σταθεροί όγκοι διαφόρων συγκεντρώσεων ($1 \text{ με } 10 \text{ M}$) πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος KNO_2 , και περίσσεια Hg. Το περιεχόμενο του σωλήνα αναδευτήκε ήπια με μαγνητικό αναδευτήρα. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 0°C με προσθήκη μικρών κομματιών πάγου στο σωλήνα N2 και ο ολικός όγκος ρυθμίστηκε στα 4 ml. Οι σωλήνες P1 και P2 (5ml) περιείχαν από 3 ml διαλύματος Hb $2.0 \times 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$ και αναδευόνταν αργά με μαγνητικό αναδευτήρα. Το σύστημα ήταν κλεισμένο αεροστεγώς με τα ελαστικά πώματα και μόνο ρεύμα He διέρχονταν μέσω των σωλήνων για 20 min πριν από την έναρξη της αντίδρασης. Στο σωλήνα N2 (5ml) εγχύθηκε 1ml H_2SO_4 1M μέσω της σύριγγας S2 και η αντίδραση ξεκίνησε, με ταυτόχρονη διέλευση μικρής ροής He. Το παραγόμενο NO διαβιβαζόταν με τη βοήθεια του ρεύματος He στους σωλήνες P1 και P2 που περιείχαν τα διαλύματα Hb. Μετά από 15 min λαμβάνονταν δείγματα με τη βοήθεια σύριγγας από τους σωλήνες P1 και P2 τα οποία εγχύονταν στην βαλβίδα V για την ανίχνευση χημειοφωταύγειας. Η ποσότητα NO που παγιδεύονταν στα διαλύματα Hb ήταν η ίδια η οποία παράγονταν στον αντιδραστήρα. Μετά το πέρας της διαδικασίας της αντίδρασης η περίσσεια Hg και Hg_2SO_4 στο σωλήνα του αντιδραστήρα (N2) διηθούνταν και το

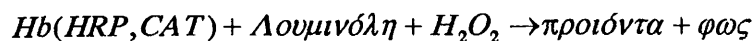
Σχήμα1 Διάταξη FIA-ανιχνευτή χημειοφωταύγειας εφοδιασμένη με αντιδραστήρα παραγωγής NO για την παρακολούθηση της αντίδρασης σχηματισμού του NO (α) και για την κατασκευής της καμπύλης βαθμονόμησης (β).

Συνομημύσεις: A=παγίδα, C=κοχλιωτή κυψελίδα, C1=γραμμή μεταφοράς αντιδραστηρίων CL, C2=γραμμή μεταφοράς οξειδωτικού για την δηλητηρίαση της οξειδωτικής δραστικότητας του αντιδραστηρίου PRB, C3=γραμμή μεταφοράς αντιδραστηρίου PRB ή του συμπλόκου του με το NO, C4= γραμμή μεταφοράς διαλύματος Hb, M= μίκτης, N1, N2= αντιδραστήρας παραγωγής NO, P= Διάλυμα ανιδραστηρίου PRB, P1, P2=διάλυμα Hb, PM=φωτοπολλαπλασιαστής (THORN EMI 9789 B), PP=περισταλτική αντλία με σταθερή ταχύτητα 0,15 ml min⁻¹ (GILSON Mini-2), PR= πορφυρινικό διάλυμα με NO ή σχετικούς συμπαράγοντες, PS=τροφοδοτικό (THORN EMI PM 28B (1200 V), RD=καταγραφέας (LINEAR 1200), S, S1, S2=σύριγγες, T=θερμοστατικό (JULABO VC F30), V= εξάπορτη βαλβίδα (ANACHEM), W=απόβλητα.

(1a)



ΧΦ-σήμα από πορφυρινικό μόριο



Για την παραγωγή του NO εφαρμόστηκαν εργαστηριακές μέθοδοι με βάση την παραγωγή από ανόργανες αντιδράσεις αερίου NO το οποίο καθαρίστηκε από παραπροϊόντα[] αλλά και από οργανικές ενώσεις είτε μέσω ενζυματικών αντιδράσεων είτε με χημική μέθοδο ελευθέρωσης του NO. Στην εργασία εφαρμόστηκαν τεχνικές χρήσης ανόργανων αντιδραστηρίων και προσδιορίστηκε η ποσότητα του παραχθέντος NO από την μετατροπή του αντιδραστηρίου με πρότυπες μεθόδους ανάλυσης. Με βάση την ποσότητα του NO που παγιδεύθηκε στο διάλυμα του πορφυρινικού βιομορίου και της ΧΦ-εκπομπής επετεύχθησαν καμπύλες αναφοράς

Σ' αυτή την εργασία, παρέχουμε μέθοδο προσδιορισμού του NO που βρίσκεται συμπλοκοποιημένο με πορφυρινικά βιομόρια κάνοντας χρήση της ΧΦ-αντίδρασης της λουμινόλης/ H_2O_2 . Η μέθοδος αυτή παρέχει το δεύτερο βήμα στην στρατηγική της ανίχνευσης του NO in vivo καθότι εκτός της δυνατότητας προσδιορισμού του NO σε πορφυρινικά βιομόρια μας δίνει την δυνατότητα να μελετήσουμε τις συνθήκες υπό τις οποίες θα ελαχιστοποιηθεί η ΧΦ-εκπομπή από τα πορφυρινικά βιομόρια στην περίπτωση που περιέχονται στο δείγμα ή αποτελούν το μέσο της πρόσληψης και συμπύκνωσης από το δείγμα.

3.3.2 Πειραματικό μέρος

Υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν: KNO_2 , Hg, χρωμοτροπικό οξύ, της εταιρίας Fluka, KI της εταιρίας BDH, KOH, πυρογαλλόλη, KNO_3 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $K_2Cr_2O_7$, H_2SO_4 και I_2 , της εταιρίας Merck, σουλφανυλικό οξύ, της εταιρίας Sigma. Τα αντιδραστήρια για τα ρυθμιστικά διαλύματα ήταν: KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , H_3BO_3 , NaOH, διαιθυλοβαρβιτουρικό οξύ, της εταιρίας Merck και κιτρικό οξύ της εταιρίας Carlo Erba. Τα αντιδραστήρια χημειοφωταύγειας, λουμινόλη (Sigma) και H_2O_2 30% w/v (Merck) ήταν μέγιστης καθαρότητας και τα βιοχημικά αντιδραστήρια, υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), Horseradish peroxidase (HRP), αιμογλοβίνη (Hb), καταλάση (CAT), ήταν της εταιρίας Sigma. Τα αέρια He και Ar ήταν της εταιρίας Air-liquide. Τέλος σε όλη την εργασία χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό, εκτός από τα σημεία όπου αναφέρεται κάτι διαφορετικό.

Συσκευή

Οι παρεμποδίζουσες ενώσεις προστέθηκαν στο διάλυμα της γραμμής μεταφοράς σε συγκεντρώσεις που υπάρχουν στο αίμα και η συσκευή ρυθμίστηκε στις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας. Τα δεδομένα ελήφθησαν για δείγμα 0,05 M L-αργινίνης. Τα αποτελέσματα στον Πίνακα 2 δείχνουν ότι:

Η επίδραση του περιεχόμενου μεταλλοϊόντος μαγνησίου και νατρίου στο σήμα εκπομπής χημειοφωταύγειας είναι πολύ μεγάλη για το ιόν του νατρίου και μαγνησίου, ενώ είναι ασήμαντη για το ιόν του καλίου. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός της επίδρασης που έχουν τα διάφορα μεταλλοϊόντα στις ενεργές θέσεις του NOS.

Η επίδραση της καλμοδουλίνης στο σήμα εκπομπής χημειοφωταύγειας είναι αρνητική σε αυτή την μελέτη σε αντίθεση με την βιβλιογραφία για το φυσικό NOS-ένζυμο, ίσως λόγω της διαφορετικής παρασκευής του ενζύμου από την εταιρία SIGMA ή λόγω της ακινητοποίησης του ενζύμου. Απαιτείται περισσότερη μελέτη για να διευκρινιστεί ο λόγος αυτής της επίδρασης.

Τα NOS-συνένζυμα NADPH και H4BP και το αναγωγικό μόριο DTT, αποσβαίνουν το σήμα εκπομπής χημειοφωταύγειας (Πίνακας 2), αλλά όταν αυξάνει η συγκέντρωση του H_2O_2 το σήμα βελτιώνεται ειδικά στην περίπτωση του NADPH. Αυτό υποστηρίζει την άποψη ότι τα συνένζυμα καταστρέφουν την οξειδωτική δραστηριότητα του H_2O_2 .

Χρόνος ζωής του αντιδραστήρα

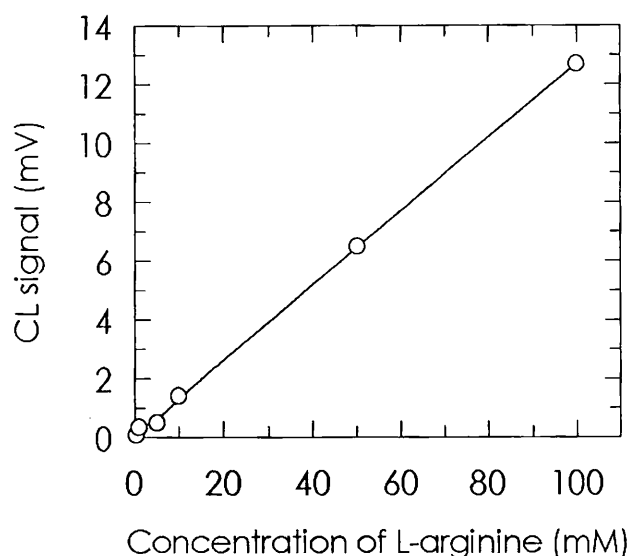
Είναι η πρώτη φορά που ακινητοποιείται NOS σε CPG. Το ακινητοποιημένο ένζυμο έδειξε πολύ καλή λειτουργικότητα και αποθηκευτική ικανότητα και η δραστηριότητα δεν δείχνει ουσιαστική μείωση ύστερα από 2000 εγχύσεις σε τρεις μήνες, όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία για τα NOS-ένζυμα. Όταν ο αντιδραστήρας λειτουργεί μερικές φορές σε 37°C, το NOS χάνει πολύ γρήγορα τουλάχιστον το 50% της δραστηριότητάς του.

Αναλυτικές παράμετροι

Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για την L-αργινίνη

Η εκπομπή χημειοφωταύγειας παρακολουθήθηκε στις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος που προσδιορίστηκαν στα προηγούμενα πειράματα. Για μια έγχυση ή ανάλυση ενός δείγματος, αυτό το σύστημα αντίδρασης χρειάζεται 2 min. Άλλα 2 min χρειάζονται για την αναγέννηση του συστήματος του καταλύτη. Η καμπύλη βαθμονόμησης που λαμβάνεται φαίνεται στο Σχήμα 8, είναι γραμμική με μεγάλη κλίση (ευαισθησία) για την L-αργινίνη.

Σχήμα 8 Καμπύλη συσχέτισης μεταξύ σήματος χημειοφωταύγειας και συγκέντρωσης L-αργινίνης χρησιμοποιώντας CSS.5



Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης ύστερα από γραμμική παλινδρόμηση των δεδομένων είναι εξής:

$$Y=0,0721(\pm 0,0735)+0,1267(\pm 0,0016)X$$

Όπου Y=σήμα χημειοφωταύγειας σε mVolt και X=συγκέντρωση L-αργινίνης σε mM
Ο συντελεστής συσχέτισης, $r=0,9997$. Η γραμμική περιοχή είναι 1~100m M L-αργινίνης και το όριο ανιχνευσιμότητας είναι 0,5 mM βασισμένο στο επίπεδο θορύβου.

σήμα εκπομπής χημειοφωταύγειας λαμβάνεται σε θερμοκρασία 20°C. Επί πλέον, ο αντιδραστήρας έχει διαφορετικό εύρος κορυφής σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Το εύρος κορυφής είναι μια μέτρηση της ταχύτητας της αντίδρασης και από τα αποτελέσματα γίνεται φανερό ότι η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνει όσο αυξάνει η θερμοκρασία του διαλύματος της γραμμής μεταφοράς. Η ελάττωση του εύρους της κορυφής τείνει προς το επίπεδο μεταξύ 20 και 30 °C και ύστερα αρχίζει μία νέα ελάττωση μέχρι τους 37 °C (ακραίο άνω όριο της θερμοκρασίας) όπου το NOS έχει την καλύτερη δραστηριότητα και η ενζυμική αντίδραση την υψηλότερη ταχύτητα. Η ταχύτητα της αντίδρασης γίνεται χαμηλότερη όσο αυξάνει η θερμοκρασία και το προφίλ της κορυφής γίνεται ευρύτερο. (Σε θερμοκρασία 20 °C, το εύρος της κορυφής είναι 120 sec). Ωστόσο, αν και η αντίδραση πάνω από 20 °C προσεγγίζει μία σταθερή κατάσταση για την παραγωγή NO, η εκπομπή χημειοφωταύγειας ελαττώνεται είτε γιατί συμβαίνει μεγαλύτερη διασπορά του δείγματος της αργινίνης στο διάλυμα της γραμμής μεταφοράς, είτε γιατί ελαττώνεται ο χρόνος ημιζωής των μεταβατικών ειδών NO, είτε λόγω της χημείας μεταξύ των αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας και των προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης ή ακόμη λόγω της επίδρασης της θερμοκρασίας του διαλύματος της γραμμής μεταφοράς στην σταθερότητα των αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας. Το τελευταίο είναι περισσότερο πιθανό επειδή είναι καλά γνωστό ότι το H₂O₂ είναι ασταθές, ειδικά σε αναγωγικά περιβάλλοντα με υψηλές θερμοκρασίες.

Τέλος, ερευνάται η επίδραση της θερμοκρασίας του διαλύματος του αντιδραστηρίου χημειοφωταύγειας στην εκπομπή χημειοφωταύγειας και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 6β. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 6β η θερμοκρασία των αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας έχει εμφανή επίδραση στο μέγεθος του σήματος της χημειοφωταύγειας. Όταν η θερμοκρασία αυξάνει σε 30~37 °C, το σήμα γίνεται σταδιακά μικρότερο μέχρι τους 37 °C όπου γίνεται πολύ μικρό, πιθανόν επειδή το H₂O₂ μετατρέπεται σε οξυγόνο και διαφεύγει από το υδατικό διάλυμα γρηγορότερα σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Σε θερμοκρασία 5~20 °C, η οξειδωτική κατάσταση του H₂O₂ είναι σταθερή.

Επίδραση της ταχύτητας ροής

Η ταχύτητα ροής σε συνδυασμό με τον όγκο του αντιδραστήρα είναι υπεύθυνη για την σημαντική κινητική παράμετρο που καλείται χρόνος επαφής σε διαδικασίες που ο αντιδραστήρας βρίσκεται σε σύστημα ροής. Σε αυτό το πείραμα παρακολουθήσαμε

Το διάλυμα της γραμμής μεταφοράς ρυθμίστηκε σε ένα σταθερό pH με ένα πρότυπο διάλυμα 0,1 M NaOH και με την βοήθεια πεχαμέτρου για την ανάγνωση της ακριβούς τιμής pH. Σε ένα πείραμα το αντιδραστήριο της χημειοφωταύγειας δεν βρισκόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα και η τιμή του pH ήταν 6,0, ενώ σε ένα άλλο πείραμα βρισκόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM tris. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν αξιοσημείωτες διαφορές. Η εκπομπή χημειοφωταύγειας που δημιουργήθηκε από την έγχυση δείγματος L-αργινίνης καταγράφηκε σαν η συνολική απόκριση του ανιχνευτή χημειοφωταύγειας προς το NO και το υλικό του δείγματος. Η εκπομπή χημειοφωταύγειας από το υλικό του δείγματος καταγράφηκε σαν η γραμμή βάσης της εκπομπής χημειοφωταύγειας. Η διαφορά μεταξύ αυτών των δύο τιμών για κάθε τιμή pH παρέχει τα δεδομένα της καθαρής απόκρισης ως προς την εκπομπή χημειοφωταύγειας του NO και αυτά σχεδιάζονται στο διάγραμμα του παραθύρου του Σχήματος 5.

Από το Σχήμα 5 φαίνεται ότι το συνολικό σήμα χημειοφωταύγειας (σήμα γραμμής βάσης + σήμα από το NO) αυξάνεται με την αύξηση του pH του διαλύματος της γραμμής μεταφοράς, αλλά επίσης αυξάνεται και το σήμα της γραμμής βάσης. Από το παράθυρο του Σχήματος 5 γίνεται αντιληπτό ότι το μέγιστο της καθαρής εκπομπής χημειοφωταύγειας από το NO έναντι του pH λαμβάνεται σε pH=7,3. Αυτό μπορεί να σημαίνει ή ότι το NOS έχει την μεγαλύτερη δραστηριότητα σε αυτό το pH ή ότι αυτό το pH είναι το ευνοϊκότερο για την εκπομπή χημειοφωταύγειας. Τέλος, το συμπέρασμα από τον Πίνακα 1 ότι τα αποτελέσματα με μεγαλύτερη ευαισθησία ελήφθησαν με σύσταση του διαλύματος μεταφοράς 5,0 mM HEPES ρυθμιστικό διάλυμα/0,625 mM CaCl₂/0,5 mM EDTA σε pH=7,3, υποστηρίζεται από το Σχήμα 1.

Επίδραση της θερμοκρασίας

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία , το NOS έχει την μεγαλύτερη δραστηριότητα σε θερμοκρασία 37°C. Το σήμα όμως που πήραμε σε αυτή την θερμοκρασία δεν ήταν το μεγαλύτερο. Αυτό μπορεί να οφείλεται στους ακόλουθους λόγους:

α) Ο χρόνος ημιζωής του παραγόμενου NO ελαττώνεται όταν η θερμοκρασία αυξάνει στην υγρή φάση.(Σχήμα 6α)

Βελτιστοποίηση της εκπομπής χημειοφωταύγειας

Η βελτιστοποίηση επικεντρώθηκε στην ρυθμιστική ικανότητα του ρυθμιστικού διαλύματος - για το pH και pCa- του διαλύματος της γραμμής μεταφοράς, στο pH αυτού, στην θερμοκρασία αυτού και στην ταχύτητα ροής. Πρόσθετα ερευνήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας του διαλύματος της γραμμής μεταφοράς του αντιδραστηρίου χημειοφωταύγειας στο σήμα της χημειοφωταύγειας. Εκτός από εκεί που αναφέρεται διαφορετικά, η ταχύτητα ροής του διαλύματος της γραμμής μεταφοράς και του διαλύματος της γραμμής μεταφοράς του αντιδραστηρίου χημειοφωταύγειας είναι $0,76 \text{ ml min}^{-1}$, η θερμοκρασία είναι 20°C , το pH είναι 7,3 και η συγκέντρωση του δείγματος της L-αργινίνης είναι 0,05 M.

Πίνακας 1 Σήμα χημειοφωταύγειας που λαμβάνεται από δείγμα 0,05 M L-αργινίνης χρησιμοποιώντας διαφορετικά διαλύματα γραμμής μεταφοράς σε pH=7,3 και θερμοκρασία 20°C .*

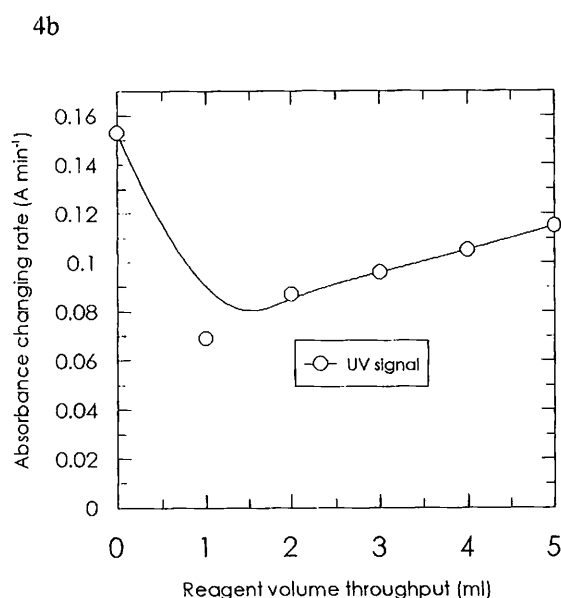
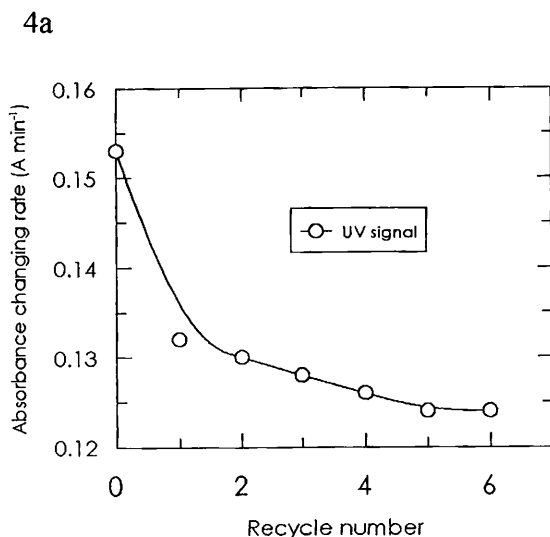
Carrier-stream solution composition (pH 7.3)	Designation	Background signal(mV)	Signal (mV)	Detection limit (mM)
HEPES 2 mM CaCl ₂ 0.25 mM EDTA 0.2mM	CSS.2	1.7	2.6	1.0
HEPES 5 mM CaCl ₂ 0.625 mM EDTA 0.5 mM	CSS.5	2.1	4.6	0.5
HEPES 10 mM CaCl ₂ 1.25 mM EDTA 1.0 mM	CSS.10	3.4	4.8	10
HEPES 25 mM CaCl ₂ 1.25 mM EDTA 1.0 mM	CSS.25	8.4	8.6	50

* The other conditions are at the set values as mentioned.

Επίδραση της σύστασης του διαλύματος μεταφοράς και του pH

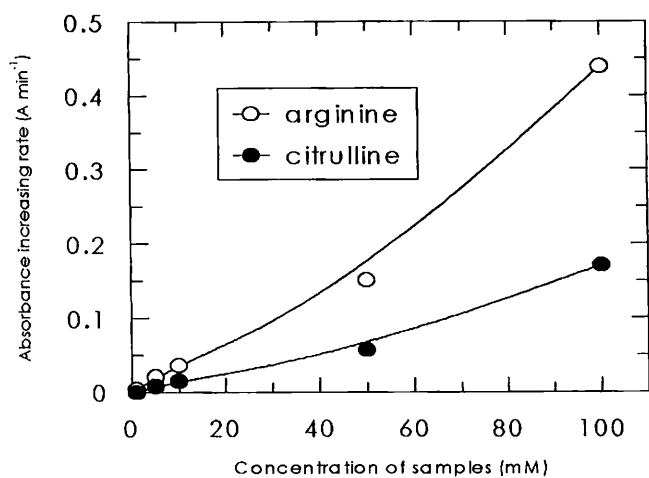
Το διάλυμα μεταφοράς αποτελείται από συστατικά τα οποία έχουν ρυθμιστική ικανότητα για τα ιόντα υδρογόνου και συμπλεκτική ικανότητα για τα ιόντα ασβεστίου. Και η ταχύτητα ροής δοκιμάστηκε περίπου έτσι ώστε η διαδικασία της ενζυμικής αντίδρασης να είναι βέλτιστη και να παράγει αρκετά μόρια NO τα οποία να βρίσκονται πάνω από το όριο ανιχνευσιμότητας του συστήματος της χημειοφωταύγειας. Από προκαταρκτική εργασία η ταχύτητα ροής $0,76 \text{ ml min}^{-1}$

Σχήμα 4 Ταχύτητα μεταβολής της απορρόφησης έναντι του αριθμού ανακύκλωσης (α) και του όγκου αντιδραστήριου (β).



Από τα δύο πειράματα είναι φανερό ότι η δραστηριότητα του NOS-ενζύμου για σχηματισμό του NO από την μετατροπή της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη ελαττώνεται με την συνεχή τροφοδοσία του διαλύματος της L-αργινίνης στον αντιδραστήρα του NOS-ενζύμου. Ωστόσο, από το Σχήμα 4β σε συνδυασμό με το Σχήμα 3 τα δεδομένα δείχνουν ότι στην αρχική λειτουργία του αντιδραστήρα (περιοχή μικρότερη του 1 ml) η συνολική ποσότητα της L-αργινίνης μετατρέπεται πολύ γρήγορα σε κιτρουλίνη. Αυτό υποδηλώνει ότι η αναγέννηση της δραστηριότητας του ενζύμου είναι μάλλον αργή διαδικασία. Η μείωση της δραστηριότητας μπορεί να

Σχήμα 2 Καμπύλες βαθμονόμησης της L-αργινίνης και L-κιτροουλίνης που βασίζονται στις ταχύτητες αύξησης της απορρόφησης έναντι της συγκέντρωσης.



(β) Πρότυπη καμπύλη που βασίζεται στα μοριακά κλάσματα της L-αργινίνης σε μικτά διαλύματα της L-αργινίνης και L-κιτροουλίνης.

Μίγματα από διαλύματα 0,05 M (ή 0,01 M) αργινίνης και κιτροουλίνης παρασκευάστηκαν σε αναλογίες όγκων που δίνουν μοριακά κλάσματα 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 και 1,0 μεταξύ των αμινοξέων αργινίνη και κιτροουλίνη. Οι κλίσεις αύξησης της απορρόφησης μετρήθηκαν όπως περιγράφηκε προηγούμενα στο πειραματικό μέρος και τα αποτελέσματα δίνονται σαν συνάρτηση του μοριακού κλάσματος της αργινίνης στο Σχήμα 3. Τα δεδομένα που ελήφθησαν με την φθορισμομετρική μέθοδο ήταν όμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν με την UV-απορρόφηση. Αν και η φθορισμομετρική μέθοδος είναι περισσότερο ευαίσθητη από την UV-απορρόφηση, οι συγκεντρώσεις της αργινίνης και κιτροουλίνης στα δείγματά μας δεν ήταν αρκετά χαμηλές για να δικαιολογήσουν την χρήση μια τέτοιας ευαίσθητης μεθόδου.

Διαδικασίες

Μεθοδολογία για τον προσδιορισμό της αργινίνης και κιτροουλίνης

Ποσότητα 0.5 ml δείγματος από διάλυμα αργινίνης τοποθετείται στην κυψελίδα του φασματοφωτομέτρου. Στη συνέχεια προστίθενται 2 ml από μίγμα διαλύματος διαλύτη (10 μM KH_2PO_4 (pH=5,9) υδατικό διάλυμα, ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και τετραυδροφουράνιο σε αναλογία όγκων 76:11,5:11,5:1 αντίστοιχα), και 0,5 ml από 1,0 mg ml^{-1} διαλύματος ο-φθαλαλδεύδης σε 0,3 M υδατικό διάλυμα β -μερκαπτοαιθανόλης. Το σύνολο αναδεύεται ισχυρά για ένα λεπτό και η κυψελίδα τοποθετήθηκε στο φασματοφωτόμετρο όπου μετρήθηκε συναρτήσει του χρόνου η απορρόφηση στα 350 nm (σε θερμοκρασία δωματίου). Η ταχύτητα αύξησης της απορρόφησης ελήφθη από την κλίση της καμπύλης αύξησης της απορρόφησης με το χρόνο, εντός ενός λεπτού από την έναρξη της αντίδρασης [135, 136]. Μια παρόμοια μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε για την φθορισμομετρική μέθοδο όπου παρακολουθήθηκε η εκπομπή φθορισμού στα 460 nm.

Μεθοδολογία για την ανίχνευση χημειοφωταύγειας του NO

Το δείγμα της L-αργινίνης εγχύθηκε δια μέσου της βαλβίδας (V) και προωθήθηκε με το ρυθμιστικό διάλυμα δια μέσου του αντιδραστήρα στην κυψελίδα του ανιχνευτή. Το NO σχηματίστηκε στον αντιδραστήρα του NOS-ένζυμου παρουσία Ca^{2+} . Η χημεία της αντίδρασης ελέγχθηκε από το ρυθμιστικό διάλυμα HEPES και από το συμπλεκτικό αντιδραστήριο EDTA. Το σχηματισθέν NO στην υδατική φάση αναμίχθηκε με τα αντιδραστήρια της χημειοφωταύγειας ακριβώς πριν την είσοδο στην κυψελίδα του συστήματος ανίχνευσης. Το παραγόμενο φώς μετρήθηκε ως προς την ένταση με τον φωτοπολλαπλασιαστή και καταγράφηκε.

3.2.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Προκαταρκτική εργασία για την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου

Γενικές πληροφορίες για το NOS ένζυμο

Το NOS -ένζυμο έχει τρία διαφορετικά ισοαντισώματα τα οποία απομονώνονται και καθαρίζονται από διάφορα όργανα ζωντανών οργανισμών.. Το e-NOS προέρχεται από ενδοθηλιακά κύτταρα, το nNOS ή bNOS προέρχεται από το νευρωνικό σύστημα

ευαισθησία της ΧΦ-ανίχνευσης. Περαιτέρω οι πειραματικοί παράμετροι, που επηρεάζουν την κινητική του σχηματισμού NO και τις φασματικές και χημικές παρεμποδίσεις εξετάζονται με προσοχή. Για παράδειγμα η επίδραση του pH, θερμοκρασίας, ταχύτης ροής, μεταλλοίων (όπως Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+}), οι συμπαράγοντες του NOS, όπως το NADPH, η καλμοδουλίνη, η τετραυδροβιοπτερίνη (H4BP), η διθειοθρεϊτόλη (DTT) εξετάστηκαν για βελτιστοποίηση του ΧΦ-σήματος. Πέραν, όμως, από την επίτευξη μιας νέας μεθόδου προσδιορισμού η εργασία αυτή συνεισφέρει και στην στρατηγική του προσδιορισμού του NO in vivo καθ' ότι αποτελεί το πρώτο βήμα της στρατηγικής αυτής όπου θεμελιώνονται βελτιστοποιημένες συνθήκες για την επίτευξη της πλέον ευαίσθητης ΧΦ-εκπομπής λουμινόλης παρουσία NO.

3.2.2 Πειραματικό μέρος

Αντιδραστήρια

Χημικά αντιδραστήρια: L-αργινίνη, L-κιτρουλίνη, ο-φθαλαλδεύδη αγοράστηκαν από την Sigma.

Χημικά για τα ρυθμιστικά διαλύματα: KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]), Tris(tris-(hydroxymethyl) amino-methane) αγοράστηκαν από την Merck.

Συμπλεκτικά αντιδραστήρια: EDTA αγοράστηκε από την Merck και EGTA αγοράστηκε από την Fluka.

Αντιδραστήρια ακινητοποίησης: CPG (ελεγχόμενων πόρων γυάλινα σφαιρίδια) (Sigma), γλουταραλδεύδη (Aldrich), γ-αμινοπροπυλτιεθοξυσιλάνιο (Sigma)

Αντιδραστήρια χημειοφωταύγειας: Λουμινόλη (Sigma), H_2O_2 30% w/v (Merck), 4-iodophenol (Aldrich) χρησιμοποιήθηκαν στην πιο καθαρή μορφή.

Βιοχημικά αντιδραστήρια: NOS, L-κιτρουλίνη, H4BP, DTT αγοράστηκαν από την Sigma και NADPH από την Merck.

Αέρια: Υψηλής καθαρότητας αέριο N_2 αγοράστηκε από την Air-Liquid, Γαλλία.

Διαλύτες: Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν απεσταγμένο. Οι οργανικοί διαλύτες όπως ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, τετραυδροφουράνιο και β-μερκαπτοαιθανόλη αγοράστηκαν από την Sigma.

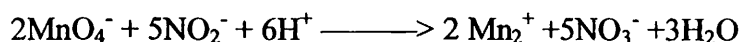
συστατικό του ζωικού περιφεριακού ιστού. Πολλά χρόνια αργότερα βρέθηκε πως η ακετυλοχολίνη βρίσκεται και στο νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου. Εκτοτε , οι συστηματικές μελέτες έδειξαν την πορεία σύνθεσης και απελευθέρωσής της στον εγκέφαλο, με αποτέλεσμα το χολινεργικό σύστημα να γίνει θέμα συνεχούς ενδιαφέροντος. Ακόμη και πρί δειχθεί ότι η ακετυλοχολίνη είναι διαβιβαστής στο κεντρικό νευρικό σύστημα, τα δεδομένα έδειχναν ότι τα αντι-χολινεργικά επιδρούσαν στην μάθηση και την μνήμη [126].

Οι περισσότερες αναφορές στον προσδιορισμό της ακετυλοχολίνης είναι σε αμπερομετρικές μεθόδους ανίχνευσης και μερικές σε ποτεντιομετρικές. Ποτεντιομετρικοί βιοαισθητήρες που παρασκευάστηκαν για τον προσδιορισμό της ακετυλοχολίνης συχνά χρησιμοποιούν pH-μετρα , εκλεκτικά ηλεκτρόδια για τον προσδιορισμό της χολίνης [106-110]. Θεωρώντας τους ηλεκτροχημικούς μεταλλάκτες για την ανίχνευση, η αμπερομετρική μέθοδος προσφέρει καλύτερο όριο ανιχνευσιμότητας. Το πρόβλημά του είναι ότι απαιτείται η χρήση δεύτερου ενζύμου που οδηγεί στην πολυπλοκότητα των δυνεζυμικών συστημάτων. Επί πλέον η δραστικότητα της χολινοξειδάσης είναι γενικά χαμηλότερη από την δραστικότητα της ακετυλοχολινεστεράσης και γιαυτό το περιοριστικό βήμα είναι η μετατροπή του από την χολινοξειδάση [111-119].

Λόγω της βιολογικής σημασίας της εμφανίστηκε μια μεγάλη ποικιλία από διαφορετικές μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ακετυλοχολίνης σε διαφορετικά δείγματα.. Για υψηλή εκλεκτικότητα συχνά χρησιμοποιούνται ενζυματικές αντιδράσεις. Η υδρόλυση που καταλύεται από το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης είναι η εκλεκτική αντίδραση που χρησιμοποιείται στους προσδιορισμούς της. Συχνά, όμως απαιτείται ένα δεύτερο ενζυματικής δράσης βήμα που γίνεται με το ένζυμο χολινοξειδάση για την οξείδωση της χολίνης. Ένα προϊόν της δεύτερης ενζυματικής δράσης είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου που ανιχνεύεται με την χρήση αμπερομετρικής ή χρωματομετρικής τεχνικής [120-125]. Γενικά οι πιο πάνω μέθοδοι περιορίζονται από την ευαισθησία της ανίχνευσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και την μικρή επαναληψιμότητα λόγω της παρεμπόδισης από το βιολογικό δυναμικό. Στην διατριβή αυτή αναπτύχθηκε τεχνική που βασίζεται στην υψηλής ευαισθησίας χημειοφωταυγή ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το σύστημα ανίχνευσης ζεύγνυται με ενζυμικό αντιδραστήρα με την χρήση των ενζύμων AchE και ChOD.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη χημειοφωταυγών μεθόδων για την ανίχνευση βιο-υλικών και ιδιαίτερα αυτών που χρησιμοποιούνται σαν βιο-δείκτες υγείας και για την πρόβλεψη ασθενειών. Το Μονοξείδιο του Αζώτου (NO) είναι ο πρώτος στόχος μας καθώς επίσης και οι σχετικές βιολογικές διεργασίες που μπορούν να παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Για το μονοξείδιο του αζώτου έγιναν προσπάθειες στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής να αναπτυχθεί μια μέθοδος άμεσου προσδιορισμού του *in vivo* ώστε ο ιατρός να μπορεί να παρακολουθεί την εξέλιξη της παραγωγής NO στον έμβιο οργανισμό κατά την διάρκεια διαφόρων επεμβάσεων. Αντίστοιχη προσπάθεια έγινε και για το προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου βάσει του οποίου έγινε δυνατή η παρακολούθηση της ακετυλοχολίνης με χρήση μεμβρανικού ενζυμικού αντιδραστήρα με εξειδικευμένες ιδιότητες διήθησης μορίων.



Στα πειράματα της διατριβής αυτής, ο προσδιορισμός των νιτρωδών έγινε για να ελεγχθεί το ποσό των νιτρωδών που καταναλίσκονται για την παραγωγή του NO στις μεθόδους παρασκευής του NO με ανόργανες αντιδράσεις αναγωγής των νιτρωδών προς NO. Από την εφαρμογή των μεθόδων αυτών φάνηκε πως η χρήση της πρώτης μεθόδου (Griess) ήταν πιο ακριβής για τις υπολειμματικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Περισσότερες λεπτόμεριες παρέχονται στο μέρος των αποτελεσμάτων στην αντίστοιχη ενότητα.

2.10. ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΟΡΓΑΝΩΝ

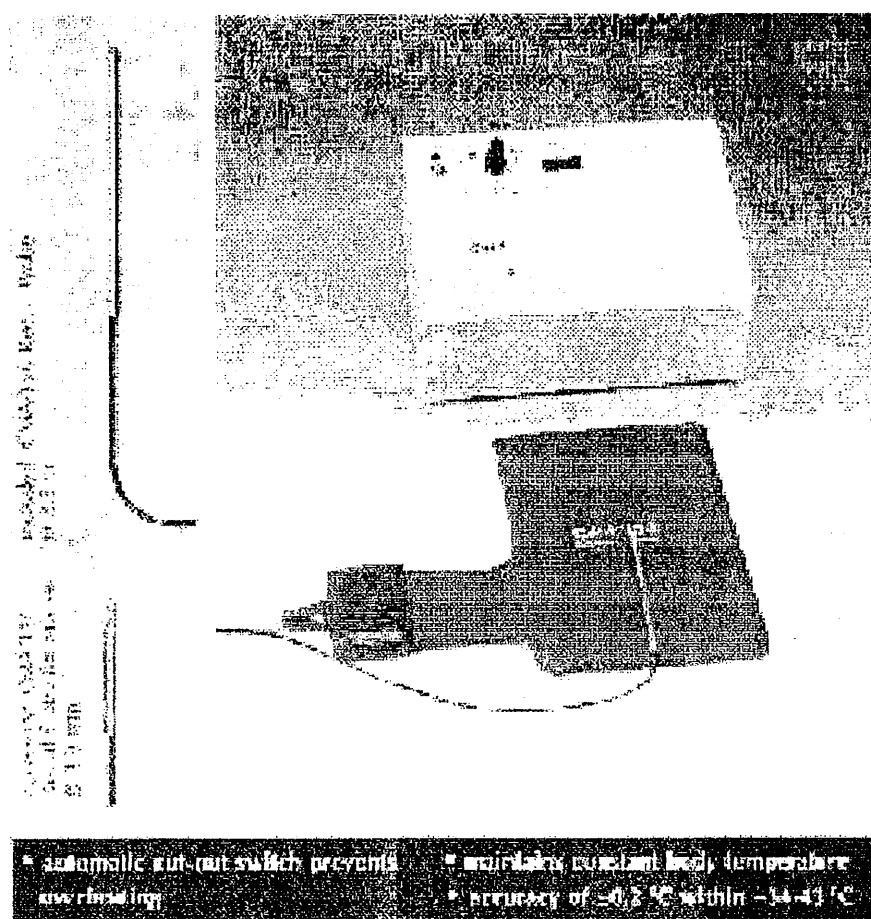
2.10.1. Φασματοφωτομέτρο

Για να ελεγχθεί κατά πόσο το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατής ακτινοβολίας (SECOMAM S1000PC) διατηρεί την αρχική βαθμονόμηση σε μ.κ. και ένταση έγινε επανεξέταση αυτού με χρήση διαλύματος πρώτυπης ένωσης διχρωμικού καλίου.

2.11. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ FIA/ΧΦ-ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Για να επιτευχθεί η βέλτιστη ευαισθησία του ανιχνευτικού συστήματος των βιο-υλικών, είναι σημαντικό να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες, ειδικά για το σύστημα ροής και μικροδιαπίδυσης που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία της διατριβής. Πολλοί παράγοντες, όπως συγκεντρώσεις στις διάφορες ροές, τα pH των διαλυμάτων με τις διάφορες ρυθμιστικές ικανότητές των, η θερμοκρασία, ο χρόνος απόκρισης, η ταχύτης άντλησης κ.ο.κ. πρέπει να βελτιστοποιηθούν. Για την βελτιστοποίηση των συνθηκών εργασίας, γενικά χρησιμοποιήθηκε η μεθοδος της μεταβολής ενός παράγοντα κάθε φορά ενώ οι άλλοι παραμένουν σταθεροί. Με την λογική αυτή βελτιστοποιήθηκαν οι παράμετροι της συσκευής στην ΧΦ-αντίδραση της λουμινόλης. Η βελτιστοποιημένη συσκευή βελτιστοποιήθηκε στην ΧΦ-ανίχνευση του NO κάνοντας χρήση της παρασκευής αυτού με την ενζυματική δράση του NOS επί της αργινίνης. Η βελτιστοποιημένη ΧΦ-ανίχνευση του NO στην βελτιστοποιημένη συσκευή FIA βελτιστοποιήθηκε στην ΧΦ-ανίχνευση του NO παρουσία των πορφυρινικών βιομορίων που παρέχουν σχετικά υψηλό ΧΦ-υπόβαθρον· στην πραγματικότητα έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών για την μείωση της ΧΦ-

Εικ. 14 Απεικόνιση του οργάνου ελέγχου θερμοκρασίας του ζώου με το ανιχνευτικό στοιχείο



Τα ανιχνευτικά στοιχεία των αγγείων (Εικ.11) εμφυτεύθηκαν στα ακόλουθα μέρη για την παρακολούθηση του NO αντίστοιχα

- Δεξιά κεντρική αρτηρία του αυτιού
- Δεξιά περιθωριακή φλέβα του αυτιού
- Δεξιά μοιραία αρτηρία
- Δεξιά σφαγίτιδα φλέβα.

2.9. ΠΡΟΤΥΠΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

2.9.1. Φασματοφωτομετρική ανάλυση της L-Αργινίνης και L-Κιτρουλίνης

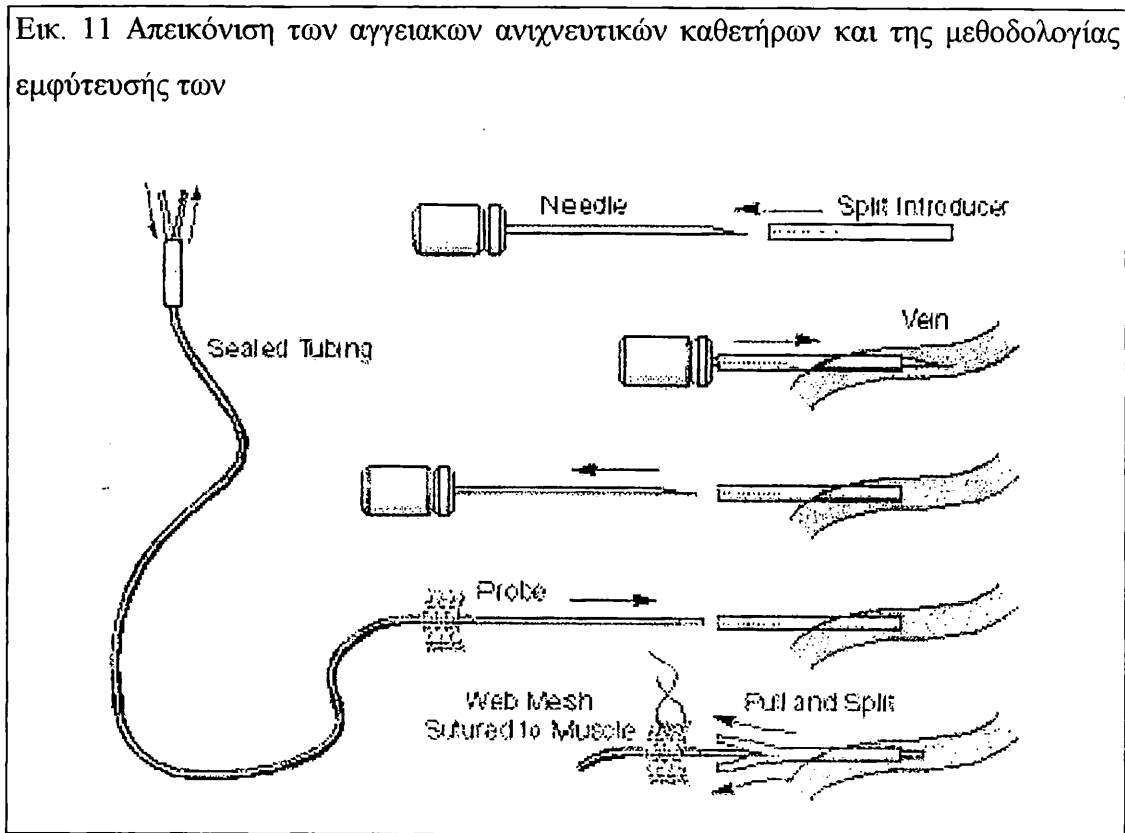
αρτηρίας. Περαιτέρω τα κουνέλια χρησιμοποιήθηκαν για την συνεχή λήψη αίματος σε διαφορετικές φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες λειτουργίας του οργανισμού.

2.8.2. Μέθοδος αναισθησίας και χειρουργικής επέμβασης

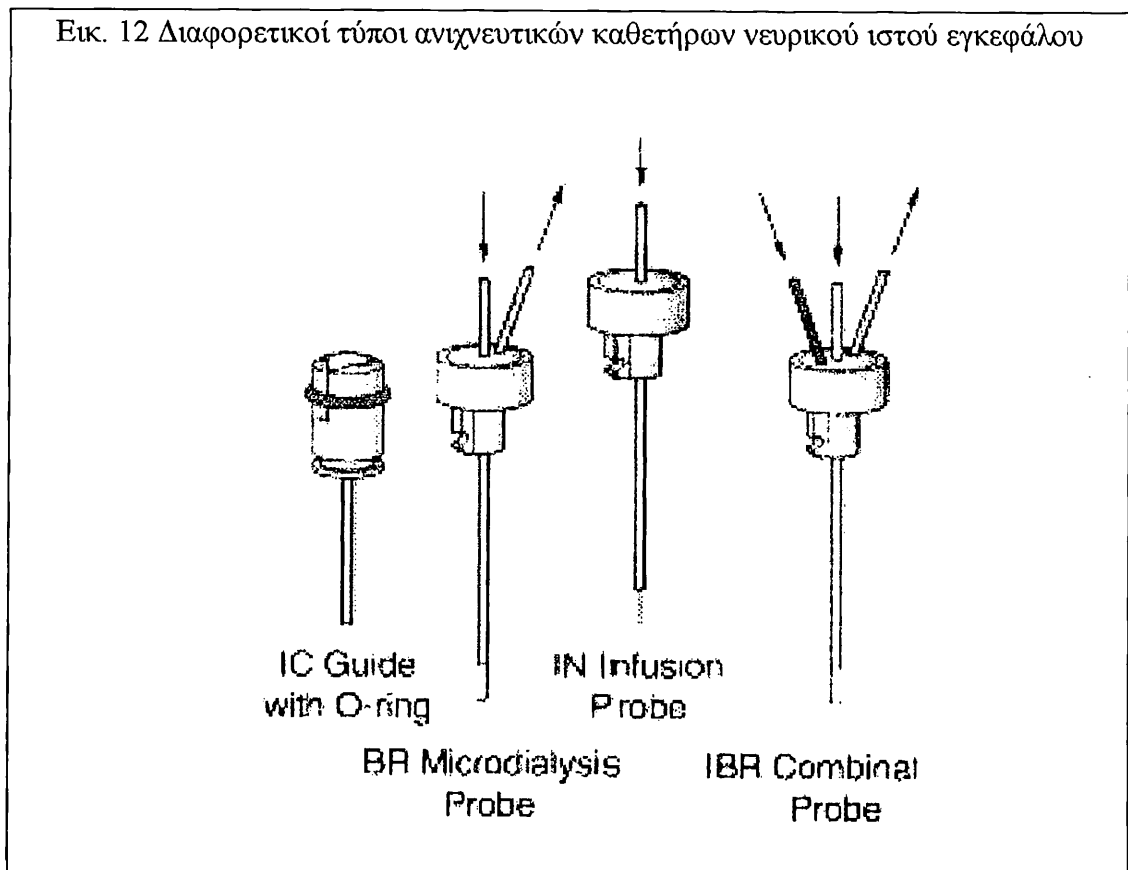
Γενικά, η αναισθησία στα ζώα επιτυγχάνεται με την χρήση θειοπεντάλης, κεταμίνης ή αλοθάνης. Η ενδοτραχειακή διασωλήνωση επιτυγχάνεται με cis-atracurium, με ηλεκτρουλοχολίνη ή vecuronium. Τα κουνέλια πειραματόζωα διασωληνώθηκαν τραχειακά και αερίζονταν με ανεμιστήρα με μίγμα αέρα οξυγόνου και μια 50% εισπνεόμενη αναλογία οξυγόνου ($FI_{O_2}=0,5$) και όγκο τεχνητής εισπνοής (V_i) 10 έως 15 mL/kg και ταχύτητα ανεμιστήρα ρυθμισμένη ώστε να διατηρεί το end-tidal πίεση (εκπνοής) σε διοξείδιο του άνθρακα ($ETCO_2$) μεταξύ 35 και 40 mmHg και παρακολουθούνταν συνεχώς με ηλεκτροκαρδιογράφο και $ETCO_2$. Η αναισθησία διατηρείτο με cis-atracurium και fentanyl (1-2 g/kg/hr). Μετά την επίδραση του αναισθητικού, τα αρσενικά κουνέλια ζυγίσθηκαν και ηπαρινοποιήθηκαν.

Τα δείγματα αίματος (5 ml μια φορά) ελήφθησαν από την κεντρική αρτηρία του αυτιού (αριστερό) για ανάλυση αίματος για τις ακόλουθες παραμέτρους: πίεση οξυγόνου, και διοξείδιου του άνθρακα (P_{O_2} , P_{CO_2}), pH, γλυκόζη, ουρικό οξύ, Ca^{2+} , και K^+ . Η πίεση του αίματος και η καρδιακή συχνότητα της καρδιάς παρακολουθούνταν με ανιχνευτικό στοιχείο διαμέσου της αριστερής μοιραίας αρτηρίας (Εικ. 13)

Εικ. 11 Απεικόνιση των αγγειακών ανιχνευτικών καθετήρων και της μεθοδολογίας εμφύτευσής των



Εικ. 12 Διαφορετικοί τύποι ανιχνευτικών καθετήρων νευρικού ιστού εγκεφάλου



πειραματικό μέρος της επόμενης παραγράφου που περιγράφεται η κατασκευή της σύνθετης μεμβράνης.

2.6.5. Ακίνητοποίηση ενζύμων με παγίδευση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Η χρήση της πηκτής του πολυακρυλαμιδίου για την ακίνητοποίηση των ενζύμων ξεκίνησε από το 1960. Η πηκτές κατέχουν μερικά ειδικά χαρακτηριστικά επειδή μπορούν να παραχθούν φορτία στο εσωτερικό τους. Οι ακρυλαμιδικές αιωρούμενες αλυσίδες μπορούν να αντιδρούν με τα συστατικά του μακροπεριβάλλοντος και να δημιουργούν ομάδες ακρυλικού οξέος. Υπό τις συνθήκες αυτές, τα ένζυμα ενστροματούνται σ'ένα τριδιάστατο έντονα αρνητικά φορτισμένο πλέγμα που σχηματίζεται από τις πολλές ιονισμένες καρβοξυλομάδες του συνθετικού φορέα. Το ένζυμο λοιπόν εκτίθεται σε ισχυρό ηλεκτροστατικό πεδίο που μπορεί καθοριστικά να επηρεάσει το τρόπο της δράσης του. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου μπορεί να παγιδεύσει τα ένζυμα με φυσικές δυνάμεις, και η μέθοδος αυτή διατηρεί την υψηλή δραστικότητα των ενζύμων, αλλά η διαφυγή των ενζύμων από το στηρικτικό υλικό οδηγεί σε χαμηλές αποδόσεις, γιατί συνήθως προστίθενται ίχνη γλουταραλδεύδης που μπορεί να τα συγκρατήσει. Από την άλλη πλευρά, τα ίχνη γλουταραλδεύδης θα μειώσουν την δραστικότητα των ενζύμων σε κάποιο βαθμό. Για να ξεπεραστεί και αυτό το εμπόδιο στο εργαστήριό μας αναπτύχθη νέα μέθοδος με χρήση του συστήματος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης όπου αρχικά ή στρεπταβιδίνη παγιδεύεται στην πηκτή και τα ένζυμα συζεύγνυνται με την βιοτίνη. Με την μέθοδο αυτή τα ένζυμα απέκτησαν 10-φορές μεγαλύτερη δραστικότητα από την απ'ευθείας μέθοδο παγίδευσης.

2.6.6. Συνακίνητοποίηση περισσότερων ενζύμων στο ίδιο στηρικτικό υλικό

Κατά την κατασκευή βιοαισθητήρων, συχνά, η ενζυματική αντίδραση θα πρέπει να περάσει περισσότερα από ένα ένζυμα. Σε τέτοιες περιπτώσεις, δύο ή και τρία ένζυμα απαιτούνται να αντιδράσουν μαζί ή χωριστά για να πάρουμε κάποιο ανιχνεύσιμο σήμα. Γιαυτό η συνακίνητοποίηση των ενζύμων είναι απαραίτητη. Γενικά, όσο περισσότερα ένζυμα συνακίνητοποιούνται, τόσο πτωχότερες δραστικότητες επιτυγχάνονται, πιθανώς λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων, ενώ, ακόμη οι ενεργές θέσεις στον φορέα είναι περιορισμένες. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με την χρήση του συστήματος βιοτίνης/στρεπταβιδίνης.

2.6.7. Ακίνητοποίηση με το σύστημα Βιοτίνης/στρεπταβιδίνης

Η πρόσδεση με το σύστημα βιοτίνης/στρεπταβιδίνης χρησιμοποιήθηκε για να παράγει υπερμοριακά συσσωματώματα με μια διεργασία αυτο-συναρμολόγησης για

θέση στην CH₂-περιοχή κάθε βαρείας αλυσίδας, η προσέγγιση αυτή αφήνει τις δύο Fab (πρόσδεση αντιγόνου) περιοχές του αντισώματος ελεύθερες να αλληλεπιδρούν με την κινητή φάση. Τα ενεργοποιημένα με υδραζίδιο στηρικτικά πυριτικά-τεμάχια χρησιμοποιήθηκαν επίσης για κατευθυνόμενης θέσης προσάρτησης αντισωμάτων· όμως, μόνο χαμηλής δραστηριότητας ακινητοποιημένα αντισώματα επετεύχθησαν. Για την βελτίωση της μεθόδου αυτής, προσαρτήθηκαν διυδραζίδια σε οξειδωθείσα διολο-δεμένη πυριτία. Το προκύπτων ενεργοποιημένο στηρικτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία στην ακινητοποίηση οξειδωμένων πρωτεϊνών όπως το IgG γίδας και κουνελιού, την κάροτο-περοξειδάση και το tRNA. Ένα πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι επιτρέπει την ακινητοποίηση δια μέσου κατευθυνόμενης-θέσης προσάρτησης.

Η χρήση των στηρικτικών υλικών με βάση την πυριτία καθώς και των ελεγχόμενων πόρων σφαιριδίων γιαλιού για την ακινητοποίηση των ενζύμων, αντισωμάτων και άλλων πρωτεϊνών ήταν γνωστή για αρκετό καιρό. Η σιλιανοποίηση με 3-αμινοπροπυλο τριαιθόξυσιλάνιο(ATES) για την ακινητοποίηση αντισωμάτων είχε επίσης αναπτυχθεί. Για παράδειγμα, η ATES χρησιμοποιήθηκε για την προκατεργασία γιάλινων επιφανειών ή χαλαζιακών κρυστάλλων και υπήρξε η γέφυρα για την πρόσδεση της γλουταραλδεύδης επιτρέποντας την χημική πρόσδεση της τερματικής αλδεύδης στην αμινομάδα αντισωμάτων. Παρ' όλο που η μέθοδος αυτή είναι αποτελεσματική για την ενεργοποίηση της πυριτίας και θα μπορούσε να μειώσει την μη-εξειδικευμένη προσάρτηση στην στερεά φάση, δεν επιτυγχάνεται κατευθυνόμενης-θέσης προσάρτηση του αντισώματος. Περαιτέρω, με την χρήση ενεργοποιημένου γιαλιού ελεγχόμενων πόρων σαν φορέα, τα ένζυμα ακινητοποιήθηκαν δια μέσου της μεθόδου της γλουταραλδεύδης. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα στο εργαστήριο σε γραμμή με ενζυματική αντίδραση σε συσκευή- FIA για τον προσδιορισμό διαφόρων αναλυόμενων με διαφορετικούς αισθητήρες.

2.6.3. Ακινητοποίηση ενζύμων σε νάλον

Το νάλον, λόγω το χαμηλού του κόστους, τις εξαιρετικές χημικές (αδρανές, μη-τοξικό) και μηχανικές ιδιότητες και την προσιτότητά του σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών μορφών (π.Χ. σκόνες, σφαιρίδια, δίχτια, σωλήνες, υμένα, φύλλα, κ.λ.π., είναι ελκυστικό υλικό για την ακινητοποίηση ενζύμων. Η παλαιότερη πρακτική μεθοδολογία περιελάμβανε μερική όξινη υδρόλυση της επιφανείας του νάλου ώστε να παράγει αμινομάδες (και καρβοξυλικές ομάδες) που μπορούσαν να

και άλλων αντι-ακέτυλο-χολίνης ενώσεων με φθορισμική μέθοδο οπτικής ίνας βασίζεται στην παρεμπόδιση της δράσης της AchE. Μετά την υδρόλυση της ακετοχολίνης από την AchE παράγονται οξεϊκό οξύ και χολίνη, και έτσι μειώνεται το pH του διαλύματος προκαλώντας την μεταβολή φθορισμού του ευαίσθητου στο pH φθορισμικού δείκτη του συστήματος.

Η μέθοδος έχει ευρύτητα χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή αισθητήρων οπτικής ίνας λόγω των πλεονεκτημάτων που έχουν. Πρώτα, τα υλικά γιαλιού και τα ανόργανα κεραμικά που παρασκευάζονται με την τεχνική κολοειδούς-πηκτής είναι διαφανή, και τα πλέον κατάλληλα για ποσοτικούς φασματοφωτομετρικούς προσδιορισμούς.. Ακόμη, το γιαλί είναι χημικά αδρανές υλικό, φωτο- και θερμο-σταθερό, που ενδείκνυται για εφαρμογές σε επικίνδυνα περιβάλλοντα. Τέλος, η συνολική μεθοδολογία ακινητοποίησης είναι απλή και τα ακινητοποιημένα ένζυμα διατηρούν υψηλή δραστηριότητα και γενικά τα αντιδραστήρια δεν διαρρέουν από το στηρικτικό υλικό.

2.6.2. Ακινητοποίηση σε γιάλινα σφαιρίδια

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα για την ακινητοποίηση ενζύμων, και ιδιαίτερα για το DNA. Λόγω της εξαιρετικής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας στην ανίχνευση ειδικών γονιδίων και τις δυνατότητας να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές στην ιατρική, τα τρόφιμα, την γεωργία, και το περιβάλλον, η ανάπτυξη DNA-βιοαισθητήρων προοδεύει. Με την πρόσφατη δημιουργία της τεχνολογίας των DNA-ανιχνευτικών στοιχείων έχουν ταυτοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός εκλεκτικών ολιγονουκλεοτιδικών-ανιχνευτικών στοιχείων που αλληλεπιδρούν με ειδικές DNA-αλληλουχίες σε βιολογικά είδη με αποτέλεσμα τα εξειδικευμένου είδους DNA-ανιχνευτικά στοιχεία να χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Οι DNA-βιοαισθητήρες δεν διατίθενται ευρέως στην αγορά λόγω προβλημάτων που σχετίζονται με την ευαισθησία, την επαναληψιμότητα, την μακρόχρονη σταθερότητα, και του μη-εξειδικευμένου χαρακτήρα της πρόσδεσής των DNA-ανιχνευτικών στοιχείων σε επιφάνειες. Για να λυθούν τα προβλήματα αυτά έγιναν μερικές προσπάθειες για να παράγουν DNA-αισθητήρες με υψηλή χημική σταθερότητα, επαναληψιμότητα και περισσότερη εξειδικευμένη προσρόφηση στην επιφάνεια.

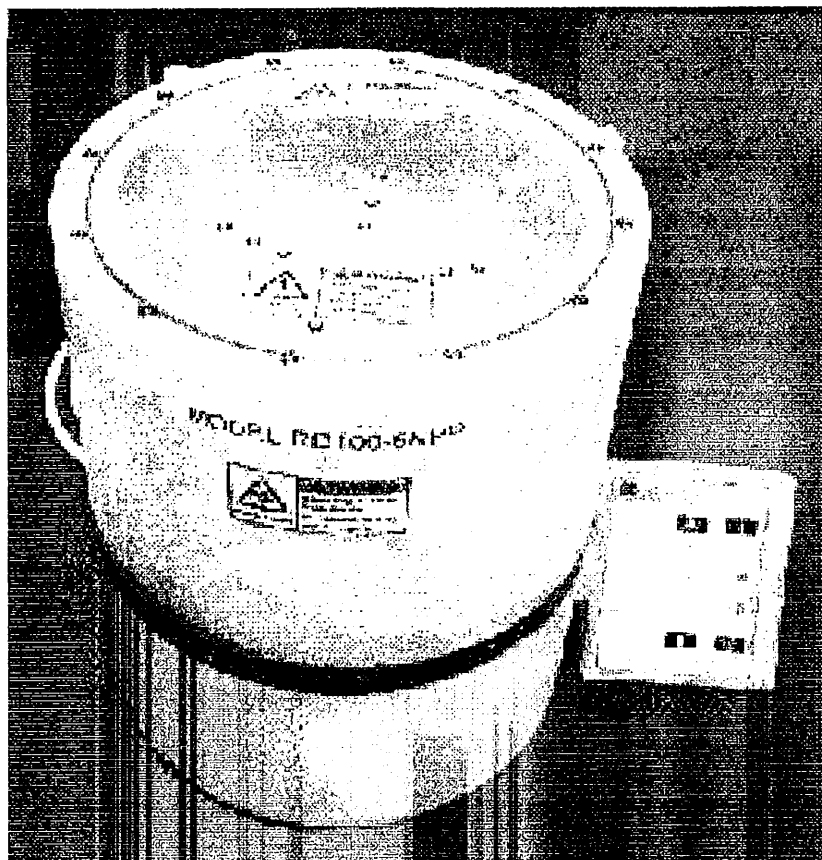
Προσάρτηση του DNA σε στερεά στηρικτικά υλικά είναι χρήσιμη σε πολλές βιοτεχνολογικές και μοριακής βιολογίας εφαρμογές. Διάφορα στηρικτικά υλικά, όπως γιαλί, κεραμικά, όστια πυριτίου, μαγνητικά σφαιρίδια, νάυλον, πολυμερή, και μεμβράνες είναι χρήσιμα για τις εφαρμογές. Διαφορετικές τεχνικές ακινητοποίησης

Τα ακινητοποιημένα ένζυμα έχουν ευρύτερες εφαρμογές μεταξύ των οποίων οι κυριότερες είναι στην επεξεργασία τροφίμων και στην βιομηχανική χημεία. Η χρήση ακινητοποιηθέντων ενζύμων για την χημική ανάλυση έχει δημιουργήσει σημαντικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Αισθητήρες και βιοαισθητήρες σε αναλύσεις με συσκευή-FIA έχουν προταθεί στις τελευταίες δύο δεκαετίες για τον προσδιορισμό πολλών αναλυόμενων ενώσεων. Όλες οι διεργασίες και τεχνικές που χρησιμοποιούν ακινητοποιημένα ένζυμα επιβάλλουν την επιλογή του είδους του στηρικτικού υλικού και την μέθοδο ακινητοποίησης, μαζί με την περιγραφή της μεθόδου βελτιστοποίησης των μεταβλητών της συσκευής και των συνθηκών αντίδρασης.

Τα στηρικτικά υλικά που συχνά χρησιμοποιούνται είναι πολυμερικού χαρακτήρα, που έχουν πλέγματα μορίων υψηλού μοριακού βάρους που προσροφούν διαλύτες, κυρίως νερό, αλλά είναι αδιάλυτα. Οι αλληλεπιδράσεις που ευθύνονται για την ρόφηση των διαλυτών είναι μεταξύ άλλων, τριχοειδείς δυνάμεις, οσμωτική πίεση και μοριακές αλληλεπιδράσεις πολυμερούς/διαλύτη. Η ρόφηση του διαλύτη στους πόρους του πολυμερούς οδηγεί τα ένζυμα σε θέσεις που αυτά μπορούν να εγκατασταθούν. Τα ένζυμα στους πόρους του πολυμερούς βρίσκονται σε διαφορετικό περιβάλλον όπου οι ιδιότητές των επηρεάζονται κατά κύριο λόγο από ένα αριθμό παραγόντων, και ιδιαίτερα από τους παράγοντες που σχετίζονται με την χημική και φυσική φύση του στηρικτικού υλικού. Η ακινητοποίηση μπορεί να αλλάξει την κατανομή του υποστρώματος, τα προϊόντα αντίδρασης ή την συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου μεταξύ του μικροπεριβάλλοντος και μακροπεριβάλλοντος του ενζύμου, και όλα αυτά σαν συνέπεια των ηλεκτροστατικών ή υδροφιλικών/υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της βάσης και των συστατικών του περιβάλλοντος. Περιορισμοί διάχυσης μπορεί να εμφανισθούν, ιδιαίτερα στην διάχυση του υποστρώματος και των προϊόντων μεταξύ του εσωτερικού του στηρικτικού υλικού και του μακροπεριβάλλοντος. Τέλος, η ακινητοποίηση μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην δομή του ενζύμου και ακόμη στερεοχημική παρεμπόδιση εξαρτωμένου στο πως το ένζυμο συνδέεται με το στηρικτικό υλικό. Αυτές οι επιδράσεις αντικατοπτρίζονται στην δραστικότητα και τα κινητικά φαινόμενα της αντίδρασης καθώς και στην σταθερότητα των και κατά κύριο λόγο επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις των με το υπόστρωμα και ως εκ τούτου τα χαρακτηριστικά της ενζυματικής δράσης.

Η ακινητοποίηση των ενζύμων είναι ένα σημαντικό βήμα για την ανάλυση των βιομορίων. Οι πιο συμβατικές μεθοδολογίες για την ακινητοποίηση βιομορίων περιλαμβάνουν την σταυρωτή διασύνδεση, την ομοιοπολική πρόσδεση, και την

Εικ. 10. Απεικόνιση της συσκευής επικάλυψης με φυγοκέντρωση



2.5.3.3 Επίστρωση με εμφάνιση: Σ' αυτή την μέθοδο, το μεμβρανοειδές στερεό στρώμα στήριξης εμφαπίζεται στο διάλυμα επίστρωσης για κάποιο χρονικό διάστημα, και στην συνέχεια αποσύρεται από το διάλυμα και αφήνεται στον αέρα να εξατμισθεί ο διαλύτης. Γενικά το πάχος εξαρτάται από το ιξώδες του διαλύματος και τον χρόνο εμφάνισης. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα λόγω της άνεσης, της προσιτότητας, και της εύκολης εκτέλεσής της.

2.5.3.4 Επίστρωση με επωαστική σύνδεση: Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την σύζευξη του ζεύγους βιοτίνης-αβιδίνης (ή στρεπταβιδίνης). Το διάλυμα επικάλυψης (διάλυμα αντιδραστηρίων) μπορεί να συζευχθεί με το μεμβρανοειδές στρώμα στήριξης δια μέσου βιοτίνης ή αβιδίνης που προηγούμενα έχει στερεωθεί στο στρώμα στήριξης. Η ισχύς πρόσδεσης εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τον χρόνο επώασης και την συγκέντρωση των αντιδραστηρίων στο διάλυμα. Γενικά, σύμφωνα με τις ιδιότητες της στηρικτικής μεμβράνης η επικάλυψη με επωαστική σύνδεση μπορεί να γίνει με δύο μεθόδους ήτοι:

φάσεων και συνήθως οδηγεί στον εμποτισμό, ή στην παγίδευση ή στην προσρόφηση. Για παράδειγμα, τα ένζυμα συχνά παγιδεύονται από οιαδήποτε πηκτή (πηκτή χιτοζάνης, ή πηκτή πολυακρυλαμιδίου). Αυτό το είδος της προσάρτησης των ενζύμων δεν είναι ισχυρό και εύκολα μπορεί να καταστραφεί. Για παράδειγμα εάν χρησιμοποιηθεί παγίδα πηκτής πολυακρυλαμιδίου για τα ένζυμα ChOD και AchE για την κατασκευή αισθητήρα Ach, το ένζυμο ChOD διαφεύγει γρήγορα λόγω του μικρού μοριακού του βάρους και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την χαμηλή ευαισθησία του αισθητήρα.

2.5.2.2. Προσάρτηση με σταυρωτή διασύνδεση: Συχνά, τα μειονεκτήματα της φυσικής προσρόφησης μπορούν να ξεπεραστούν μέσω περαιτέρω σταυρωτής διασύνδεσης με την προσθήκη δραστικών ενώσεων (π.χ. γλουταραλδεύδης ή EDAC), οι διάφορες ομάδες ενώσεις μπορούν να συζευχθούν με ομοιοπολικούς δεσμούς. Στην πράξη, η μέθοδος γλουταραλδεύδης φάνηκε πιο αποτελεσματική.

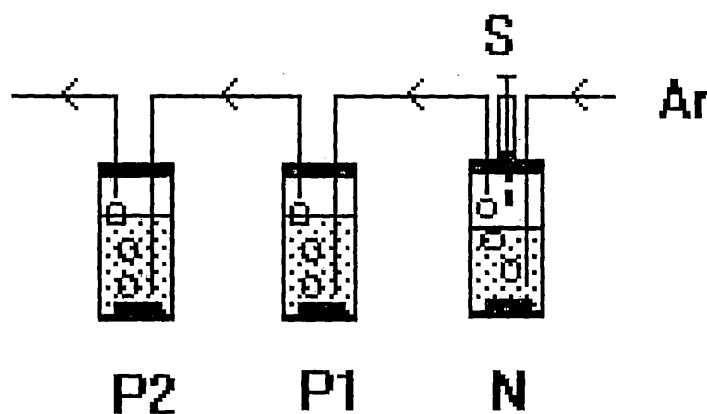
2.5.2.3. Προσάρτηση με ομοιοπολικό δεσμό: Η μέθοδος είναι παρόμοια με την μέθοδο της ομοιοπολικής διασύνδεσης. Στην μεθοδολογία αυτή, κάποια ειδική μέθοδος χρησιμοποιείται για να ενεργοποιήσει την μία ή και τις δύο όψεις του στρώματος στήριξης, ώστε να δημιουργηθούν ενεργές θέσεις στην επιφάνεια που μπορούν να συζευχθούν δια μέσου ομοιοπολικού δεσμού με τα ένζυμα. Για παράδειγμα η μεμβράνη της οξεικής κυτταρίνης μπορεί να ενεργοποιηθεί με την μέθοδο επεξεργασίας Υπεριωδικών-Ουρίας-Φορμαλδεύδης και μετά να συζευχθεί με ένζυμα παγιδευμένα σε πολυακρυλαμιδική πηκτή.

2.5.2.4. Προσάρτηση με χρήση του ζεύγους Βιοτίνης-αβιδίνης: Η αβιδίνη (ή Στρεπταβιδίνη) εμφανίζει πολύ ισχυρή συγγένεια με την βιοτίνη. Δύο φάσεις διαφορετικής χημικής σύστασης μπορούν να προσκολληθούν εύκολα εάν η αβιδίνη ενσωματωθεί στην μια φάση και βιοτίνη στην άλλη. Επί πλέον το σύστημα αυτό της σύνδεσης προσδίδει ενίσχυση δραστηριότητας εφ' όσον ένα μόριο αβιδίνης μπορεί να συζευχθεί με 4-μόρια βιοτίνης μαρκαρισμένα με ένζυμο. Το σύστημα αυτό είναι πολύ χρήσιμο για την ακινητοποίηση ενζύμων, την παρασκευή σύνθετων μεμβρανών, την σήμανση με μόρια-δείκτες, και την ανίχνευση· ακόμη είναι χρήσιμη και στο πεδίο της φαρμακευτικής στην τεχνολογία χορήγησης φαρμάκων.

2.5.2.5. Προσάρτηση με πολυμερισμό: Γενικά η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την κατασκευή προστατευτικού υμενιακού στρώματος. Σ' αυτή την μεθοδολογία, μερικά ειδικά μονομερή διασπείρονται ή εμποτίζονται την επιφάνεια του στρώματος στήριξης ή αντίδρασης οπότε ο εν συνεχεία πολυμερισμός των δημιουργεί ένα

- NO-αέριο καθαρής μορφής από οβίδα διαβιβάστηκε διαδοχικά δια μέσου παγίδων με υδατικά διαλύματα υδροξειδίου του καλίου και πυρογαλλόλης για την απομάκρυνση ιχνών οξυγόνου και σωματιδίων NOx
- Το NO παρασκευάστηκε εργαστηριακά από την ενζυματική μετατροπή της L-αργινίνη σε L-κιτροουλίνη και NO με την δράση του ενζύμου NOS ακινητοποιημένου σε αντιδραστήρα ροής της συσκευής FIA/XΦ-ανίχνευσης
- Το NO παρασκευάστηκε εργαστηριακά με την αναγωγή νιτρωδών αλάτων με ιωδιούχο κάλιο ή υδράργυρο και καθαρισμό του παραγόμενου NO-αερίου με χρήση παγίδων με διαλύματα KOH και πυρογαλλόλης (Εικ.9)

Εικ.9. Συσκευή παρασκευής NO-αερίου με την βοήθεια ανόργανων αντιδράσεων και περαιτέρω καθαρισμού: N= αντιδραστήρας, P1= παγίδα KOH, P2=παγίδα πυρογαλλόλης, S=σύριγγα προσθήκης αντιδραστηρίου, Ar= Αργόν αέριο για τον παρασυρμό του παραγόμενου από την αντίδραση NO-αερίου. Περισσότερες λεπτομέρειες για τις παρασκευαστικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στα επί μέρους πειραματικά μέρη που παρατίθενται στις κατά περίπτωση ερευνητικές εργασίες.



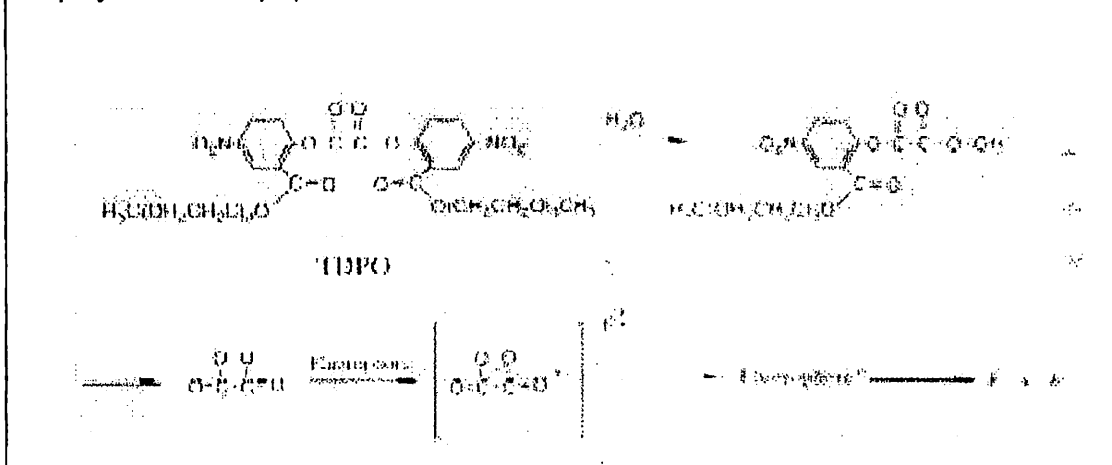
2.5. ΣΥΝΘΕΤΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ

2.5.1. Περιγραφή των σύνθετων μεμβρανών

Σύνθετες μεμβράνες χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση μερικών αναλυόμενων από πολυ-συστατικά δείγματα, όπως αυτά των βιολογικών υγρών. Τα δείγματα αυτά περιέχουν διάφορα συστατικά αρκετά από τα οποία παρεμποδίζουν την XΦ-

μορίου. Το προταθέν ενδιάμεσο είναι η διοξετανοδιόνη. Σε αντίθεση με τις ΧΦ-ενώσεις που αναφέρθηκαν πιο πάνω, το παραχθέν υψηλής ενέργειας ενδιάμεσο δεν φθορίζει και γιατί δεν μπορεί να εκπέμψει φως μόνο του. Η ΧΦ-εκπομπή επιτυγχάνεται με μεταφορά ενέργειας σε φθορίζων μόριο, που διεγείρεται στην S1 κατάσταση.

Εικ.8. Η πορεία της ΧΦ-αντίδρασης του περοξυ-οξαλικού εστέρα TPDO με υπεροξείδιο του υδρογόνου



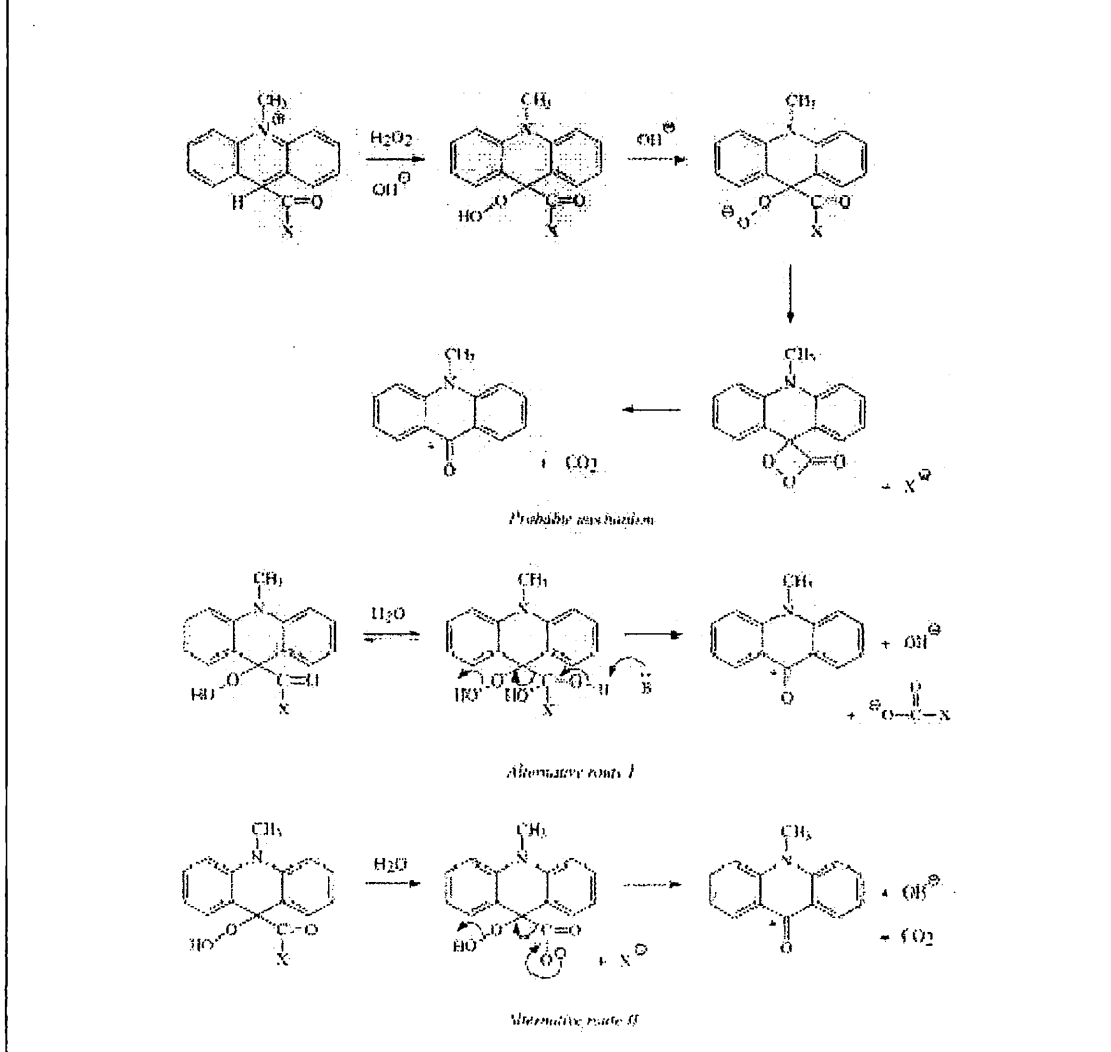
Από τον μηχανισμό της αντίδρασης φαίνεται ότι το οξαλικό αντιδραστήριο και ο φθορισμικός ευαισθητοποιητής μπορούν να επιλεγούν ανεξάρτητα. Αυτό προσφέρει ευελιξία καθότι κάθε παράγοντας που συμμετέχει στην ΧΦ-αντίδραση μπορεί να επιλεγεί για να μεγιστοποιήσει το Φ_ε (οξαλικό-παράγωγο) ή να αυξήσει το Φ_ε και Φ_τ (φθοριστής) ή να πληρεί τις απαιτήσεις της μεθόδου προσδιορισμού (υδατικό ή μη-υδατικό μέσο, σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος, pH, μήκος κύματος της ΧΦ-εκπομπής, σύνθεση συζυγούς). Η μεταφορά ενέργειας μπορεί να γίνει ακόμη και σε φθορισμοδεκτικά μόρια της εγγύς υπερόθρου περιοχής μήκους κύματος.

Με την ζεύξη των πιο αποδοτικών ενώσεων επιτυγχάνονται συνολικές αποδόσεις μέχρι και 34%. Δυστυχώς, τα αποτελέσματα αυτά επιτυγχάνονται σε μη-υδατικά διαλύματα ενώ η απόδοση πέφτει στα υδατικά ή τα υδατικά μίγματα διαλυτών στις τυπικές αποδόσεις των ακριδινεστέρων και της ενισχυμένης ΧΦ-λουμινολής.

Η αντίδραση μπορεί να εκτελεσθεί ακόμη και σε όξινα μέσα αλλά το βέλτιστο pH είναι κοντά στο 7. Τα οργανικά οξέα παρεμποδίζουν την αντίδραση σε αντίθεση με τις ασθενείς βάσεις και ιδίως το ιμιδαζόλιο, που έχει αναφερθεί να έχει καταλυτική επίδραση δια μέσου σχηματισμού του 1,1'-οξάλυλο-δι-ιμιδαζολίου. Έχει αναφερθεί

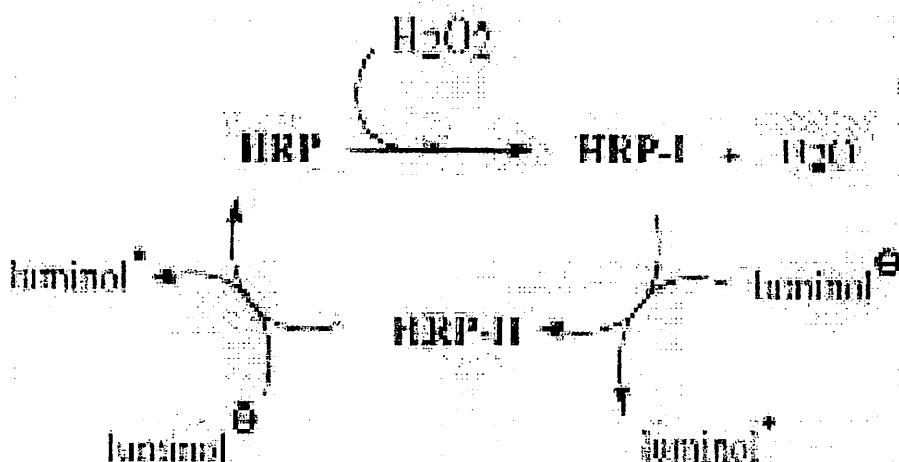
κοινή πρακτική να πυροδοτείται η ΧΦ-εκπομπή των ακριδινεστέρων με διαδοχική προσθήκη διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου σε όξινο μέσο και στην συνέχεια να αλκαλοποιείται ταχύτατα με την προσθήκη ισχυρής βάσης.

Εικ.7 Οι πιο πιθανοί μηχανισμοί της μετατροπής των ακριδινεστέρων για τις εναλλακτικές πορείες αντίδρασης



Η κβαντική απόδοση της αντίδρασης της λουσιγενίνης είναι χαμηλή και δεν χρησιμοποιούνται ΧΦ-ενισχυτές αν και η επινεφρίνη σε κατιονικά τασενεργά μικύλια με υπεριοδικά ιόντα έχει αναφερθεί ότι αυξάνει το ΧΦ-σήμα της λουσιγενίνης. Παρ' όλα αυτά, ανάλογα με το είδος της πρωτεΐνης που μαρκάρεται με λουσιγενίνη και τα χαρακτηριστικά του μητρικού υγρού, το ΧΦ-σήμα των ακριδινικών εστέρων αυξάνεται από τις τασενεργές ενώσεις όταν χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από την κρίσιμο μικυλλιακή συγκέντρωση. Η τασενεργός ένωση φερόμενη με το εμπορικό όνομα Τριτον Χ-100 (χλωριούχο άλας του δεκαέξυλ-τριμέθυλ-αμμωνίου) είναι η πιά αποδοτική στην ενίσχυση.

Εικ.6. Ο μηχανισμός της καταλυομένης από την καροτοπεροξειδάση ΧΦ-αντίδρασης: Το HRP αντιδρά με το υπεροξείδιο του υδρογόνου και σχηματίζει το προϊόν οξείδωσης HRP I που στην συνέχεια αντιδρά με το ανιόν της λουμινόλης για να σχηματίσει το ημιαναχθέν προϊόν HRP II και ένα προϊόν ρίζας της λουμινόλης. Το ένζυμο στην συνέχεια επιστρέφει στην ανηγμένη μορφή του HRP, κατά την αντίδραση με ένα δεύτερο μόριο λουμινόλης.



Η κβαντική απόδοση της λουμινόλης δεν υπερβαίνει το 5% στον διαλύτη του διμέθυλοσουλφοξειδίου και 1-1,5% στα υδατικά συστήματα ενώ η ισολουμινόλη είναι κατά πολύ λιγότερο αποδοτική ($\Phi_{\text{ΧΦ}}=0,1\%$). Εγιναν προσπάθειες για να βελτιώσουν την απόδοση με διάφορους τρόπους. Η πιο ελκυστική μέθοδος για να αυξηθεί η ευαισθησία είναι βέβαια η χρήση χημικών ενισχυτών που προτάθηκε για την ΧΦ-αντίδραση που καταλύεται από την καροτοπεροξειδάση ή την ξανθινοοξειδάση καθώς και από το Co(II) · ακόμη αναφέρθηκε πως οι πενικελίνες ενισχύουν την ΧΦ-αντίδραση του συστήματος λουμινόλης-υπεροξείδιο του υδρογόνου- Co(II) .

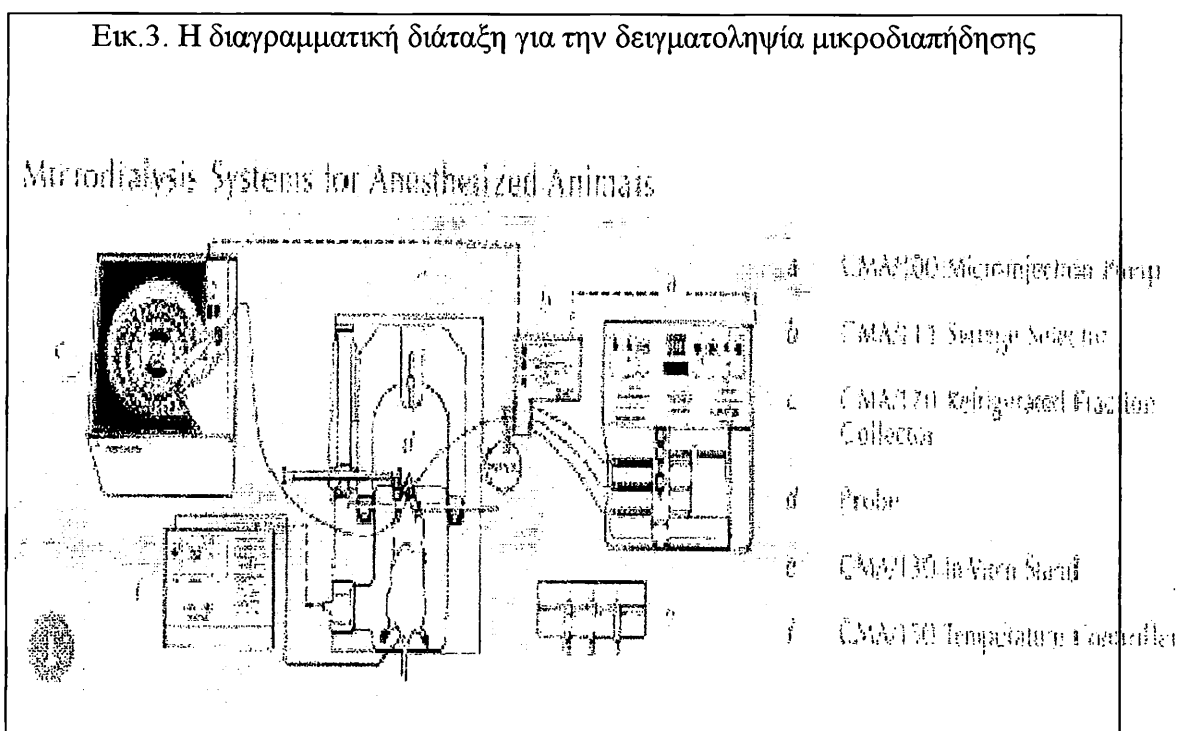
Από πολύ νωρίς είχε αποδειχθεί πως οι δομικές τροποποιήσεις του ετεροκυκλικού δακτυλίου οδηγούν σε πλήρη απώλεια των ΧΦ-ιδιοτήτων αμφοτέρων των ενώσεων. Αντίθετα, ανάλογες ενώσεις με υποκατάσταση στον μη-ετεροκυκλικό δακτύλιο είναι φωταυγάζουσες. Υποκαταστάτες με ιδιότητες ηλεκτρονιοδότης αποδίδουν περισσότερο στην θέση 5 ή 8 απ'ότι στη θέση 6 ή 7 ενώ η υποκατάσταση με μόρια

μπορούν να οξειδώσουν την λουμινόλη και τα παράγωγά της παρουσία μόνο καταλυτών. Πολλοί καταλύτες έχουν προταθεί π.χ. ένζυμα (μικροπεροξειδάση, μυελοπεροξειδάση, καρτοπεροξειδάση (Εικ.6), καταλάση, ξανθινοξειδάση) οι μεταλλοπρωτεΐνες (κυτόχρωμα c, αιμογλοβίνη, και κυρίως απτογλοβίνη, δευτεριοαμίνη), ανόργανοι καταλύτες (Fe(III), Co(II), Cu(II) κατιόντα καθώς και σύμπλοκα αυτών), καθώς και άλλα οξειδωτικά μόρια όπως το όζον, τα αλογόνα ή τα υπερθειικά ανιόντα. Πιο πρόσφατα, η βακτηριακή περοξειδάση από τον μύκητα *Arthromyces ramosus* χαρακτηρίστηκε από μεγάλη απόδοση στην αντίδραση με μια περίπου 100-φορές αύξηση στην ευαισθησία. Ακόμη πολλά ένζυμα ή μίγματα ενζύμων που παράγουν παράγωγα οξυγόνου σαν παραπροϊόντα έχουν χρησιμοποιηθεί στην ΧΦ-ανίχνευση. Η αλκαλική φωσφατάση, η γαλακτοσιδάση και η γλυκοσιδάση παρουσία συζυγών ινδοξυλίου για υπόστρωμα, η γαλακτική οξειδάση, η οξειδάση του ακυλο-συνένζυμοΑ ή η διάμινο οξειδάση παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου· η 3-υδρόξυστεροειδική αφυδρογονάση ή η γλυκοζο-6-φωσφορική αφυδρογενάση ελευθερώνουν NADH που ανάγει παρουσία του 1-μεθόξυ-5-μεθυλοφαινάζινο μεθυλοθειικού άλατος το μοριακό οξυγόνο προς υπεροξείδιο του υδρογόνου που παράγει φώς στο σύστημα λουμινόλης/μικροπεροξειδάσης.

στερέωση των σωλήνων εισόδου και εξόδου. Το διάλυμα διαπίδυσης που καλείται “perfusate” είναι υδατικό διάλυμα με ιονική σύσταση και pH που προσομοιάζει το υγρό του δείγματος και αντλείται αργά μέσα από το ανιχνευτικό στοιχείο.

Η μικροδιαπίδυση είναι διεργασία που ελέγχεται από την διάχυση και η δυνατότης μεταφοράς του υγρού διαπίδυσης στο ανιχνευτικό στοιχεί παρέχεται με την χρήση προγραμματιζόμενου βηματικού κινητήρα που κινεί τα έμβολα μικροσυρίγγων. Στο εργαστήριό μας το σύστημα δειγματοληψίας μικροδιαπίδυσης συνδέθηκε με τον ανιχνευτή χημειοφωταύγειας του NO και εφοδιάσθηκε με ειδική μεμβράνη που εμποδίζει την παραλαβή από το δείγμα ενώσεων που παρεμποδίζουν την ΧΦ-αντίδραση με στόχο την επίτευξη υψηλής ευαισθησίας και επαναληπτικότητας. Περισσότερες λεπτομέρειες φαίνονται στην Εικ.3.

Σύστημα Μικροδιαπίδυσης για αναισθητοποιημένα πειραματόζωα



Για την διαδικασία της δειγματοληψίας με την τεχνική της μικροδιαπίδυσης και ιδιαίτερα για την ανίχνευση του NO, είναι σημαντικό να απομακρυνθούν τα ίχνη αέρα, διαφορετικά το διαπιδυόμενο NO θα οξειδωθεί από το οξυγόνο. Περαιτέρω, η παρουσία του αέρα θα φέρει φυσαλίδες στο ανιχνευτικό στοιχείο, που είναι επικίνδυνο να διαχυθούν στο κυκλοφοριακό σύστημα του πειραματόζωου, ή να παράγουν διακοπές ή παραμορφώσεις στα ΧΦ-σήματα. Ο διακόπτης παροχής υγρού

Στην συνέχεια το δείγμα αναμιγνύεται με το φέρον ρυθμιστικό διάλυμα στον στοιχείο ανάμιξης και τελικά με το αντιδραστήριο που συνήθως είναι είτε το οξειδωτικό ή το ΧΦ-αντιδραστήριο μπροστά στο φωταπολλαπλασιαστή στην είσοδο της κυψελίδας. Η κυψελίδα είναι φτιαγμένη στο εργαστήριο, και έχει σχήμα κέλυφους σαλιγκαριού και δύναται να φτιαχτεί σε διαφορετικά μεγέθη ανάλογα με τις απαιτήσεις της δεδομένης εφαρμογής π.χ. εάν ο ανιχνευτής συνδεθεί με σύστημα μικροδιαπίδυσης, όπου ο όγκος του δείγματος είναι συχνά πολύ μικρός και η ταχύτης ροής πολύ αργή απαιτούμενος όγκος κυψελίδας πρέπει να είναι μικρός για να επιτύχουμε την βέλτιστη εκπομπή όταν το ΧΦ-δείγμα βρίσκεται συνολικά στην κυψελίδα την στιγμή της παρατήρησης.

Ο ανιχνευτής χημειοφωταύγειας είναι ένας φωτοπολλαπλασιαστής (Εικ.2) με μεγάλη ευαισθησία στην περιοχή μηκών κύματος που η ΧΦ-αντίδραση εκπέμπει. Τέλος το ΧΦ-σήμα καταγράφεται στο χαρτί του καταγραφέα ή ψηφιοποιείται και μεταφέρεται στην μνήμη του υπολογιστή

2.2 ΣΥΣΚΕΥΕΣ

2.2.1. Αναλυτική σύσκευή έγχυσης σε ροή με χημειοφωταυγή ανίχνευτή (FIA/ΧΦ-ανίχνευση)

Επειδή συχνά οι περιεκτικότητες του βιοιατρικού δείκτη στα δείγματα βιολογικών υγρών είναι πολύ χαμηλές, είναι σημαντικό να εφαρμόσουμε μεθοδο υψηλής ευαισθησίας για την παρακολούθηση και τον προσδιορισμό αυτών in vivo. Από την άλλη πλευρά τα αποτελέσματα των προσδιορισμών θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο επαναλήψιμα καθ'ότι στις πολύ ευαίσθητες μεθόδους μειώνεται η επαναληψιμότης αισθητά λόγω σφαλμάτων της μέτρησης του όγκου του δειγματος, του χρόνου ανάμιξης των αντιδραστηρίων κ.ο.κ. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η συσκευή έγχυσης σε ροή που είναι γνωστή για την επαναλήψιμη πορεία των διαφόρων σταδίων της ανάλυσης και την συνδυάστηκε με ανιχνευτή Χημειοφωταύγειας . Σ' αυτή την συσκευή, το δείγμα εισάγεται στη ροή δια μέσου εξάπορτης βαλβίδος με βρόγχο δεδομένου όγκου. Τα διαλύματα αντλούνται από τις φιάλες αποθήκευσης των αντιδραστηρίων με περισταλτική αντλία που ρυθμίζεται σε δεδομένη σταθερή ροή, και φέρονται προς ανάμιξη στην είσοδο της κυψελίδας που βρίσκεται μπροστά από τον ευαίσθητο φωτοπολλαπλασιαστή. Το μέγεθος του δείγματος ρυθμίζεται από το μέγεθος του βρόγχου της βαλβίδας έγχυσης. Η ανάμιξης των διαλυμάτων των ΧΦ-αντιδραστηρίων στην είσοδο της κυψελίδας είναι πλήρης λόγω της ταυτόσημης ταχύτητας και αντιμέτωπης ροής των. Με την διάταξη αυτή και τις συνθήκες λειτουργίας της, ελαχιστοποιούνται τα σφάλματα επαναληψιμότητας όγκου δείγματος, χρόνου ανάμιξης, χρόνου παρακολούθησης εκπομπής κ.λ.π.

Η εικόνα 1 δείχνει τα μέρη μιας τέτοιας συσκευής που συμπληρώθηκαν σύμφωνα με τις ανάγκες της αναλυτικής μεθοδολογίας για την κάθε εφαρμογή και για την πειραματική ερευνητική πορεία που απαιτούνταν.

Τα ανόργανα αναλυτικά αντιδραστήρια όπως τα χλωριούχο νάτριο, χλωριούχο κάλιο, χλωριούχο μαγνήσιο, χλωριούχο ασβέστιο, χλωριούχος τρισθενής σίδηρος, θειικός δισθενής σίδηρος, νιτρώδες κάλιο(Sigma), νιτρικό κάλιο, ιωδιούχο κάλιο(Sigma), χλωριούχο αμμωνιο, διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά και χρησιμοποιήθηκαν για την εξέταση της παρεμπόδισης που επιφέρουν στη ΧΦ-αντίδραση της λουμινόλης.

Τα οργανικά αντιδραστήρια ουρία(Sigma), ουρικό οξύ, κυστεΐνη(Sigma), β-D-γλυκόζη, ντοπαμίνη (Sigma), βοδινός ορός αλβουμίνης (Sigma), μερκαπτοαιθανόλη, και το ασκορβικό οξύ (AA) αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά, και χρησιμοποιήθηκαν για την εξέταση της παρεμπόδισης που επιφέρουν στη ΧΦ-αντίδραση της λουμινόλης με την δειγματοληπτική μέθοδο δείγματος μέσω εκλεκτικής μεμβράνης.

Τα οργανικά αντιδραστήρια:L-αργινίνη, L-κιτροουλίνη χρησιμοποιήθηκε στην παραγωγή δεδομένων για την χάραξη καμπυλών αναφοράς , στους ποσοτικούς προσδιορισμούς των, και αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma

Σουλφανιλικό οξύ, χρωμοτροπικό οξύ χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των νιτρωδών με την μέθοδο Griess και αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck.

Η ο-φθαλαλδεύδη χρησιμοποιήθηκε στην δημιουργία παραγώγων για φθορισμομετρική κινητική ανάλυση των L-αργινίνη, L-κιτροουλίνη και αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma

Τα επιφανειοτασενεργά υλικά (βιολογικά απορρυπαντικά) : δοδέκυλο θειικό άλας του νατρίου, SDS, και ο μονο λαυρικός εστέρας της πολυοξυαιθύλενο σορβιτόλης, Tween 20 αγοράστηκαν από την εταιρείας Pharmacia Biotech.

Το αναλυτικό αντιδραστήριο, διχρωμικό κάλιο (Merck) χρησιμοποιήθηκε για την ρύθμιση του φασματοφωτομέτρου.

2.1.5. Υλικά παρασκευής και προετοιμασίας μεμβρανών

Σωλήνες διαπίδυσης φασματικής καθαρότητας με ιδιότητες αποκλεισμού ενώσεων μοριακών βαρών (MWCO) 100,500 και 3500 αγοράστηκαν από την εταιρεία SERVA.

Φύλλα μη-ενισχυμένης βουλκανισμένης Mat/Mat σιλκόνης αγοράστηκαν από την εταιρεία Specialty Manufacturing Inc.

Καθαρή μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αγοράστηκε από την εταιρεία Millipore

Μεμβράνες οξεικής κυτταρίνης (CA) , με MWCO 100 παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μας

χρησιμοποιήθηκε, επίσης, σαν καταλύτης στην ΧΦ-αντίδραση οξείδωσης της λουμινόλης με υπεροξειδίο του υδρογόνου και το ένζυμο, CAT, σαν ιχνηλάτης του H_2O_2 , ενώ το ένζυμο Σουπεροξειδική Δισμουτάση, SOD, χρησιμοποιήθηκε σαν ιχνηλάτης του σουπεροξειδικής ρίζας, $O_2^{\cdot-}$

Το ένζυμο Ακέτυλο-χολινεστεράση, AchE, και το ένζυμο Χολινο-οξειδάση, ChOD, σε συνδυασμό, χρησιμοποιήθηκαν για την ενζυματική παραγωγή του H_2O_2 και προσδιορισμό της ακέτυλοχολίνης με ΧΦ-αντίδραση.

Τα αντιδραστήρια Καλμοδουλίνη, η 5,6,7,8- τετραύδροβιοπτερίνη, H4BP, το β-Νικοταμίδιο του φωσφορικού εστέρα του αδένινο νουκλειτιδίου στην ανηγμένη του μορφή, NADPH, και η διθειοθρεϊτόλη (Merck), DTT, χρησιμοποιήθηκαν σαν συμπράγοντες του ενζύμου NOS.

Το ζεύγος συζυγών αντιδραστηρίων βιοτίνης/αβιδίνης χρησιμοποιήθηκε στην ακινητοποίηση ενζύμων σε σύνθετες μεμβράνες. Ειδικότερα χρησιμοποιήθηκε το βιοτίνυλο-N-υδρόξυμίδιο του ηλεκτρικού οξέος, NHS-biotin, και η στρεπταβιδίνη, SA.

Το νουκλεοτίδιο Αδένινο-5'-τριφωσφορικό, ATP, και το πεπτίδιο Βραδικινίνη (SERVA), BK, χρησιμοποιήθηκαν για την ενεργοποίηση του έμβιου οργανισμού για την παραγωγή NO in vivo.

Για την παραγωγή ενώσεων με την ιδιότητα του NO-δότη παρασκευάστηκαν S-νιτροδοθειόλες με χρήση κυστεΐνης, SNC, καθώς και το φαρμακευτικό προϊόν της εταιρείας Pfizer, Viagra. Για τον ίδιο σκοπό χρησιμοποιήθηκαν και τα ανόργανα αντιδραστήρια $NaNO_2$, $Na_2[Fe(CN)_5(NO)] \cdot 2H_2O$ που αμφότερα αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck.

2.1.3. Ρυθμιστικά διαλύματα:

Τα κάτωθι ανόργανα οξέα, βάσεις και άλατα, εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck και χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων ως ακολούθως:

- Ρυθμιστικό φωσφορικών: KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaOH
- Ρυθμιστικό βορικών: $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$, NaOH
- Ρυθμιστικό οξεϊκών: CH_3COOH , CH_3COONa
- Ρυθμιστικό μεγάλης περιοχής pH (Universal, pH 2,6-12): βορικό οξύ, H_3BO_3 , δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4 , διαίθυλο βαρβιτουρικό οξύ, και κιτρικό οξύ.

203. Fehsel K. and Kolb-Bachofen V. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 426-34
204. Granger D.N. and Kubes P. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 434-42
205. Rossaint R., busch T. and Falke K. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 442-53
206. Vallance P. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 453-9
207. Inoue M., Minamiyama Y. and Takemura S. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 474-80

157. Wink D. A., Grisham M. B, Mitchell J.B, and Ford P.C. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 12-31
158. Bnner F. T. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 50-8
159. Malinski T., Mesaros S., Tombouliau P. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 58-69
160. Christodoulou D., Kudo S., Cook J. A. et al. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 69-83
161. Brien J.F., Mclaughlin B.E., Nakatsu K., Marks G.S. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 83-93
162. Nims R.W., Cook J.C, Krishna M.C. Christoduulou D. et al. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 93-105
163. Miles A.M., Wink D.A., Cook J.C., Grisham M.B. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 105-20
164. Wink D.A., Grisham M.B., Miles A.M., et al. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 120-30
165. Wishnok J.S., Glogowski J.A., Tannenbaum S. R. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 130-42
166. Granger D.L., Taintor R.R., Boockvar K.S., and Hibbs J.B. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 142-52
167. Yokoi I., Habu H., Kabuto H. and Mori A. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 152-9
168. Gross S.S. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 159-68
169. Kalyanaraman B. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 168-88
170. Osipov A. N., Gorbunov N. V., Day B.W. et al. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 193-203
171. Ichimori K., Arroyo C.M., Nakazawa H. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 203-11
172. Akaike T., Maeda H. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 211-22
173. Kotake Y. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 222-9
174. Kozlov A., Bini A., Iannone A., Zini I. Tomasi A. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 229-37
175. Grisham M.B., Johnson G.G., Lancaster J.R. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 237-47
176. Lewis R.S., Deen W.M. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 247-59
177. Kishnani N.S., Fung H. *Methods Enzymol.* 1996; 268: 259-66

114. Henke L., Piunno P.A.E. McClure A.C. Krull U.J. *Anal. Chim. Acta.* 1997; 344: 201-13
115. Meinkoth J., Wahl G. *Anal. Biochem.* 1984; 138: 267-84
116. Rasmussen S.R., Larsen M.R. and Rasmussen S.E. *Anal. Biochem.* 1991; 198: 138-42
117. Zhang R., Hirsch O, Mohsen M. and Samuni A. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994; 312/2: 385-91
118. Athena W.X., Ziegler D.M. *Anal. Biochem.* 1991; 198: 143-8
119. Bechman J.S., Beckman T.W., Chen J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 1620-4
120. Tsubaki M., Yu N.T. *Biochem.* 1982;21/6: 1140-4
121. Benko B., Yu N.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983; 80: 7042-6
122. Bredt D.S., Snyder S.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 9030-3
123. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. *Nature.* 1980; 288/27: 373-6
124. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S. Byrns R.E. and Chaudhuri G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987; 84: 9265-9
125. Palmer R.M.J., Ferrige A.G. and Moncada S. *Nature.* 1987; 327: 524-6
126. Lacasse P., Farr V.C., Davis S.R. and Prosser C.G. *J. Dairy Sci.* 1996; 79: 1369-74
127. Moncada S., Palmer R.M.J. and Gryglewski R.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986;83: 9164-8
128. Hecker M., Mitchell J.A., Harris H.J. et al. *Biophys. Res. Commun.* 1990; 167/3: 1037-43
129. Kelm M., Feelisch M., Spahr R., Piper H.M., Noack E. and Schrader J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 154/1:236-44
130. Kirilyuk I., Utebergenov D.I., Mazhukin D.G. et al. *J. Med. chem.* 1998; 41/7:1027-33
131. Sorba G., Medana C. Fruttero R. et al. *J. Med. Chem.* 1997; 40: 463-9
132. Saavedra J.E, Billiar T.R. and Williams D.L. et al. *J. Med. Chem.* 1997; 40: 1947-54
133. Aoki T., Wakabayashi M. *Anal. Chim. Acta.* 1995;308: 308-12
134. Feelish M. *J. Cardiovas. Pharmacol.* 1991; 17(Suppl.3): S25-S33
135. Gryglewski R.J., Palmer R.M.J and Moncada S. *Nature.* 1986; 320: 454-6
136. Palmer R.M.J., Ashton D.S and Moncada S. *Nature.* 1988; 333: 664-6

64. Thompson A., et al. *Methods Enzymol.* 1986;133: 569-84
65. Ullman E.F., Kirakossian H., Switchenko A.C. et al. *Clin. Chem.* 1996; 42/9: 1518-26
66. Litman D.J., Hanlon T.M. and Ullman E.F. *Anal. Biochem.* 1980; 106: 223-9
67. Ullman E.F., Kirakossian H., Singh S., Wu. Z.P. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 5426-30
68. Lorimier P., Lamarq L., Labat-Moleur F. et al. *J. Histochem. Cytochem.* 1993; 41/11:1591-7
69. Lorimier P., Lamarq L., Negoescu A. et al. *J. Histochem. Cytochem.* 1996; 44/7: 665-71
70. Wilcox J.N. *J. Histochem. Cytochem.* 1993; 41/12: 1725-33
71. Kricka L.J. and Thorpe G.H.G. *Methods Enzymol.* 1986;133: 404-20
72. Imai K. *Methods Enzymol.* 1986;133: 435-49
73. Obata H., Karatani H. and Nakayama E. *Anal. Chem.* 1993; 65: 1524-8
74. Zhang Y., Gong Z. Zhang H. and Cheng J. *Anal. Commun.* 1998;35:293-6
75. Evmiridis N.P. *Analyst.* 1988;113: 1051-6
76. Chomczynski P. and Sacchi N. *Anal. Biochem.* 1987;162: 156-9
77. Jounaidi Y., Hyrailles V., Gervot L. and Maurel P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996;221: 466-70
78. Thomas N., et al. *Anal. Biochem.* 1988; 170: 393-6
79. Spector T. *Anal. Biochem.* 1978; 86: 142-6
80. Svedas V.K., Galaev I.J., Borisov I.L. and Berezin I.V. *Anal. Biochem.* 1980; 101: 188-95
81. Sykulev Y.K., Sherman D.A., Cohen R.J. and Eisen H.N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89:4703-7
82. Bronstein I., Voyta J.C. and Edwards B. *Anal. Biochem.* 1989; 180: 95-8
83. Southern E.M. *Anal. Biochem.* 1979; 100: 319-23
84. Wallace D.M. *Methods Enzymol.* 1987; 152: 33-41
85. Wallace D. M. *Methods Enzymol.* 1987; 152: 41-8
86. Suzawa T., Ikariyama Y. and Aizawa M. *Anal. Chem.* 1994; 66: 3889-94
87. Gleria K.D., Hill H.A.O. and Mcneil C.J. and Green M.J. *Anal. Chem.* 1986; 58: 1203-5
88. Blackburn G.F., Shah H.P., Kenten J.H. et al. *Clin.Chem.* 1991;37/9: 1534-9

23. Witteveen S.A.G.J., Sobel B.E. and Deluca M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1974; 71/4: 1384-7
24. Delanghe J.R., Mol A.M., Buyzere M.L., Scheerder I.K. and Wieme R.J. Clin. Chem. 1990; 36/1: 149-53
25. Kapoor R. and Prasad K. Free Radical Biology & Medicine. 1996; 21/5: 609-18
26. Sun J.S., Hang Y., Huang L. and Lu F. Free radical Biology & Medicine. 1996; 20/1: 107-12
27. Annesley T., Strongwater S. L. and Schnitzer T. J. Clin. Chem. 1985; 31/3: 402-6
28. Miguel A. G., Jose M. L., Nicasio P.C. et al. Am. Heart J. 1998; 135: 476-81
29. Keshgegian A. A., Feinberg N. V. and Keshgegian A.A. Clin. Chem. 1984; 30/4: 575-8
30. Puleo P.R., Guadagno P.A., Roberts R. and Perryman M. B. Clin. Chem. 1989; 35/7: 1452-5
31. Winter R.J., Koster R. W., Straalen J. P. et al. Clin. Chem. 1997; 43/2: 338-43
32. Gerhardt W., Katus H. A., Ravkilde J. and Hamm C. W. Clin. Chem. 1992; 38/6: 1194-5
33. Katritsis D., Hossein-Nia M. and Anastasakis A. et al. Eur. Heart J. 1997; 18: 1007-13
34. Katus H.A., Remppis A. and Neumann F.J. et al. Circulation 1991; 83/3: 902-12
35. Katus H.A., Looser S. and Hallermayer K. et al. Clin. Chem. 1992; 38/3: 386-93
36. Seitz W.R. Methods Enzymol. 1978; 57: 445-62
37. Haapakka K.E, Kankare J. Anal. Chim. Acta. 1982; 138: 263-75
38. Wilson R., Schiffrin D.J. Anal. Chem. 1996; 68: 1254-7
39. Patel A., Davies C.J., Campbell A.K. and Mccapra F. Anal. Biochem. 1983; 129: 162-9
40. Ci Y., Tie J. and Yao F. et al. Anal. Chim. Acta. 1993; 277: 67-72
41. Mair J., Artner-Dworzak E. and Dienstl A. et al. Am. J. Cardiol. 1991; 68/17: 1545-50
42. Shapiro R., Chan J., Pierson A., Vaccaro K. and Quick J. Clin. Chem. 1984; 30/6: 889-93

ανάλογου ^λλογισμικού προγράμματος, ενώ είναι άνετη στην χρήση της σε νοσοκομεία καθώς και σε ιατρικά κέντρα υγείας για την παρακολούθηση ιατρικών δεικτών κατά την διάρκεια θεραπευτικών αγωγών ή χειρουργικών επεμβάσεων. Στην εργασία αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση του NO in vivo που είναι ένα μοριο που ρυθμίζει πολλές λειτουργίες του οργανισμού σαν αγγελιοφόρος και νευροδιαβιβαστής .

Η συνολική μελέτη για την επίτευξη της εν δυνάμει παρακολούθηση του NO in vivo ακολούθησε τα ακόλουθα στάδια:

- Το NO που παρασκευάστηκε από την ενζυματική δράση της NO-συνθάσης εν σειρά στην συσκευή FIA/XΦ-ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση των συνθηκών παραγωγής XΦ-εκπομπής λουμινόλης κατά την οξείδωσή της από το H₂O₂. ✓
- Χρήση πορφυρινικών ενώσεων για την παγίδευση του NO που παράγεται από ανόργανα αντιδραστήρια και ακόλουθη ανίχνευση ~~από~~ της XΦ-εκπομπής με απελευθέρωση του NO με τά από καταστροφή του συμπλόκου πορφυρινικής ένωσης-NO και εύρεση συνθηκών μείωσης της υπόβαθρης XΦ-εκπομπής από την παρουσία της πορφυρινικής ένωσης.
- Κατασκευή δειγματοληπτικής μεμβράνης για την απομάκρυνση των παρεμποδίζοντων από βιολογικά υγρά
- Εφαρμογή της μεθόδου για την εν δυνάμει παρακολούθηση του NO in vivo σε πειραματόζωα.

Τροποποίηση της μεμβράνης με ένζυμα για τον ευαίσθητο προσδιορισμό της ακετυλοχολίνης ~~από~~ δείγματα βιολογικών υγρών.

ΣΞ

(α) Το NO μπορεί να αναχθεί ηλεκτροκαταλυτικά σε ηλεκτρόδια τροποποιημένα με ηλεκτροπολυμερισμένα υμένια $[Cr(v\text{-trpy})_2]^{3+}$. Με περαιτέρω τροποποίηση με λεπτό υμένιο από Nafion (για αποφυγή παρεμποδίσεων ανιόντων, ιδιαίτερα των νιτρωδών) αυτά τα ηλεκτρόδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν NO-αισθητήρες σε διάλυμα και εμφανίζουν υπομM όρια ανιχνευσιμότητας και γρήγορη απόκριση. Οι προκαταρκτικές μελέτες της έκλυσης κυτταρικού NO από βακτηριο-κύτταρα Rhodοβακτήριο-σφαιρίδες έδωσαν πολύ καλά αποτελέσματα [154].

(β) Ένας νέος αισθητήρας οπτικής ίνας για το NO κατασκευάστηκε με τοποθέτηση μικρής ποσότητας διαλύματος αντιδραστηρίου στον εσωτερικό χώρο στην μύτη μιας δέσμης οπτικών ινών κλεισμένης με μεμβράνη διαπερατής σε αέριο. Το NO διαχέεται δια της μεμβράνης στο εσωτερικό χώρο που περιέχει το διάλυμα του αντιδραστηρίου και λαμβάνει χώρα αντίδραση μεταξύ NO, λουμινόλης και H_2O_2 . Το παραγόμενο φως σχετίζεται με την συγκέντρωση του NO στο δείγμα [155].

(γ) Ένας ευαίσθητος φασματοσκοπικός προσδιορισμός ανεπτύχθη για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό του NO και του O_2 σε υδατικό διάλυμα που βασίζεται στην επαγωγική μέσω NO οξείδωση της οξυαιμογλοβίνης (OxyHb) σε μετααιμογλοβίνη και με την μεσολάβηση O_2^- αναγωγή του σιδηρικού χρώματος c. Με την χρήση φωτόμετρου συστοιχίας διόδων, οι φασματικές μεταβολές εκάστης αντίδρασης αναλύθηκαν και τα κατάλληλα μ.κ. ταυτοποιήθηκαν για ταυτόχρονη παρακολούθηση των μεταβολών απορρόφησης εκάστης αντίδρασης [156].

συνεχώς με ESR. Τα νιτρονυλο-νιτροξειδία μπορούν, λοιπόν, να χρησιμοποιηθούν για να ανταγωνισθούν τον NO σχηματισμό σε βιολογικά συστήματα. Οι χηλικοτροπικές παγίδες αντιδρούν με NO και NO₂ και σχηματίζουν σταθερά νιτροξειδία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν προς ανίχνευση του NO στα υδρόφιλα και υδρόφοβα μέρη των κυττάρων. Το μονοξείδιο του αζώτου προκαλεί φυσική διεύρυνση των σταθερών λιποδιαλυτών νιτροξειδίων και το ESR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υπολογισθούν οι σταθερές διάχυσης του NO σε βιολογικές μεμβράνες. Η τεχνική ESR μπορεί να δώσει ποσοτικές μετρήσεις της παραγωγής NO [169].

(β) Η σιδηριαμογλοβίνη (ferrylHb) και η σιδηριμυογλοβίνη (ferrylMb) που είναι οι καταστάσεις υψηλής οξειδωσης των αιμοπρωτεϊνών και ανάλογων (ενώσεων) περοξειδασών σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδραση μεθαιμοπρωτεϊνών με υδρογονοπεροξειδία και είναι γνωστό πως προάγουν αντιδράσεις περοξειδωσης. Το NO παρεμποδίζει τις οξειδώσεις με αναγωγή των σιδηριαμοπρωτεϊνών. Οι αλληλεπιδράσεις του NO με σιδηριαμοπρωτεϊνες ανιχνεύονται με την χρήση ESR [170].

(γ) 3,5-διβρωμο-4-νιτρωδοβενζολοσουλφονικό οξύ (DBNBS) μπορεί να παγιδεύσει ρίζες προερχόμενες από αντιδράσεις που δίνουν μονοξείδιο του αζώτου (NO). Η μέθοδος προσδιορισμού του σχηματισμού ριζών εξαρτώμενων από το NO με DBNBS στο σύστημα ανθρώπινων πεταλίων (platelets) και η παράθεση βασικών αντιδράσεων μεταξύ DBNBS και διαφόρων NO-συγγενών ενώσεων για την ταυτοποίηση των DBNBS σπιν προϊόντων προσθήκης adducts πρόσθετων περιγράφονται με την χρήση ESR [171].

(δ) Σταθερές οργανικές ρίζες νιτρωδονιτροξειδιο-παραγώγων, ονομαστικά, το 2-φαινυλο-4,4,5,5-τετραμεθυλο ιμιδαζολίνη-1-οξυλ-3-οξείδιο (PTIO) και παράγωγα της (PTIOs) κατέχουν μια εξειδικευμένη δράση σύλληψης ελευθέρου NO σε εργαστηριακή κλίμακα και σε έμβια συστήματα. Η αντίδραση των PTIOs με το NO δίνει μια καθαρή μεταβολή στα ESR-σήματα και ως εκ τούτου το NO προσδιορίζεται μετρώντας την μεταβολή του ESR-σήματος [172]. Επιπρόσθετα πολλά διακριτά διθειοκαρβαμιδικά ιόντα όπως το N-μεθυλο-D-γλυκυλαμινο-διθειοκαρβαμιδικό (MGD), το N,N-διαιθυλο διθειοκαρβαμιδικό (DETC) χρησιμοποιήθηκαν σαν υποκαταστάτες για την παγίδευση του σπιν του σιδηροσμπλόκου. Αυτές οι αλλαγές στο ESR-σήμα μπορούν να ανιχνευθούν με χρήση ESR-οργάνου.

υπεριώδους-ορατού [162]. Επί προσθέτως, μια ποικιλία, διαφορετικών φασματοφωτομετρικών μεθόδων αναπτύχθηκε για την άμεση μέτρηση του NO όπως στην αντίδραση του NO με την αιμογλοβίνη προς παραγωγή μεθαιμογλοβίνης ή έμμεσα μέσω της αντίδρασης Griess. Σαν αποτέλεσμα των προσπαθειών για αύξηση της ευαισθησίας μέτρησης του NO που παράγεται υπό φυσιολογικές συνθήκες ή NO_2^- υπό όξινες συνθήκες ανεπτύχθησαν πολλές διαφορετικές φθορισμομετρικές μέθοδοι που κάνουν χρήση της ικανότητας του NO να παράγει N-νιτροδοποιούντες παράγοντες. Ένας αριθμός τέτοιων μεθόδων κάνει χρήση της αρωματικής διαμινοένωσης, 2,3-διαμινοναφθαλινίου (DAN) σαν δείκτη της ανίχνευσης του NO. Το σχετικό μη-φθορίζον DAN αντιδρά γρήγορα με το NO που προέρχεται από τον παράγοντα νιτροποίησης και δίνει το έντονα φθορίζον προϊόν 2,3-ναφθοτριαζόλιο (NAT) [163].

Έμμεσος Προσδιορισμός του NO με την μέτρηση σχετικών υποστρωμάτων

(α) Προσδιορισμός εκλεκτικότητας των δραστικών σωματιδίων μονοξειδίου του αζώτου για διάφορα υποστρώματα: Μια μέθοδος προσδιορισμού της αποτελεσματικότητας των διαφόρων ενώσεων στην παγίδευση των ενδιάμεσων της αντίδρασης NO/O₂ περιγράφηκε [164].

(β) Ποσοτικοποίηση των νιτρικών, νιτρωδών και παραγόντων νιτρώδωσης.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των νιτρικών και νιτρωδών βασίζεται στην αντίδραση Griess όπου ένα χρωμοφόρο με ισχυρή απορρόφηση στα 540nm σχηματίζεται με αντίδραση των νιτρωδών με μίγμα ναφθαιθυλενοδιαμίνης και σουλφανιλαμίδιο. Νιτρωδόσεις προκύπτουν είτε από το N₂O₃ είτε από N₂O₄ αν και κυριαρχεί το N₂O₃ στα φυσιολογικά συστήματα. Αμφότερα N₂O₃ και N₂O₄ αντιδρούν γρήγορα με το νερό, αμίνες, και άλλα πυρηνόφιλα που βρίσκονται στο σύστημα, και οι σταθεροί ρυθμού μετατροπής συγκεντρώσεις των ενδιάμεσων αυτών είναι χαμηλές. Η απόδοση της καθαρής νιτρώδωσης, όμως, μπορεί να εκτιμηθεί εύκολα με προσδιορισμό των προϊόντων της νιτρώδωσης. Η μορφολίνη συχνά χρησιμοποιείται σαν νιτροσταθερή αμίνη καθότι το pK_a επιβεβαιώνει το σημαντικό ποσοστό της ελεύθερης αμίνης σε φυσιολογικά pH. Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με GC-TEA (αέρια χρωματογραφικά –αναλυτή θερμικής ενέργειας ή με GC-MS (αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας) [165].

NADPH και καλμοδουλίνη με τη διαφορά ότι απαιτείται Ca^{2+} . δείχνει επίσης, μεγαλύτερη σταθερότητα στην χρήση του καθώς και την αποθήκευσή της από το ελεύθερο NOS. Η δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου δεν δείχνει εμφανή μείωση σε έξι μήνες. Αντίθετα το ελεύθερο NOS που αποθηκεύεται υπό τις συνθήκες χάνει το 60% της δραστηριότητας του μετά από τρεις μήνες.

1.4.3. Προδιορισμός του Μονοξειδίου του Αζώτου

Γρήγορες και ακριβείς μετρήσεις του NO σε πολύπλοκα βιολογικά μέσα απαιτούνται για να ξεμπλέξουν την δράση της σημαντικής αυτής ένωσης. Προς το παρόν, οι ακόλουθοι τρεις μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για να ανιχνεύσουν το NO. Η πρώτη βασίζεται στη χημειοφωταυγή αντίδραση του NO με το όζον ή το σύστημα Λουμινόλης- H_2O_2 . Η δεύτερη εξαρτάται από την μετατροπή της οξυαιμογλοβίνης σε μεθαιμογλοβίνη κατά την αντίδρασή της με NO, και μέτρηση της απορρόφησης με ESR ή με φασματοσκοπικό προσδιορισμό. Η τρίτη μέθοδος είναι ένα είδος αισθητήρα (οπτική ίνα ή αμπερόμετρο) που εξαρτάται στην πιο πάνω αντίδραση. Επιπροσθέτως, προτάθηκαν βιοχημικές και ηλεκτροχημικές μέθοδοι που ανιχνεύουν, τα υποστρώματα του NO στην πορεία μεταβολισμού, καθώς και έμμεσες μέθοδοι, όπως προσδιορισμοί του NOS, cGMP, και των σχετικών υποστρωμάτων όπως το νιτρώδες ανιόν (NO_2^-), το περοξυνιτρώδες ($ONOO^-$). Όλες αυτές οι μέθοδοι δεν μπορούν να ανιχνεύσουν το NO απ' ευθείας σε εμβίους οργανισμούς. Η ευαισθησία των μεθόδων αυτών δεν είναι καλή και επηρεάζεται από πολλούς παρεμποδίζοντες παράγοντες. Η δυναμική μέθοδος ανίχνευσης του NO στον εν ζώη οργανισμό μπορεί να παρέχει αποδεικτικά στοιχεία για την βιολογική δράση του NO. Το NO στην αέρια φάση είναι σταθερό όχι όμως στην υγρή φάση. Η ημιπερίοδος ζωής του είναι μικρότερη των 3-5 δευτερολέπτων γι' αυτό είναι δύσκολη η ανίχνευσή του. Τέλος, μέχρι τώρα δεν βρέθηκε μια καλή μέθοδος για τον προσδιορισμό του NO σε ζώντες οργανισμούς απ' ευθείας λόγω των πολλών παρεμποδιστών στα βιολογικά υγρά και της σύντομης ημιζωής του. Περισσότερες λεπτομέρειες δίνονται πιο κάτω επιλεκτικά για ορισμένες μεθόδους [147-156, 159-176].

Ηλεκτροχημική Μέθοδος ανίχνευσης του NO. Οι ηλεκτροχημικοί μέθοδοι που διατίθενται για την ανίχνευση του NO βασίζονται στην ηλεκτροχημική οξείδωση του NO σε στερεά ηλεκτρόδια. Εάν το ρεύμα που δημιουργείται κατά την οξείδωση του

Ένας έντονα εκλεκτικός παρεμποδιστής ανθρωπίνου iNOS συντετέθη, που είναι παράγωγο της ακεταμιδινό - λυσίνης, δηλ. το N-(5(s)-αμινο-6,7-διυδροξυεπτυλο)-αιθαναμίδιον διυδροχλωρικό άλας [142]. Η N^W-προπυλ-L-αργινίνη θεωρήθηκε, επίσης, σαν πιθανός και εκλεκτικός παρεμποδιστής της nNOS [143].

Μια σειρά αναλόγων της 2-ιμινοπιπεριδίνης παρασκευάστηκαν και απεδείχθησαν εν δυνάμει παρεμποδιστές των ισόμορφων ανθρωπίνου NOS. Μεθυλικές υποκαταστάσεις στην 4-θέση ή 4-και 6-θέση δίνουν τα πιο αποτελεσματικά ανάλογα [144].

Μια σειρά από N^W-νιτροαργινίνης (Arg^{NO_2}) και φαινυλαλανίνη περιέχονται διπεπτιδικοί εστέρες σεντετέθησαν σαν εκλεκτικοί παρεμποδιστές της nNOS. Όλοι οι διπεπτιδικοί εστέρες είναι ανταγωνίσιμοι παρεμποδιστές του nNOS, της iNOS μακροφάγου, και eNOS εκτός αυτών που περιέχουν D- Arg^{NO_2} που είναι μη ανταγωνίσιμοι παρεμποδιστές του nNOS και eNOS [146].

Τα αμινοξέα που παρεμποδίζουν τη δράση της NOS και αναφέρονται εδώ χαρακτηρίζονται από την ιδιότητα να προσκολλώνται στην σε ενεργή θέση πρόσδεσης L-αργινίνης. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση του μηχανισμού της δράσης της NOS καθώς και σαν ιχνηθέτες για το πρόστιμο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της θέσης της L-αργινίνης και των θέσεων πρόσδεσης της αίμης και της τετραϋδροβιοπτερίνης, που είναι συνπαράγοντες (cofactors) της περιοχής NOS-οξυγονάσης. Τα αμινοξέα παρεμπόδισης της NOS χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα in vivo για να ελέγχουν τον σχηματισμό του φυσιολογικού αλλά και του παθολογικού NO. Διάφορα αμινοξέα παρεμπόδισης χρησιμοποιήθηκαν, όπως η N^W-μεθυλο-L-αργινίνη (L-N_{MA}), η N^W-νιτρο-L-αργινίνη, η N^δ-(ιμινοαιθυλ)-L-αργινίνη, η N^δ-(ιμινοαιθυλ)-L-αργινίνη, η N^W-αμινο-L-αργινίνη, η L-θειοκιτροουλίνη, και η S-μεθυλ-L-κιτροουλίνη [185].

Το 7-νιτροινδαζόλιο εμφανίζει νέα βιοχημική και φαρμακολογική χρήση σαν παρεμποδιστής της NOS. Αν και το 7-νιτροινδαζόλιο είναι ένας ισόμορφος μη-εκλεκτικός παρεμποδιστής σε εργαστηριακά πειράματα, η χορήγηση του 7-νιτροινδαζολίου σε παρθέτους οργανισμούς ζώων οδηγεί σε ποικιλία βιολογικών φαινομένων που οφείλονται σε παρεμπίδιση του NOS στο κεντρικό νευρικό σύστημα χωρίς την εμφάνιση αναμενομένων φαινομένων λόγω παρεμπόδισης του eNOS [186].

Η αμινογονανιδίνη (H₂NNH-C(-ONH)-NH₂) χρησιμοποιήθηκε για την εκλεκτική παρεμπόδιση του iNOS. Η αμινογονανιδίνη είναι μια πυρηνόφιλος

εγκατεστημένη πλησίον του κέντρου της πολυπεπτιδικής της αλυσίδας. Όπως αναφέρθηκε η πρόσδεση της CaM στο NOS ενεργοποιεί την σύνθεση του NO [182].

Συντροφίν – ομόλογος περιοχή. Ευθυγράμμιση των τριών προϊόντων των NOS γονιδίων αποκαλύπτει ότι η NOS από ποντίκια και ανθρώπους περιέχει N – τερματική αρχική αλληλουχία 290 αμινοξέων που είναι απύσα στο iNOS και eNOS. Αυτό αντικατοπτρίζεται σ' ένα αρχικό τμήμα τριών αζόνων που είναι παρόν στα ανθρώπινα nNOS γονίδια αλλά που λείπει από τα ανθρώπινα iNOS και eNOS γονίδια.

Αίμη –θέση προσάρτησης υποκαταστατών. Στοιχειομετρικές ποσότητες του συνπαράγοντα αίμης είναι παρούσες στο nNOS και απαιτούνται για πλήρη καταλυτική δραστηριότητα. Επιπλέον, η δραστηριότητα NOS διακόπτεται με προσάρτησης υποκαταστατών στην αίμη όπως το CO παρουσία NADPH, ιμιδαζόλια και ορισμένα ανάλογα της αργινίνης που επιπρόσθετα είναι υποκατάστατες της αίμης.

Περιοχές πρόσδεσης αργινίνης και τετραϋδροβιοπτερίνης. Έχει υποτεθεί ότι η αργινίνη και η τετραϋδροβιοπτερίνη (BH₄) η καθεμιά προσδένεται σε θέσεις της περιοχής της οξυγενάσης των NOSs που αυτό αρχικά είχε διευκρινισθεί με μελέτες απομόνωσης περιοχών. Μελέτες διευκρινήσεις πρόσδεσης με ραδιο υποκαταστάτη, ³H – σημασμένη N^W – νιτρο – L – αργινίνη (NNA) που είναι εκλεκτικός παρεμποδιστής έγιναν για να ιχνηλατήσουν τη θέση της προσάρτησης της αργινίνης στο nNOS – ποντικού για απόδειξη.

Θέση πρόσδεσης Καλμοδουλίνης: Η διαπίστωση πως η nNOS απαιτεί καλμοδουλίνη (CaM) για να ενεργοποιηθεί, έκανε εφικτό τον καθαρισμό της NOS ισομορφής. Η πρόσδεση της CaM επιτρέπει την ροή των ηλεκτρονίων μεταξύ των περιοχών αναγωγής και οξυγενάσης των NOSs που είναι ο κυρίαρχος τρόπος της ρύθμισης της δράσης στα eNOS και nNOS.

Περιοχή πρόσδεσης FMN: Με βάση την αρχή της αναλογίας με τις προγονικές φλαβοπρωτεΐνες όπως φλαβοτοξίνες που περιέχουν μόνο FMN, η FMN περιοχή του NOS δύναται να θεωρηθεί ότι εκτείνεται από την θέση πρόσδεσης της CaM πριν το C-τέρμα και περιλαμβάνει περίπου 200 αμινοξέα.

από την αντίδραση του NO με το NO₂ και τα νιτρώδη που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το νερό μπορεί να προκαλέσουν παράλληλες αντιδράσεις που μερικές να είναι καθοριστικές.

Παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από φαρμακεντικές NO δότες ενώσεις [177].

Ο μηχανισμός της ελευθέρωσης NO από NO-δότες ενώσεις μπορεί να είναι είτε χημική είτε ενζυματική. Τα πυρηνόφιλα-NO προϊόντα προσθήκης ελευθερώνουν πρωταρχικά NO μέσω χημικής αντίδρασης, ενώ τα οργανικά νιτρικά βασίζονται κατά κύριο λόγο στην ενζυματική διάσπαση προς σχηματισμό NO. Άλλοι NO-δότες ενώσεις όπως, οργανικά νιτρώδη, S-νιτροζοθειόλες, νιτροπρωσικό νάτριο, και σιδονομίνες χρησιμοποιούν είτε χημικούς είτε ενζυματικούς μηχανισμούς για να παράγουν NO in vivo.

Φωτοlabile δότες NO [178]. Τα νιτροζυλο χλωρίδια του Ru σαν αντιδραστήρια εγκλωβισμένου NO. Τα παράγωγα του νιτροζυλορουθηνίου απεδείχθησαν ότι είναι θερμικά σταθερά αλλά φωτοlabile κινητά, και ελευθερώνουν NO κατά την έκθεσή του στο εγγύς-υπεριώδες φως, που είναι η χαρακτηριστική ιδιότητα των εγκλωβισμένων ενώσεων.

NONOικά σαν NO-δότες [179]. NONOικά ή 1-υποκατεστημένα διαζενο-1-ιόν 1,2-διοδικά είναι ενώσεις που περιέχουν την δραστική ομάδα [N (O) NO] ⁻ που έχει αποδειχθεί χρήσιμη για την σίγουρη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) εργαστηριακά και βιολογικά.

S - Νιτροδοθειόλες και ο ρόλος των μεταλλοϊόντων στην αποσύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου [180]. Οι S-νιτροδοθειόλες (RSNO), ονομαζόμενες μερικές φορές και θειονιτρώδεις ενώσεις είναι τα θειούχα ανάλογα των αλκυλονιτρωδών RONO. Οι νιτροδοθειόλες ήλθαν στο προσκήνιο λόγω της σημασίας του μονοξειδίου του αζώτου επειδή πιστεύεται ότι διασπώνται χωρίς την παρουσία ενζύμου και δίνουν μονοξείδιο του αζώτου που κατ' αρχήν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά σαν NO-παράγοντα φάρμακα.

Έγιναν πολλές μελέτες όπου NO-αγγειοσταλτικές (vasodilator) ενώσεις εφαρμόστηκαν σαν NO-δότες. Οι διαφορετικές πορείες αντίδρασης και βιοχημικοί μηχανισμοί που τελικά οδηγούν στην έκλυση του NO από οργανικές νίτρο και

βρίσκονται σε όλους τους ιστούς και δίνουν NO συγκεντρώσεις μέχρι 1 μM μόνο υπό μη παθολογικές συνθήκες.

Το μονοξείδιο του αζώτου μπορεί να μεταβολισθεί στο διπυρηνικό κέντρο της C_cO για να σχηματίσει ενώσεις (π.χ. περοξυνιτρίδια) που μπορούν να παρεμποδίσουν την μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια και μπορούν να νιτρωδώσουν σουλφυδρυλικές ομάδες [192]. Το μονοξείδιο του αζώτου εκτός των άλλων ενεργοποιεί την γουανυλική κυκλάση, σχηματίζει περοξυνιτρίλια, προκαλεί απόπτωση, και ρυθμίζει την κυκλο-οξυγενάση (COX) (193). Η αντίδραση του NO με τα [Fe-S] κέντρα της m-ακονιτάσης και o-ακονιτάσης έχει σημαντικές δραστικές συνέπειες. Παρεμπόδιση της m-ακονιτάσης διακόπτει την πορεία αντίδρασης των κιτρικών του κύκλου Krebs. Η παρεμπόδιση της c-ακονιτάσης οδηγεί στον μείωση της καταλυτικής δραστηριότητας της κυτοσολικής κιτράσης καθώς και στην τροποποίηση της μετάφρασης του mRNA σε πρωτεΐνες κλειδιά που εμπλέκονται σε ενδοκυτταρική σίδηρο – homeostasis αιμόσταση [194].

NO και NO-δότες μπορούν να παράγουν πιθανή χαλάρωση απομονωθέντων κονικών canine στεφανιαίων (canine coronary) αρτηριών όπως και άλλων αιμοφόρων αγγείων. Τα φαινόμενα αγγειοχαλάρωσης μπορούν να ενισχυθούν με χαμηλή τάση οξυγόνου και με σουπεροξειδική δισμουτάση ενώ μπορούν να παρεμποδισθούν με αιμογλοβίνη [198]. Φυσιολογικοί ρόλοι του NO στο κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS) νοούνται, μόνο από διακριτές και σταθερές κατανομές του NOS σε υποπληθυσμούς του κεντρικού νευρώνα όλων των μυελών των θηλαστικών που έχουν μέχρι τώρα εξετασθεί. Το NO μεσολαβεί στην υποβάθμιση του νευρικού συστήματος σε μερικές παθολογικές καταστάσεις. Το NO φαίνεται να αντιτίθεται στην δύναμη σύσφιξης στους μύες των ενηλίκων [199].

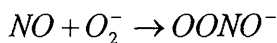
Το NO είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί την διαλυτή γουανυλική κυκλάση. Ο μεταλλάκτης NO-γουανυλική κυκλάση -c GMP εκπροσωπεί ένα αξιόλογο παράδειγμα του πόσο μια πολλαπλότητας κυτταρικών αποκρίσεων σε μια πολλαπλή σειρά βιολογικών διαβιβαστών μπορεί να περάσει μέσω μοναδικού συστήματος σηματοδότησης. Το NO μπορεί να τροποποιήσει την ενεργοποίηση της κυκλικής πρωτεϊνοκινάσης (PKG) που εξαρτάται από την GMP [200, 201].

Το μονοξείδιο του αζώτου εμπλέκεται στον μηχανισμό της εγκεφαλικής ισχαιμικής ζημιάς [202]. Το μονοξείδιο του αζώτου σαν αντιφλεγμονώδης παράγων μπορεί να παρεμποδίσει την συγκόλληση του λευκοκυτταρικού ενδοθηλίου, να ρυθμίσει την λειτουργία των αιμοπεταλίων [197], και να προκαλέσει αλλαγές στην

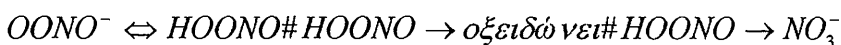
Το NO αντιδρά με NO₂ και σχηματίζει N₂O₃: $NO + NO_2 \rightarrow N_2O_3$

Το NO αντιδρά με αλκύλιο, αλκοξυ και αλκυλοπεροξειδικές ρίζες, $ROO + NO \rightarrow ROONO$.

Η αντίδραση μεταξύ NO και σουπεροξειδίου με σχηματισμό περοξυνιτρίλιου έτυχε ιδιαίτερης προσοχής στην βιβλιογραφία και σαν αντίδραση δηλητηρίασης και σαν μηχανισμός αποτοξίνωσης για τα δραστικά σωματίδια οξυγόνου (ROS).



Πράγματι, η αντίδραση του O₂ με το NO είναι πέντε φορές γρηγορότερη της διάσπασης του υπεροξειδίου από την σουπεροξειδοδισμουτάση. Το περοξυνιτρίλιο ROONO είναι σχετικά αδρανές σε διαλύματα βάσεων και αργά μετατρέπεται (dismutates) σε νιτρουλενωση και οξυγόνο. Αντιδρά με σουλφύδρυλο ενώσεις και σχηματίζει δισουλφίδια με κινητική σταθερά 10³ M⁻¹ sec⁻¹. Με πρωτονίωση του περοξυνιτρίλιου παίρνουμε το ουδέτερο οξύ HOONO που οξειδώνει τα διάφορα βιολογικά υποστρώματα ανταγωνιζόμενη τον ισομερισμό προς νιτρικά.



Παρ' όλη την ευκολία να αντιδρά με ρίζες, το NO δεν αντιδρά με όλες τις ρίζες.

Εμμεσες δράσεις του NO: Αν και το μονοξειδίο του αζώτου δεν αντιδρά άμεσα με τα περισσότερα βιολογικά μόρια, τα δραστικά σωματίδια του NO (RNOS) που σχηματίζονται σ' ένα αερόβιο περιβάλλον μπορεί να οδηγήσουν στην τροποποίηση σημαντικών βιομακρομορίων, που οδηγούν σε πιθανά φαινόμενα δηλητηρίασης στα βιολογικά συστήματα. Αυτά τα RNOS προσβάλλουν χημικά τις πρωτεΐνες και το DNA, και έχουν τοξικές συνέπειες. Όπως αναφέρεται πιο κάτω, οι κινητικές σχέσεις για τον σχηματισμό των RNOS από O₂ απαιτούν για το NO συγκεντρώσεις υψηλότερες από τις αναμενόμενες για άμεσες επιδράσεις. Τα NO_x, υδρολύονται γρήγορα σε υδατικά μέσα προς νιτρώδη. Αυτό το ενδιάμεσο είναι ικανό να οξειδώσει τα οξειδοαναγωγικά σύμπλοκα και να νιτροδώσει τα υποστρώματα που περιέχουν αμινο- ή θείολο ομάδες. Η υδρόλυση σε νιτρώδες καθώς και η νιτροδωση των υποστρωμάτων με NO_x φαίνεται να είναι ανταγωνιστική, δίνοντας την ευκαιρία να επιβεβαιωθεί η σχετική εκλεκτικότητας των διάφορων βιολογικά σημαντικά ενώσεων.

συπτικού shock, seizures (κατάσχεση), φλεγμονές, φθορές ιστών, αρθρίτιδος, κολίτιδος, κλπ.

Δείγμα της δράσης του σαν δευτερογενής διαβιβαστής είναι ο σημαντικός ρόλος που παίζει στην διαβίβαση σημάτων και τον έλεγχο της φυσιολογικής δράσης του αγγειακού συστήματος, νευρικού συστήματος, ανοσοποιητικού συστήματος, κλπ. Από τους δευτερογενείς διαβιβαστές που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα το NO αποτελεί τον διαβιβαστή που εξουσιάζει και ελέγχει το βιολογικό περιβάλλον που τον παράγει. Οι φυσιολογικές του δράσεις αποδίδονται στην πολύ μικρή ποσότητα, που διαχέεται ελεύθερη και είναι έντονα δραστική ελεύθερη ρίζα.

Το NO συναντάται ευρέως στα θηλαστικά η ύπαρξή του ερμηνεύει πολλά φυσιολογικά φαινόμενα που δεν ήταν κατανοητά στο παρελθόν και η μελέτη των ιδιοτήτων και της δράσης του υπόσχεται νέες μεθόδους και ιδέες για την πρόβλεψη και υγεία.

1.4.1. Επίδραση του NO σε βιοχημικές αντιδράσεις [157, 158]

Οι φυσικές ιδιότητες του NO είναι σημαντικές για την κατανόηση της τύχης του NO και την επίδραση στα βιολογικά συστήματα. Η διαλυτότης του NO είναι 1,9 mM/atm στο υδατικό διάλυμα και έχει αναφερθεί ότι διαχέεται με ταχύτητα 50 $\mu\text{m}/\text{sec}$ κατά μια κατεύθυνση στα βιολογικά συστήματα. Ένας απλός κανόνας είναι ότι οι ιδιότητες της διαλυτότητας και μεταφοράς του NO είναι παρόμοιες του O_2 .

Χημικές ιδιότητες του μονοξειδίου του αζώτου. Ένας από τους κύριους λόγους που η χημική βιολογία χωρίζεται σε άμεσες και έμμεσες επιδράσεις οφείλεται στις θεμελιώδεις χημικές ιδιότητες του NO. Το NO έχει περιττό αριθμό ηλεκτρονίων με το μονήρες ηλεκτρόνιο σε ένα π-αντιδεσμικό τροχιακό γι' αυτό και είναι σταθερή ρίζα. Σε αντίθεση με πολλές ρίζες, το NO δεν αντιδρά με μεγάλη ταχύτητα με τις βιολογικές ενώσεις όπως λόγω χάριν ρίζες με βάση το οξυγόνο π.χ. OH. Επειδή ο χρόνος ζωής του NO in vivo είναι σχετικά βραχύς, < 10 sec, μόνο η ταχύτερη άμεση αντίδραση του NO π.χ. με μεταλλοϊόντα ή άλλες ρίζες μπορεί να είναι σημαντική.

Η πρώτη μέθοδος ακινητοποίησης είναι η ανάπτυξη της ακινητοποίησης του DNA σε χαρτί νιτροκυτταρίνης (NC). Ο μηχανισμός προσάρτησης των νουκλεϊνικών οξέων στην NC είναι άγνωστος αλλά έχει υποτεθεί ότι είναι μη ομοιοπολικός. Η υπόθεση αυτή οδήγησε στην πεποίθηση ότι τα ακινητοποιημένα νουκλεϊνικά οξέα μπορούν να εκλούνται από το NC κατά τις σχολαστικές εκπλύσεις, αλλά σε πολυάριθμα ανεξάρτητα πειράματα με RNA ή DNA προσαρτημένων στο NC, βρέθηκε πως ήταν δυνατόν να απομακρύνεται η πλειονότητα των υβριδισμένων μορίων ιχνηθέτησης χωρίς να εκλούνται σημαντικές ποσότητες προσαρτημένων νουκλεϊνικών οξέων. Το σήμα υβριδισμού δεν μεταβάλλεται σημαντικά μετά από τουλάχιστον έξι εκπλύσεις απομάκρυνσης του ιχνηθέτου. Η έρευνα επικεντρώθηκε σε ακινητοποίηση σε άλλου είδους μεμβράνες. Η νάυλον μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ακινητοποίηση του DNA και RNA παρουσία UV-φωτεινής ακτινοβολίας. Οι ιδιότητες των ακινητοποιημένων νουκλεϊνικών οξέων φαίνονται καλύτερες από αυτές με την χρήση NC σαν στερεό στηρικτικό υλικό. Μια νεότερη τεχνική περιγράφηκε πρόσφατα για την μεταφορά του RNA που κλασματοποιήθηκε σε πηκτή αгарόζης σε χαρτί Ecteola. Η προσάρτηση του RNA σε Ecteola χαρτί είναι μη-ομοιοπολική και μπορεί να αναστραφεί, επιτρέποντας την περαιτέρω μετάβασή του σε εργαστήριο. RNA προσωρινά δεμένο σε DEAE μεμβράνες κυκλοφορεί στην αγορά και εκλύεται σε βιολογικά δραστική μορφή με την χρήση ισχυρών αντιδραστηρίων μετουσίωσης αφυσικοποίησης (π.χ. θειοκυανική γουανιδίνη). Ακόμη, τα μικρότερα των 200 με 300 bp κλάσματα προσαρτώνται ασθενώς στο NC αλλά μπορούν να προσδεθούν ομοιοπολικά σε διαζωτοθέντα χαρτιά.

Ομοιοπολική πρόσδεση αναφέρθηκε με ακινητοποίηση πολυνουκλεοτιδίων σε κυτταρίνη μέσω φωσφοδιεστερική σύνδεση μεταξύ υδροξυλο-moiety (ήμισυ) της κυτταρινικής μεμβράνης και του 5' τέρματος του νουκλεϊνικού οξέος. Ακινητοποίηση σε αгарόζη ακολούθησε αμέσως μετά, και έγινε με ενεργοποίηση της επιφάνειας με CNBr και πρόσδεση μονόκλωνου DNA μέσω της αρωματικής αμινομάδας των βάσεων. Το καρβοδιμίδιο χρησιμοποιήθηκε πολύ για ομοιοπολική τερματική-πρόσδεση του DNA στην κυτταρίνη, στο σεφαντέξ και στο σεφακρύλ.

Ομοιοπολική ακινητοποίηση του DNA σε πολυστυρολίο - δίσωσης με μικροπηγαδάκια: Η συμπύκνωση του DNA στα μικροπηγαδάκια με την μεσολάβηση του καρβοδιμιδίου διερευνήθηκε. Το DNA προσδέεται σε μικροπηγαδάκια με

φωσφατάση μπορεί να συζευχθεί άμεσα σε κοντά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια.

1.3.4 Τεχνικές Ακίνητοποίησης ενζύμων και DNA

Ακίνητοποίηση ενζύμου [100-113].

Φυσική προσρόφηση σε αδρανή φορέα είναι μια απλή μεθοδολογία για ακίνητοποίηση ενός ενζύμου και απαιτεί μόνο την ανάμιξη του διαλύματος του ενζύμου με τον φορέα. Αλλά οι δεσμοί είναι ασθενείς και το ένζυμο μπορεί εύκολα να εκροφηθεί από τον φορέα. Αυτό μπορεί να γίνει με αλλαγή του pH, της ιονικής ισχύος ή της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Η διεργασία προσρόφησης δεν είναι εξειδικευμένη και γι' αυτό πολλές άλλες ενώσεις προσαρτούνται στον φορέα όσο το ακίνητοποιημένο ένζυμο χρησιμοποιείται.

Ο ιονικός δεσμός παρέχει ελαφρά πιο εξειδικευμένο τρόπο προσάρτησης ενός ενζύμου στον φορέα του και προς αυτή την κατεύθυνση χρησιμοποιήθηκαν κάποιες ιονανταλλακτικές ρητίνες όπως η DEAE-σεφαντεξ και η CM-κυτταρίνης.

Ο ομοιοπολικός δεσμός μπορεί να προσδώσει ακόμη πιο σταθερή πρόσδεση μεταξύ ενζύμου και φορέα. Οι ενζυμικές δραστικές μονάδες που συνήθως προσδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς σ' ένα φορέα είναι οι ελεύθερες αμινομάδες αλλά μπορεί να μετέχουν οι σουλφιδρυλικές, οι υδροξυλικές, οι ψιδαζολικές ή οι ελεύθερες καρβοξυλικές ομάδες, επίσης. Πολλές μεθοδολογίες εξαρτώνται από την σύνδεση της φαινολικής, της ψιδαζολικής ή των ελεύθερων αμινομάδων του ενζύμου με διαζωνιακό παράγωγο του φορέα.

Ο πεπτιδικός δεσμός μπορεί να σχηματισθεί μεταξύ μιας ελεύθερης αμινομάδας σ' ένα ένζυμο και μιας καρβοξυλικής ομάδας σ' ένα αδιάλυτο φορέα, ή εάν υπάρχει τέτοια ομάδα σαν ισοκυανικό, οξυαζίδιο ή άλλο δραστικό παράγωγο. Πολλά ένζυμα έχουν ακίνητοποιηθεί με αζιδοπαράγωγα στον φορέα των οποίων ο σχηματισμός μπορεί να απαιτεί επεξεργασία με υδραζίνη. Πεπτιδικοί δεσμοί μεταξύ ενζύμου και φορέα μπορούν να σχηματισθούν επίσης με την χρήση αντιδραστηρίων συμπύκνωσης όπως καρβοδιμιδίων. Μια άλλη κατηγορία σχηματισμού ομοιοπολικού δεσμού είναι

βιοτίνης δεμένο ομοιοπολικά στην C-5 θέση του πυριμιδινικού δακτυλίου μέσω αρυλαμινικού συνδετικού αρμού. Τα νουκλεοτίδια της βιοτίνης με μακρύτερης απόστασης αρμούς συνετέθησαν για να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της αλληλεπίδρασης με την αβιδίνη.

(γ) Φθορισμοχρωμικά συστήματα. Τα πρώτα διαθέσιμα φθορισμοχρωμοποιημένα νουκλεοτίδια ήταν τα φλουροσκείνο-τροποποιημένα διδεοξυ-νουκλεοτίδια που παρήχθησαν για μη-ισοτοπική DNA διαπίστωση αλληλουχίας βάσεων. Σύντομα μετά απ' αυτό, συνετέθησαν τροποποιημένα dUTPs φλουροεσκεΐνης, ροδαμίνης και κουμαρίνης. Φθορισμοχρωμικά-σημανθέντα νουκλεοτίδια μπορούν ενζυματικά να ενσωματωθούν στους ιχνηθέτες και να ανιχνευθούν άμεσα ή έμμεσα με ειδικά αντισώματα, αυξάνοντας την ευαισθησία της αντίδρασης.

(δ) Δινιτροφαίνυλο σύστημα. Δινιτροφαίνυλο ανάλογα της 8-αμινοέξυλο αδενοσίνης 5' τριφωσφορικής έχουν συντεθεί. Αυτά τα παράγωγα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν υποστρώματα για την αντίδραση της μεταφοράς και πολυμεράσης, καθιστώντας ικανή την ενζυματική σύνθεση των DNA ιχνηθετών που περιέχουν την δινιτροφαίνυλομάδα. Τα DNA υβρίδια του ιχνηθέτη ανιχνεύονται με την χρήση αντί-δινιτροφαίνυλο αντισώματα.

(ε) Αμινο-ομάδα. Πολλά C-5 υποκατεστημένα πυριμίδινο υποκατεστημένα νουκλεοτίδια τριφωσφορικά περιγράφηκαν σαν υποστρώματα για την DNA-πολυμεράση. Παρασκευάζεται DNA υποκατεστημένο στην αμινομάδα με χρήση αμινο-(αρμό)-dUTP σαν υπόστρωμα.

B. Επιλογή της μεθόδου σήμανσης.

(α) Ψευδής μετάφραση (nick). Η μέθοδος αυτή είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για την μη-ραδιενεργή σήμανση του ιχνηθέτη DNA. Πολλά σημασμένα νουκλεοτίδια καθώς και πολλά συνδυασμένα αντιδραστήρια (σε kits) κυκλοφορούν στο εμπόριο για την μέθοδο αυτή.

(β) Τυχαία σήμανση με prime. Η μέθοδος αυτή εκτελείται σε ευθυγραμμισμένο μονόκλωνο DNA-οδηγό primer. Τα ολιγονουκλεοτίδια συγκολλούνται κατά

υδραζίνες και τα υδραζίδια. Τροποποιήσεις στα τερματικά άκρα της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας, εν γένει, οδηγεί σε μη διαστρεβλωμένη επανακόλληση.

- B. Δινιτροφαινυλική σήμανση. Δινιτροφαινυλομάδες μπορούν να δεθούν σε αλληλουχίες νουκλεϊνικού οξέος με αντίδραση της 2,4-δινιτροφαινυλοβενζαλδεύδης με ένα DNA ιχνηθέτη σε pH 12.
- Γ. Ακετυλαμινοφλουορενική σήμανση. Πολλοί ερευνητές περιέγραψαν την χημική τροποποίηση των γουανίνο residues στους RNA και DNA ιχνηθέτες χρησιμοποιώντας την καρκινογενή ένωση N-ακετοξυ-N-2-ακετυλαμινοφλουορένιο (AAF). Το παράγωγο του φλουορενίου δένεται ομοιοπολικά, κυρίως στην C-8 θέση των γουανίνο residues.
- Δ. Φωτοενεργοποίηση για σήμανση. Ένα συνθετικό φωτοενεργοποιημένο ανάλογο της βιοτίνης μπορεί τυχαία να εισαχθεί σε αλληλουχίες νουκλεϊνικών οξέων. Το μόριο βιοτίνης συνδέεται σε αρυλαμίδιο που μπορεί να φωτοενεργοποιηθεί για να παράγει έντονο δραστικό αρυλονιτρένιο που δένεται στις αρωματικές βάσεις των νουκλεϊνικών οξέων.
- E. Υδραργύρωση των νουκλεϊνικών οξέων. Ομοιοπολική υδραργύρωση των νουκλεϊνικών οξέων (τροποποίηση της θέσης της κυτιδίνης, ουριδίνης) κάνει εφικτή την εισαγωγή ατόμων υδραργύρου στους ιχνηθέτες. Αυτά μπορούν να γίνουν σημεία αγκυροβόλησης για μερκαπτάνες που μεταφέρουν απτένια μετά από υβριδισμό στον DNA στόχο.
- ΣΤ. Θειώδεις τροποποιήσεις: Τα residues της κυτιδίνης μπορούν να τροποποιηθούν με χρήση θειώδους που οδηγούν στην προσθήκη θειώδους νατρίου στο 5,6-διπλό δεσμό της πυριμιδινικής βάσης. Η προσθήκη διευκολύνει την υποκατάσταση της εξωκυκλικής αμινομάδας μέσω τρανσαμίνωσης με την κατάλληλη αμίνη.
- Z. Ένζυμα. Διάφορες χημικές προσεγγίσεις δημοσιεύθηκαν που περιγράφουν σημάνσεις των ιχνηθετών με ένζυμα. Μερικά πρωτόκολα βασίζονται στη ιονική αλληλεπίδραση των θετικά φορτισμένων μακρομορίων με τις φωσφορικές ομάδες του ιχνηθέτου νουκλεϊνικού οξέος, ακολουθούμενου από σταυρωτή διασύνδεση στα άζωτα των βάσεων residues (υπόλοιπων βάσεων). Η

τμήμα) χρησιμοποιείται για να μαρκαρισθούν αποκομμένα (recessed) 3'-τέρματα δίκλωνου DNA μόρια που παράγουν χαμηλούς ραδιοδραστικούς ιχνηθέτες. (β) Βακτηριοφάγων T4 DNA πολυμεράση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μαρκάρει αμβλυμένα ή αποκομμένα (blunt ή recessed) 3'-τέρματα διπλόκλινα DNA. (γ) Τερματικό δεοξυνουκλεοτίδυλο μεταφοράση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μαρκάρισμα είτε μονό- είτε δίκλινα μόρια DNA στο 3'-τέρμα. Για το μαρκάρισμα του 5'-τέρματος, η πολυνουκλεοτιδική κινάση των βακτηριοφάγων T4 χρησιμοποιείται κατά δύο τρόπους: την “προς τα μπρος αντίδραση” ώστε να σηματοδοτηθεί το DNA με 5'-υδροξύλο τέρματα και την “αντίδραση ανταλλαγής” με σηματοδότηση του DNA με 5'-τερματικά φωσφορικά τέρματα.

Παρασκευή μονόκλωνων DNA ιχνηθετών.

(α) Κλωνοποίηση σε M13 φαγε σαν μέθοδο παραγωγής “prime-κομμένων” πρωτοκομμένων ακρογωνιαίων ιχνηθετών. Με την μέθοδο αυτή, ο DNA ιχνηθέτης αρχικά υπό-κλωνοποιείται στον βακτηριοφάγο M13, και ο M13 universal (=παγκόσμιος) primer (=γεμιστής) χρησιμοποιείται για να ξεκινήσει την σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου, ενσωματώνοντας ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια.

(β) Εξειδικευμένου κλώνου σήμανση. Με την μέθοδο αυτή, η βακτηριοφάγος T4 DNA πολυμεράση ή εξωνουκλεάση III και το κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε.

Απομάκρυνση των μη-ενσωματωθέντων νουκλεοτιδίων από τους σημασμένους ιχνηθέτες. Για την μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιήθηκαν η χρωματογραφία σε στήλες σεφαντέξ και η μέθοδος της καταβύθισης.

Προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας ενσωμάτωσης και ειδικής ραδιοδραστικότητας. Για τον προσδιορισμό της ενσωμάτωσης των ραδιοσημασμένων dNTPs σε μια δεδομένη αντίδραση, είναι απαραίτητο να ξεχωρίσουμε τα μη ενσωματωθέντα ραδιονουκλεοτίδια από τον ιχνηθέτη και να μετρήσουμε την διαφορά ραδιοδραστικότητας μεταξύ δείγματος που έχει πλήρως αντιδράσει και δείγματος που περιέχει μόνο τον ραδιοσημανθέντα ιχνηθέτη. Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται: η μέθοδος καταβύθισης με τριχλωροξικό οξύ (TCA) και η μέθοδος πρόσδεσης του DNA σε DE81 δίσκους ηθμού.

αγγελιοφόρο-RNA που ως επί το πλείστον είναι ελεύθερο από μολύνσεις με rRNA και tRNA. Με την χρήση πρωτόκολου παρασκευής poly(A)⁺RNA, χρήση ολίγο (dT) κυτταρίνης στην μέθοδο καθαρισμού, μπορούμε να πάρουμε πολύ εμπλουτισμένο αγγελιοφόρο-RNA.

RNA ανάλυση. Για να διευκρινιστούν οι ρυθμιστικές ιδιότητες ενός γονιδίου, είναι αναγκαίο να γίνει γνωστή η δομή, η ποσότης, το επίπεδο, το μέγεθος και η ταχύτης σύνθεσης του RNA που παράγεται από το γονίδιο αυτό. Θα πρέπει να γίνει S1 ανάλυση, προσδιορισμός προστασίας της ριβονουκλεάσης και επέκτασης primer για να προσδιορισθούν αμφότερα το τελικό σημείο και η ποσότης του ειδικού RNA. Για την S1 ανάλυση και τον προσδιορισμό προστασίας της ριβονουκλεάσης χρησιμοποιείται μονόκλωνος απλού κλώνου ιχνηθέτης που έχει συμπληρωματική αλληλουχία από το προς μέτρηση RNA. Η τεχνική S1 χρησιμοποιεί τερματικό μαρκαρισμένο μονόκλωνο DNA ιχνηθέτη, που επιτρέπει αδιαμφισβήτητο προσδιορισμό του 5' τέρματος του μηνύματος, με χαμηλό υπόβαθρο στην τελική πηκτή. Ο προσδιορισμός προστασίας ριβονουκλεάσης είναι πιο ευαίσθητη τεχνική από την S1 ανάλυση διότι χρησιμοποιεί έναν ιχνηθέτη σωματικά μαρκαρισμένο. Η μέθοδος ανάπτυξης του primer χρησιμοποιείται για να χαρτογραφηθεί το 5' τέρμα του RNA και να ποσοτικοποιηθεί η ποσότης ενός δεδομένου RNA με την χρήση αντίστροφης τρανσκριπτάσης που θα αναπτύξει ένα primer που είναι συμπληρωματικός στο τμήμα του RNA που μας ενδιαφέρει.

Northern- και σχισμοειδές-blot (μάκτρον αποτύπωμα) υβριδισμικός προσδιορισμός. Το RNA διαχωρίζεται με πηκτή αгарόζης, μεταφέρεται σε νιτροκυτταρίνη και υβριδοποιείται με μαρκαρισμένο ειδικό ιχνηθέτη. Η μέθοδος είναι πολύ ευαίσθητη για ανίχνευση της τάξης μεγέθους του ειδικού RNA και της ειδικής αλληλουχίας στα παρασκευάσματα RNA αλλά δεν επιτρέπει προσδιορισμό της ειδικής δομής του RNA.

Χημειοφωταυγής υβριδισμικός προσδιορισμός. Οι τεχνικές σήμανσης με χημειοφωταυγή αντιδραστήρια και περαιτέρω ανίχνευσης έχουν περιγραφεί στο κεφάλαιο της DNA ανάλυσης. Η όλη μεθοδολογία είναι παρόμοια αυτής στην DNA ανάλυση. Για την ανάλυση του RNA, η ηλεκτροχημειοφωταύγεια και η ανάστροφη αντιγραφή (RT-PCR) συνδυάστηκαν [96-98].

4) Χημειοφωταυγής υβριδισμικής-διασύνδεσης προσδιορισμός [93-95]. Ο προσδιορισμός μέσω διασύνδεσης βασίζεται στην ικανότητα δύο ολιγονουκλεοτιδίων να ενωθούν απ' ευθείας γειτονικά το ένα προς το άλλο σε συμπληρωματικό μόριο στόχο DNA. Τα δύο ολιγονουκλεοτίδια τότε ενώνονται ομοιοπολικά με την δράση της DNA-λιγκάσης υπό την προϋπόθεση ότι τα νουκλεοτίδια στην σύνδεση έχουν ορθώς ζευχθεί με βάσεις. Έτσι μπορούν να γίνουν διακριτές οι αντικαταστάσεις μονόκλωνων νουκλεοτιδίων. Μαρκάροντας ένα από τα ολιγομερή με χημειοφωταυγές αντιδραστήριο όπως ακριδινεστέρα (AE) ο χημειοφωταυγής προσδιορισμός μέσω υβριδισμικής διασύνδεσης σχεδιάζεται. Ο χημειοφωταυγής προσδιορισμός μέσω υβριδισμικής διασύνδεσης παρέχει εύκολο και γρήγορο τρόπο διάκρισης των DNA αλληλουχιών που διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο.

Πολλές εργασίες δημοσιεύτηκαν με χημειοφωταυγή προσδιορισμό του DNA. Οι τεχνικές αυτές θα αντικαταστήσουν στο μέλλον τις τεχνικές ισοτοπικού προσδιορισμού. Η ποσότης των εμπορικών σχετικών αντιδραστηρίων σε kits κυκλοφορούν στην αγορά. Η περαιτέρω πρόοδος και η πρόσφατη ερευνητική εργασία δείχνει ότι υπάρχει μέλλον.

Παρασκευή και Ανάλυση του RNA

Η απομόνωση καθαρού, αμιγούς RNA είναι σημαντική για πειράματα κλωνοποίησης και είναι βασική για την ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου. Το RNA οιοδήποτε κυττάρου μπορεί να τυπωθεί σε DNA διπλού κλώνου με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας cDNA βιβλιοθήκης εξειδικευμένης στον τύπο του κυττάρου. Η ανάλυση της RNA-δομής και η σύνθεση είναι χρήσιμη σε μελέτες έκφρασης γονιδίων. Ο κρίσιμος παράγοντας σε όλα τα RNA πειράματα είναι η απομόνωση του πλήρους-μήκους RNA. Ο σπουδαιότερος λόγος αποτυχίας στην μεθοδολογία παραγωγής RNA είναι η μόλυνση με ριβονουκλεάση, ένζυμο που είναι πολύ σταθερό και εν γένει δεν απαιτεί συνπαράγοντες (cofactors). Για να αποφύγουμε προβλήματα μόλυνσης, θα πρέπει να χειρισθούμε με ειδικό τρόπο όλα τα διαλύματα, τα γυαλικά και τα πλαστικά σκεύη. Τα χέρια είναι η βασική πηγή μόλυνσης με RNάση, γι' αυτό θα πρέπει να φορούνται γάντια σ' όλες τις παρασκευές RNA. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται στο παρασκεύασμα RNA θα πρέπει να έχει επεξεργαστεί με διαιθυλοπυροκαρβονικό (DEPC) που αδρανοποιεί την

Southern Blotting. Τα διαχωρισθέντα κλάσματα του DNA στην πηκτική ηλεκτροφόρησης μεταφέρονται σε στηρικτική μεμβράνη και ακινητοποιούνται και έτσι η μεμβράνη φέρει μια ημιμόνιμη αναπαραγωγή των ιχνών των ταινιών της πηκτής. Αφόρτιστες ή θετικά φορτισμένες νάυλον και νιτροκυτταρίνης μεμβράνες συχνά χρησιμοποιήθηκαν για στηρικτικά υλικά.

Dot και slot (Σημειακή και σχισμοειδής) blotting του DNA. Η σημειακό και σχισμοειδής blotting είναι απλές τεχνικές για την ακινητοποίηση του κύριου σώματος των μη-μετουσιωθέντων DNA σε μεμβράνες νάυλον ή νιτροκυτταρίνης ώστε με την ανάλυση υβριδισμού να προσδιορισθεί η σχετική περίσσεια των στοχευόμενων αλληλουχιών στα παρασκευάσματα του DNA. Σημειακά και σχισμοειδή blots συχνά παρασκευάζονται με την βοήθεια μιας συσκευής πολλών καναλιών ροής με αντλία αναρρόφησης.

Υβριδιακή Ανάλυση του DNA. Η αρχή της υβριδιακής ανάλυσης είναι ότι ένα μονόκλωνο DNA ή RNA μόριο καθορισμένης αλληλουχίας (ιχνηθέτης, που συχνά είναι σημασμένος) μπορεί να ταιριάζει τις βάσεις του σ' ένα δεύτερο DNA ή RNA μόριο που είναι ακινητοποιημένο και περιέχει συμπληρωματική αλληλουχία (στόχος)· η σταθερότητα αυτού εξαρτάται από την έκταση του ζευγαρώματος των βάσεων που συμβαίνει. Η τεχνική επιτρέπει ανίχνευση γονιδίων ενός ανάτυπου σε πολύπλοκα γονιδιώματα (genomes).

Ισοτοπικής-σήμανσης υβριδιακός προσδιορισμός. Με την χρήση του ραδιοσήμανσης για τον υβριδιακό προσδιορισμό, μπορούμε να επιτύχουμε υψηλή ευαισθησία αλλά το μειονέκτημα είναι η επικινδυνότητα για τον ανθρώπινο οργανισμό των αντιδραστηρίων αυτών που περιορίζει την χρήση των τεχνικών του είδους αυτού.

Προσδιορισμός του DNA μέσω μη-ισοτοπικής ανίχνευσης. Η Βιοτίνη και διγοξίνη είναι μη-ισοτοπικοί σηματοφορείς που χρησιμοποιούνται συχνά και κυκλοφορούν στο εμπόριο. Αμφότερα, μπορούν εύκολα να ενσωματωθούν σε ιχνηθέτες DNA και να ανιχνευθούν χρωματομετρικά ένας αριθμός από φθορισμοχρωμικές ενώσεις, όπως επίσης και η αλκαλική φωσφατάση και η καρτοπεροξειδάση (που σχηματίζουν έγχρωμα ιζήματα) παρέχονται απ' ευθείας συζευγμένα με αντί-διγόξινο αντισώματα και με αβιδίνη. Μέθοδοι ανίχνευσης Χημειοφωταύγειας και έμμεσες

μεθοδολογία αυτή, χρησιμοποιήθηκε για γρήγορους διαχωρισμούς η στήλη ιονανταλλαγής υψηλής απόδοσης.

2. Ανοσοχημικές μέθοδοι.

Παρασκευή ανοσοπροσροφητού. Τα στηρικτικά υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι σφαιρίδια αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου, αρχικά παρασκευασθέντα και χρησιμοποιηθέντα για μοριακή διήθηση. Η μεθοδολογία της ακινητοποίησης των πρωτεϊνών σε σφαιρίδια πολυακρυλαμιδίου-αγαρόζης εκτελείται με την μέθοδο της γλουταραλδεύδης. Η ζεύξη των πρωτεϊνών στα σφαιρίδια της Σεφαρόζης εκτελείται με βρωμοκυανικό (CNBr). Με την χρήση του φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού, η ποσότης των πρωτεϊνών που προσαρτάται στα σφαιρίδια προσδιορίζεται από την απορρόφηση στα 280 nm.

Απομόνωση των αντισωμάτων στους ανοσοπροσροφητές. Η απομόνωση των αντισωμάτων μπορεί να εκτελεσθεί σε στήλη ή με φυγοκέντρηση. Η απομόνωση σε στήλη είναι πιο γρήγορη. Με τον διαχωρισμό σε στήλη μέσω της αλλαγής του pH του εκλουστικού ρυθμιστικού διαλύματος, τα αντισώματα που μας ενδιαφέρουν θα εκλουσθούν από την στήλη.

3. Χρήση της πρωτεΐνης A.

Η βιολογική ιδιότης της πρωτεΐνης A είναι η υψηλή συγγένεια για την τάξη των IgG ανοσογλοβουλινών με τις οποίες αντιδρά και μπορεί να σχηματίσει ακόμα, και αδιάλυτα σύμπλοκα. Η πρωτεΐνη A ζευγμένη σε Σεφαρόζη διατίθεται εμπορικά. Η προσάρτηση των ανοσογλοβουλινών στην πρωτεΐνη A συμβαίνει σε φυσιολογικές τιμές pH- αλλά ποικίλει με τα σωματίδια και τις τάξεις του IgG. Ρυθμιστικά αυξανόμενης οξύτητας χρησιμοποιούνται για να εκλουσθεί το προσαρτημένο Ig.

4. Παρασκευή των F(ab')₂ και Fab τμημάτων αντισωμάτων.

Χρησιμοποιώντας διάφορα πρωτεολυτικά ένζυμα, μπορούμε να παράγουμε τμήματα αντισωμάτων με διαφορετικές ιδιότητες:

(α) Η πεψίνη παράγει δισθενή F(ab')₂ τμήματα (M.B. = 92000)

ρυθμιστικό αυξανόμενης ιονικής ισχύος. Η χρωματογραφία κατανομής, παρόμοια, χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό μιγμάτων ενζύμων.

- (β) Η ηλεκτροφόρηση κατά βάση είναι αναλυτική τεχνική καθ' όσον διαχωρίζει τέλεια μικρές ποσότητες της ουσίας, αλλά έχει χρησιμοποιηθεί και για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών, για να διερευνηθούν οι υπομονάδες και να επαληθευτεί η ομοιογένεια των δειγμάτων πρωτεΐνης. Μπορεί επίσης να καθαρίσει πρωτεΐνες για να χρησιμοποιηθούν σε άλλες εφαρμογές. Η ηλεκτροφόρηση ζώνης, η ισοταχοφόρηση, η ισοηλεκτρική εστίαση, η μιας ή διπλής διάστασης SDS πηκτής ηλεκτροφόρηση συχνά χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό.
- (γ) Η κατιονανταλλακτική χρωματογραφία σε πακεταρισμένες στήλες με καρβοξυλιωμένο πολυστυρόλιο χρησιμοποιήθηκε στον επιτυχή καθαρισμό σταθερών, χαμηλού μοριακού βάρους βασικών πρωτεϊνών όπως λυσοζύμης και ριβονουκλεάσης. Η κατιονανταλλακτική χρωματογραφία με στήλη πακεταρισμένη με κυτταρινούχο υλικό απεδείχθη σαν μέθοδος γενικότερων εφαρμογών στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η ιονανταλλακτική χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε στον καθαρισμό των μεμβρανικών πρωτεϊνών σε μη-ιονικά ή αμφί-ιονικά απορρυπαντικά καθώς και για τον καθαρισμό των διαλυτών ενζύμων.
- (δ) Η πηκτή διήθησης (ή χρωματογραφία μοριακού ηθμού ή απόρριψης μεγέθους) είναι μια άλλη σημαντική τεχνική στον καθαρισμό του ενζύμου, και εκτελείται σε στήλες, γεμάτες με διογκωμένες πηκτές που διαχωρίζουν τα συστατικά του δείγματος επί της βάσης του μοριακού μεγέθους.
- (ε) Η χρωματογραφία συγγένειας είναι βιο-ειδική διεργασία και γι' αυτό είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τον διαχωρισμό της μιας πρωτεΐνης από όλες τις άλλες, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που είναι τόσο παρόμοιες στα φυσικά χαρακτηριστικά τους που ο διαχωρισμός τους με οποιαδήποτε άλλη τεχνική είναι εξαιρετικά δύσκολος.
- (στ) Μια πιο σχετική μεθοδολογία είναι η χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας, όπου ο ακινητοποιημένος υποκαταστάτης είναι ένα αντίσωμα ειδικό για το ένζυμο που θα καθαρισθεί. Η βιο-ειδική φύση των τεχνικών αυτών οδηγεί στην επίτευξη ενός πολύ καλού διαχωρισμού από την άλλη πλευρά, ένα σύμπλοκο

φωτοευαισθητοποιητή που παράγει singlet οξυγόνο, $^1\text{O}_2$, όταν εκτίθεται στο φως ενώ το δεύτερο έχει διαλυτοποιημένη την ολεφίνη που θα αντιδράσει με το singlet οξυγόνο και θα δώσει εκπομπή φωτός. Η αντίδραση με το singlet οξυγόνο και η επακόλουθη εκπομπή εξαρτάται έντονα από τον σχηματισμό των ζευγών των τεμαχιδίων. Αμφότερα τα τεμαχίδια έχουν κάλυψη υδροπηκτής που τα προστατεύει από μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις με τα συστατικά του διαλύματος και παρέχει μια επιφάνεια δραστικών ομάδων στην οποία τα αντισώματα και οι αναλύόμενες μπορούν να προσαρτηθούν ομοιοπολικά.

B. Ομογενής Αμπερομετρικός προσδιορισμός με την μεσολάβηση της φερροσίνης [87].

Ένα αμπερομετρικό ανοσοηλεκτρόδιο που βασίζεται στην οξείδωση της γλυκόζης με γλυκοζοξειδάση και στην μεσολάβηση του φερροσινιο-ιόντος στην μεταφορά ηλεκτρονίου περιγράφεται. Ένα σύμπλοκο αντιγόνου-φερρισινιο ιόντος δρα σαν δέκτης ηλεκτρονίου για την γλυκοζοξειδάση. Το ρεύμα που παράγεται κατά την ενζυμική οξείδωση της γλυκόζης παρεμποδίζεται εξειδικευμένα με την αντικατάσταση του αντιγόνου με αντίσωμα στο σύμπλοκο αντιγόνου-φερροσίνης. Η παρεμπόδιση θα μπορούσε να αναστραφεί με την προσθήκη ελεύθερου αντιγόνου. Τοιουτοτρόπως, ένας ομογενής ανταγωνιστικός ανοσοπροσδιορισμός σχεδιάζεται.

Γ. Ομογενής Ηλεκτροενζυμικός Ανοσοπροσδιορισμός [86].

Ένας ομογενής ηλεκτροενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός αναπτύχθηκε για να προσδιορίσει την συγκέντρωση του αντισώματος με την χρήση της γλυκοζοξειδάσης και φερροσίνης σαν ενζυμικό και ηλεκτροχημικό ενισχυτή, αντίστοιχα. Γλυκοζοξειδάση (Gox) συζευγμένη με διγοξίνη (Dig) τροποποιήθηκε με φερροσίνη (FeC) για να σχηματίσει το συζυγές FeC-Gox-Dig και το αντί-διγόξινο αντίσωμα, και το σύμπλοκο αντέδρασε σε μικρότερο βαθμό λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης του αντισώματος. Το πολυσημασμένο συζυγές της φερροσίνης προσφέρεται για τον προσδιορισμό του αντί-διγόξινο αντισώματος.

Εκτός από τον πιο πάνω ανοσοπροσδιορισμό, η ηλεκτροχημειοφωταυγής ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε για τον ανοσοπροσδιορισμό και για προσδιορισμούς με ιχνηθέτη DNA [88]. Πρόσφατα, ένα είδος ανοσοπροσδιορισμού με έγχυση σε ροή (F.I.) βασισμένη σε μαγνητο-ανοσοπροσδιορισμό, επετεύχθη. Βασίζεται σε

Για την μεθοδολογία σήμανσης με χημειοφωταυγή αντιδραστήρια, η μέθοδος σύζευξης είναι ίδια με αιτήσεθς ΕΙΑ. Οι ακόλουθοι μέθοδοι συχνά χρησιμοποιούνται για σήμανση: μέθοδος υπερωδικών, μέθοδος NHS, μέθοδος διαζωνιακού άλατος, μέθοδος EDC, μέθοδος γλουταραλδεύδης, μέθοδος π-βενζοκινόνης. Στην μεθοδολογία σήμανσης οι σχετικές αντιδράσεις σύζευξης έχουν κάποια επίδραση στην δραστικότητα των ανάλογων χημειοφωταυγών αντιδράσεων. Για παράδειγμα, η λουμινόλη συζευγμένη με το αντίσωμα, χάνει τουλάχιστον 10% χημειοφωταυγούς δραστικότητας. Εάν όμως χρησιμοποιηθεί ισολουμινόλη, η δραστικότης δεν έχει εμφανή μείωση. Μετά την εφαρμογή της μεθοδολογίας σήμανσης, απαιτείται και μέθοδος διαχωρισμού για τον καθαρισμό του σημανθέντος ιχνηθέτου από τα ελεύθερα χημειοφωταυγή αντιδραστήρια ή ελεύθερα αντισώματα (αντιγόνα/απτένια). Οι ακόλουθες μέθοδοι χρησιμοποιούνται:

- (α) Διαπίδυση. Με χρήση της μεμβράνης διαπίδυσης, τα υλικά μικρού Μοριακού Βάρους όπως τα ιόντα Na απομακρύνονται.
- (β) Χρωματογραφία πηκτής. Με την χρήση στήλης Sephadex μπορούμε να διαχωρίσουμε διαφορετικά μόρια που έχουν μεγάλη διαφορά στο μοριακό βάρος Sephadex G-10, 15, 25, 50 χρησιμοποιήθηκαν για την αφαλάτωση. Το Sephadex G-100, 150, 200 χρησιμοποιήθηκαν συχνά για τον διαχωρισμό υψηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνών.
- (γ) Χρωματογραφία συγγένειας. Η χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό διαφορετικών ενώσεων που έχουν παρόμοιο μοριακό βάρος. Για παράδειγμα, για να ξεχωρίσουμε την ελεύθερη HRP από το προϊόν σήμανσης HRP-T₃ (τριωδοθυροξίνη) η Sephadex χρωματογραφία πηκτής δεν αποδίδει στον διαχωρισμό αυτό επειδή το μοριακό βάρος των δύο αυτών υλικών δεν έχει εμφανή διαφορά,. Σ' αυτήν την περίπτωση η χρωματογραφία συγγένειας είναι πολύ χρήσιμη. Η αγαρόζη, η σεφαρόζη, το σεφαντεξ G-75 συχνά χρησιμοποιούνται για στερεό στηρικτικό υλικό στην παρασκευή ανοσοπροσροφητικών αντιδραστηρίων.
- (δ) Η ηλεκτροφόρηση και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPEC) χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών και αμινοξέων.

Ενζυμικός Ανοσοπροσδιορισμός (EIA). Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανίχνευσης είναι η ELISA (προσδεμένου ενζύμου, ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός). Σ' αυτό το είδος του προσδιορισμού, τα συζυγή αντίσωμα-ένζυμο χρησιμοποιούνται ποσοτικά ή ποιοτικά μέσω αντιδράσεων ενζύμου-υποστρώματος που δίνουν μετρήσιμη ένταση χρώματος. Η ποικιλία των συστημάτων και ενζύμων που διατίθενται επιτρέπει ποικίλες εφαρμογές στην ELISA καθώς και στην ανοσοϊστοχημική κηλίδωση και την ανοσο blotting μεθοδολογία.

Τα ακόλουθα τρία ένζυμα συχνά χρησιμοποιήθηκαν για την σήμανση όπως: (α) Αλκαλική φωσφατάση (AP), (β) Καροτοπεροξειδάση (KRP), και (γ) η ουρεάση. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο υπεριοδικού ή την μέθοδο δύο σταδίων με γλουταραλεύδη το ένζυμο συζεύγνυται με το κατάλληλο αντίσωμα ή αντιγόνο απτένιο. Για την AP, τα π-νιτροφαινυλοφωσφορικά (pNPP), 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλοφωσφορικό/νίτρο μπλε τετραζόλιο (BCIP/NBT) χρησιμοποιήθηκαν σαν υποστρώματα. Για το HRP χρησιμοποιήθηκαν σαν υποστρώματα ο-φαινυλενοδιαμίνη (OPD), η 3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB), η ο-διανισιδίνη, το 5-αμινοσαλκυλικό (SAS), το 2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλοβενζυθειαζολίνο)-6-σουλφονικό οξύ (ABTS). Η αντίδραση της ουρεάσης παρακολουθείται με την προσθήκη ενός χρωματομετρικού δείκτη pH (πορφυρού της βρωμοκρεσόλης) στο υπόστρωμα και τα τελικά σημεία μπορούν να προσδιορισθούν οπτικά ή φασματοσκοπικά σαν μεταβολές χρώματος από κίτρινο σε πορφυρούν. Ηλεκτροδιακοί αισθητήρες αέριας αμμωνίας χρησιμοποιούνται επίσης για την εκτίμηση της δραστηρότητας της συζυγούς ουρεάσης στην ELISA.

Για τον ανοσοπροσδιορισμό, χρησιμοποιούνται επίσης σαν αντιδραστήρια σήμανσης η βιοτίνη, ο κολλοειδής χρυσός και η φεριτίνη. Το σύστημα σήμανσης αβιδίνης/βιοτίνης βασίζεται στην υψηλή συγγένεια της αβιδίνης του αβγού για βιοτίνη. Ένα μόριο αβιδίνης θα προσαρτήσει 4 μόρια βιοτίνης χωρίς ομοιοπολικό δεσμό που βασικά είναι μη-αντιστρεπτή. Η υψηλή συγγένεια της αβιδίνης για βιοτίνη χρησιμοποιείται σε ανοσοπροσδιορισμούς με την σύζευξη παραδοσιακού μορίου δείκτη όπως φθορισμοχρωμικό και ένζυμο με αβιδίνη. Για παράδειγμα, τα αντισώματα συζεύγνυνται σε βιοτινοαμιδοκαπροικό N-υδροξυμυδροηλεκτρικό εστέρα

1.3. DNA ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Οι πρωτεΐνες, μερικά παρεμφερή απτένια και το DNA παίζουν σημαντικό ρόλο στον ανθρώπινο οργανισμό. Με την ανάπτυξη της επιστήμης και την μεγάλη βελτίωση του επιπέδου ζωής των ανθρώπων, οι κοινωνίες δίνουν μεγαλύτερη σημασία στην υγεία. Προς το παρόν, περίπου 70% της έρευνας είναι προσανατολισμένη στον ανθρώπινο οργανισμό. Η ανάπτυξη μιας ανιχνευτικής μεθοδολογίας για το DNA και τις πρωτεΐνες είναι πολύ σημαντική στα πεδία της Ιατρικής, της Κλινικής Χημείας, Βιοχημείας, Μοριακής Βιολογίας, Αναλυτικής Βιοχημείας κ.ο.κ. Η ανάλυση με Χημείο- και Βιοφωταύγεια είναι η πιο ευαίσθητη διαθέσιμη μέθοδος σε πολλούς τύπους προσδιορισμών που χρησιμοποιούν τεχνικές σήμανσης με ενώσεις φθορισμού, ισότοπα και ένζυμα. Έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως υψηλή ευαισθησία, υψηλή εξειδίκευση, είναι εύκολη στον χειρισμό, ταχεία και δεν έχει ραδιενεργή επικινδυνότητα.

1.3.1. Ανοσοπροσδιορισμός για πρωτεΐνες και απτένια

Ποσοτικές αναλυτικές μέθοδοι με αντισώματα ή αντιγόνα σαν αρχικά αντιδραστήρια έχουν τώρα καθιερωθεί σε πολλές κλινικές, φαρμακευτικές και βασικές επιστημονικές έρευνες. Για την ανάλυση των πρωτεϊνών ή πεπτιδίων (συμπεριλαμβάνοντας πολλές ορμόνες, λιποπρωτεΐνες, ογκοπρωτεΐνες, παθογόνα αντιγόνα και εξειδικευμένα αντισώματα) χρησιμοποιούνται η χρωματογραφία, η χρωματομετρία ή άλλες πρότυπες μέθοδοι ιδιαίτερα, ο ανοσοπροσδιορισμός συχνά χρησιμοποιείται λόγω της ταχύτητάς του, της απλότητας και του σχετικού χαμηλού κόστους του. Αυτές οι τάσεις ενθαρρύνθηκαν τα μέγιστα από την ευκολία και την εμπιστοσύνη που παρέχουν τα εμπορικά πακέτα αντιδραστηρίων. Για την ανάλυση των πρωτεϊνών και απτενίων, συχνά χρησιμοποιούνται όλα τα είδη ανοσοπροσδιορισμών [77-81, 90, 91]'

Ραδιοϊσοτοπικός Ανοσοπροσδιορισμός (RIA). Χρησιμοποιώντας ισοτοπική μέθοδο σήμανσης για την ανάλυση των πρωτεϊνών και των απτενίων, δυνάμεθα να πάρουμε αποτελέσματα υψηλής ευαισθησίας, αλλά αυτές οι τεχνικές περιορίζονται από την ραδιοϊσοτοπική τους επικινδυνότητα. Τώρα, είναι δημοφιλής η διερεύνηση όλων των

Σύστημα Βιοτίνης-Αβιδίνης: Η μεγάλη συγγένεια της αβιδίνης για βιοτίνη παρέχει ένα ισχυρό εργαλείο για μελέτες σε πολλές περιοχές όπως:

- (α) Απομόνωσης υλικών που σχηματίζουν παράγωγα με βιοτίνη με χρωματογραφία συγγένειας.
- (β) Εντοπισμού και φανέρωσης πολλών αντιγόνων.
- (γ) Παροχής φαρμάκου.
- (δ) Ερεθισμού λεμφοκυττάρων.

Με την χρήση των τεχνικών αυτών, η ευαισθησία αυξήθηκε στο μέγιστο. Χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα στην CLIA, στον προσδιορισμό-DNA, και στην διαπίστωση αλληλουχίας DNA [60-63].

Ακόμη, το πυρένιο, η φλουορεσκεΐνη [42-44], η γλυκοζο-αφυδρογονάση, η γλυκοζο-6-φωσφορική αφυδρογονάση, η γλυκοζοξειδάση, συνένζυμα όπως ATP και NAD, απτένια όπως η διγοξίνη, αναστροφάση, ουρεάση, σύμπλοκα μετάλλων όπως σύμπλοκο Fe (III)-φθαλοκυανίνης, οξαλικό, TCPO χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική της Χημείο- και Βιοφωταύγειας [1,64].

1.2.3 Φωτογραφική ανίχνευση μέσω ΧΦ και ΒΦ αντίδρασης

Στον ΧΦ και ΒΦ προσδιορισμό, η εκπομπή φωτός συνήθως μετρείται με φωτοπολλαπλασιαστή ή με φωτοδίοδο πυριτίου. Ένας λιγότερο δαπανηρός και απλούστερος ανιχνευτής είναι το φωτογραφικό φιλμ. Ο συνδυασμός της ΧΦ ή ΒΦ και του φωτογραφικού φιλμ έχει πολλά πλεονεκτήματα:

- (α) Μπορούν να σχεδιαστούν πλήρως χημικοί προσδιορισμοί στους οποίους το φως που παράγεται με μια χημική αντίδραση ανιχνεύεται μέσω χημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στο γαλάκτωμα του φιλμ.
- (β) Πολλαπλοί προσδιορισμοί μπορούν να επιτευχθούν αμέσως χρησιμοποιώντας χαμηλού κόστους, φορητό όργανο που δεν απαιτεί τροφοδοτικό.
- (γ) Μόνιμος οπτική καταγραφή επιτυγχάνεται
- (δ) Γρήγοροι προσδιορισμοί είναι δυνατοί.

Μια ευρεία ποικιλία λουμινομέτρων διατίθενται προς χρήση για την ΧΦ και ΒΦ αντίδραση όπως όλα τα είδη λουμινομέτρων φωτογραφικής μηχανής, φωτοκασσέτας, και τροποποιημένης πολαροειδούς (polaroid) φωτογραφικής μηχανής. Αυτά τα όργανα περιλαμβάνουν χειροκίνητα όργανα ενός ανιχνευτή, και αυτόματα λουμινόμετρα βασισμένα σε ανιχνευτές ή μικροτιτλοδοτικές λωρίδες ή πλάκες σαν δοχεία αντίδρασης. Πρόσφατα, η περαιτέρω ανάπτυξη επικεντρώνεται

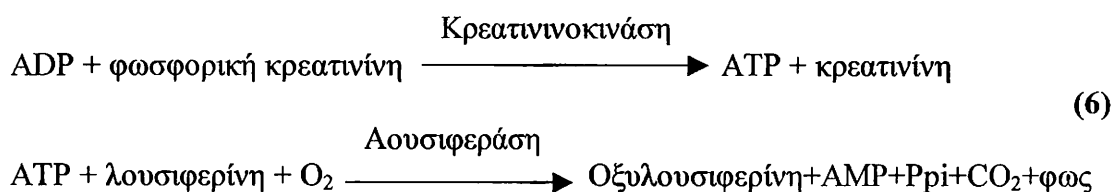
που αποφωσφορυλιώνεται σε φαινόξειδο-ενδιάμεσο που αποσυντίθεται για να σχηματίσει αδαμαντανόνη και αρυλεστέρα. Η εκπομπή φωτός ενισχύεται παρουσία διαφόρων ενώσεων συμπεριλαμβανομένου και του πολυμερούς (π.χ. πολυβινυλβενζυλο (βενζυλοδιμέθυλο αμμώνιο χλωρίδιο). Η AP μπορεί επίσης να προσδιορισθεί με χρήση ασκορβικού οξέος 2-O-φωσφορικό εστέρα. Αυτό το υπόστρωμα αποφωσφορυλιώνεται για να σχηματίσει ασκορβικό οξύ, που ανιχνεύεται με την χρήση της ΧΦ αντίδρασης λουσιγενίνης. Στον προσδιορισμό αυτό, ένα συνηθισμένο υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης π.χ. π-νιτροφαινόλο φωσφορικό αποφωσφορυλιώνεται και η μεταβολή του pH του μίγματος αντίδρασης προκαλούμενη από την ελευθέρωση του φωσφορικού, ανιχνεύεται χημειοφωταυγώς με μίγμα διαλύματος λουσιγενίνης σε αιθανόλη και αναγωγικό (μαννόζη) η εκπομπή φωτός από την αντίδραση αυτή είναι μεγάλης διάρκειας > 50 λεπτών. Ακόμη, για την ανίχνευση αλκαλικής φωσφατάσης χρησιμοποιείται ο ενισχυμένος ΧΦ-προσδιορισμός του HRP με τις ακόλουθες μεθόδους: (α) μέθοδος ενίσχυσης χημειοφωταύγειας, όπου το π-ιωδοφαινολοφωσφορικό υπόστρωμα αποφωσφορυλιούται για να σχηματίσει π-ιωδοφαινόλη, που αυξάνει την ΧΦ του συστήματος λουμινόλη-περοξειδίο-περοξειδάση (b) μέθοδος μείωσης χημειοφωταύγειας κατά την οποία ένα π-νιτροφαινολοφωσφορικό υπόστρωμα αποφωσφορυλιούται για να σχηματίσει π-νιτροφαινόλη που παρεμποδίζει την χημειοφωταύγεια του ενισχυμένου προσδιορισμού με π-ιωδοφαινόλη της αντίδρασης λουμινόλης-H₂O₂-περοξειδάσης. Σαν Χημειοφωταυγές υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατάση, η 1,2-διοξετάνη συνετέθη με χημική και φωτοχημική μέθοδο, αλλά η θερμική αστάθεια των πλείστων διοξετανών και η αδυναμία του άνετου ελέγχου της φωταύγειας έχει τα μέγιστα περιορίσει την περαιτέρω εφαρμογή. Πρόσφατα, νέες σειρές διοξετανών που είναι θερμικά σταθερές παρασκευάστηκαν και μπορούν με χημικά ή με ένζυμα να πυροδοτηθούν για να παράγουν χημειοφωταύγεια κατά παραγγελίαν. Χημική ή ενζυματική απομάκρυνση μιας ομάδας προστασίας από την σταθερή διοξετάνη παράγει την ασταθή αρυλοξειδική διοξετάνη, που διασπάται και παρέχει την παρατηρούμενη χημειοφωταύγεια. Αυτό το είδος των νέων παραγώγων διοξετάνης χρησιμοποιήθηκαν ευρύτατα στο πεδίο του DNA-ανάλυσης και διαπίστωσης της αλληλουχίας του DNA κ.ο.κ.

Περοξειδάση Καρότου: Ένας ταχύς και ευαίσθητος προσδιορισμός του ευρύτατα χρησιμοποιούμενου ενζύμου της περοξειδάσης καρότου (HRP) είναι δυνατός με

Για χημειοφωταυγή αντίδραση, η λουμινόλη μπορεί να προσδεθεί σαν σηματοδότης σε πρωτεΐνες με στόχο τον βιοφωταυγή προσδιορισμό. Η αρυλοαμινομάδα παρέχει εύκολη θέση πρόσδεσης στα αντιγόνα και αντισώματα. Αλλά, η χημειοφωταυγής κβαντική απόδοση της λουμινόλης μειώνεται κατά 10-φορές όταν η αμινομάδα υποκαθίσταται και μειούται η ειδική δραστικότητα. Η ισολουμινόλη έχει μια ΧΦ-κβαντική απόδοση 1/10 αυτής της λουμινόλης, αλλά με υποκατάσταση της αρυλικής αμινομάδας αυξάνεται η κβαντική απόδοση 10-φορές. Για τον λόγο αυτό η ισολουμινόλη ή τα παράγωγα της ισολουμινόλης χρησιμοποιούνται σαν σηματοδότες στους περισσότερους ανοσοπροσδιορισμούς. Ακόμη, τα κατάλληλα ένζυμα όπως το HRP, η μικροπεροξειδάση μπορούν ακόμη να ανιχνευθούν σύμφωνα με την πιο πάνω αντίδραση.

Εστέρες ακριδίνης και παράγωγα. Οι εστέρες της ακριδίνης (AE) [46] και τα παράγωγά της παράγουν φως παρουσία βάσης και H_2O_2 , που είναι έντονο λόγω της υψηλής χημειοφωταυγούς κβαντικής απόδοσης και της γρήγορης κινητικής της ΧΦ-αντίδρασης για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε στον ανοσοπροσδιορισμό για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και μερικών απτενίων. Με την χρήση AE σαν αντιδραστήρια σήμανσης μπορούμε να εκτελέσουμε προσδιορισμούς με μεγάλη ευαισθησία και υψηλή ταχύτητα. Οι AE χρησιμοποιήθηκαν για να παρασκευάσουν μονόκλωνα αντισώματα και παρείχαν πολύ υψηλή ευαισθησία σε ανοσοπροσδιορισμούς με όριο ανιχνευσιμότητας του amol [47, 49]. Στην μεθοδολογία σήμανσης, το N-υδροξυ-σουκινιμίδιο (NHS) N-υδροξυαμιδίου του ηλεκτρικού οξέος χρησιμοποιήθηκε για σύζευξη με το AE που είναι μια πολύ επιτυχής μέθοδος σήμανσης. Από το 1989, οι AE χρησιμοποιήθηκαν ευρέως στον ομογενή υβριδικό προσδιορισμό [45]. Χρησιμοποιώντας προσδιορισμό υβριδικής προστασίας [HPA] επετέυχθη μέθοδος ακριβούς διάκρισης μεταξύ υβριδισμένου και μη-υβριδισμένου DNA-ιχνηθετών σηματοδοτηθένων με ακριδινεστέρες χωρίς την χρήση σταδίου διαχωρισμού. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην εκλεκτική χημική σύζευξη της ακριδινεστερικής σήμανσης, έτσι ώστε η ΧΦ του μη-υβριδισμένου ιχνηθέτη χάνεται γρήγορα ενώ αυτή που προέρχεται από τον υβριδισμένο ιχνηθέτη ελάχιστα μεταβάλλεται. Αιτία αυτής της εκλεκτικής διεργασίας αποσύζευξης είναι μια έντονα εξειδικευμένη αντίδραση χημικής υδρόλυσης που ελέγχεται από το τοπικό περιβάλλον του AE. Συνδυάζοντας την ομογενή υβριδική διάκριση με τον στερεάς-φάσης διαχωρισμό, η ευαισθησία αυξήθηκε πολύ με όριο ανίχνευσης του amol. Η συνολική μεθοδολογία προσδιορισμού απαιτεί μόνον τρία στάδια και μπορεί να

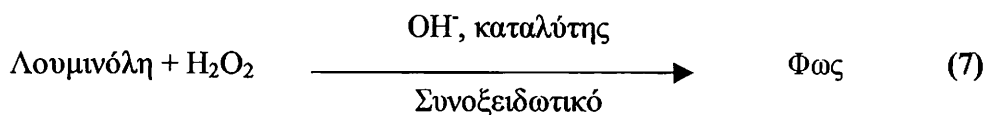
Πολλές μέθοδοι προσδιορισμού ανεπτύχθησαν γι' αυτό το είδος βιοδεικτών. Το ισοένζυμο μπορεί να διαχωριστεί χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους ηλεκτροφόρησης και να προσδιορισθεί απ' ευθείας στην πηκτή. Μπορεί επίσης να διαχωριστεί με την χρήση χρωματογραφίας ιονανταλλαγής και ο προσδιορισμός γίνεται συχνά με την χρήση φασματοφωτομετρίας ή φθορισμομετρίας. Η εκλεκτική αποδιέγερση του ισοένζυμου CK με αντισωματική καταβύθιση ή χρησιμοποιώντας παρεμποδιστή-αντίσωμα γίνεται απ' ευθείας προβολή στην υπομονάδα M. Η MB δραστικότητας μπορεί τότε να υπολογισθεί απ' ευθείας από την εναπομένουσα B δραστικότητα. Ο προσδιορισμός της CK-MB με την χρήση luciferase της πυγολαμπίδος που βασίζεται στην βιοφωταύγεια ανεπτύχθηκε τελευταία [21, 23]. Αυτό το είδος της μεθόδου είναι τόσο γρήγορο, τόσο εύκολο και επαναλήψιμο όσο και η φασματοφωτομετρική μέθοδος αλλά πιο ευαίσθητο. Η αντίδραση ανίχνευσης είναι η ακόλουθος.



Η ειδική ανίχνευση της CK-MB μπορεί να επιτευχθεί με ανοσοπαρεμποδιστή της δραστικότητας της M-υπομονάδας.

1.2.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

Σύστημα Λουμινόλης και Ισολουμινόλης: Η Λουμινόλη παράγει φως με την αντίδραση

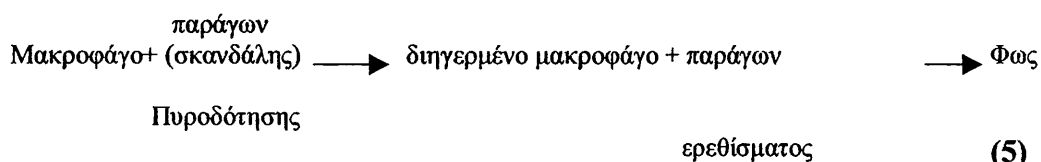


Η χημειοφωταυγής αντίδραση της λουμινόλης υπήρξε αντικείμενο πολλών μηχανιστικών και αναλυτικών μελετών. Το ανιόν της λουμινόλης αρχικά οξειδώνεται, πιθανότατα σε ρίζα που αντιδρά γρήγορα με οξυγόνο ή H_2O_2 και δίνει περοξειδικό ενδιάμεσο που εξαρτάται από τις συνθήκες. Αυτό στην συνέχεια διασπάται και δίνει διηγεμένο μόριο 3-αμινοφθαλικό ανιόν, που επιστρέφει στην βασική του κατάσταση, με εκπομπή φωτός. Στο σύστημα αυτό της οξείδωσης της λουμινόλης με το H_2O_2 , η λουμινόλη πρακτικά δεν αντιδρά με το H_2O_2 εκτός όταν

Σε μια βιοφωταυγή εφαρμογή, τα φωταυγή βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των αντιβιοτικών. Επιπλέον, τα φαινόμενα της φωταύγειας μπορούν να έχουν μεγάλη αξία για την περαιτέρω κατανόηση της κυτταρικής κατάστασης [16, 17]. Κυτταρική χημειοφωταύγεια παράγεται από μοναδικά κύτταρα όπως ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα ή μακροφάγα (alveolar ή peritoneal). Αυτά τα κύτταρα είναι φαγοκυτταρικά, δηλαδή μπορούν να εγκολπώσουν τεμάχια. Εάν τα τεμάχια είναι ζωντανές βιολογικές οντότητες όπως βακτήρια, ζύμες ή ιοί μπορούν να θανατωθούν με διάφορες χημικές διεργασίες που παρέχονται από τα φαγοσιτικά κύτταρα. Εάν ο μηχανισμός αυτός φυσικής άμυνας είναι ελαττωματικός ή έχει ενισχυθεί ή εξασθενήσει από ασθένειες, αυτές οι μεταβολές μπορούν να ανιχνευθούν με μέτρηση της κυτταρικής φωταύγειας. Η κυτταρική χημειοφωταύγεια χρησιμοποιείται ευρέως για την διεκκρίνιση πολλών διαφορετικών ασθενειών όπως

(α) Γενετικών ανωμαλιών π.χ. χρόνιες εξανθηματικές Granulomatus ασθένειες (CGD), μυελοπεροξειδάσης, (β) φλεγμονές, όπως αρθρίτιδα, άσθμα επαγόμενο από άσκηση, κυτταρική χημειοφωταύγεια επαγόμενη από γύρη (pollen), (γ) προσβολές, όπως από βακτήρια, ιούς (π.χ. γρίπη, senday(ιαπωνικό)-ιό, κ.τ.λ.), (δ) καρκίνο, (ε) ποικίλες ασθένειες με κίνδυνο μετάδοσης, όπως χρόνια αιμοδιάλυση, ρινική μεταμόσχευση, ασθένειες διαβήτη, δευτερογενή υποθυρεοδισμό. (στ) σαρκοείδωση. Για να ανιχνεύσουμε την εκπομπή φωτός χρησιμοποιούμε διαφορετικά συστήματα φωταυγών προσδιορισμών.

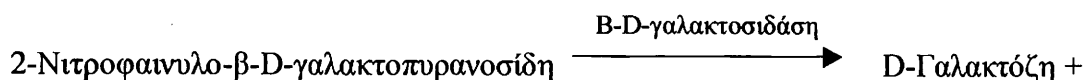
Μερικά ανήκουν στην φυσική κυτταρική χημειοφωταύγεια, μερικά μπορούν να ανιχνευθούν με την βοήθεια λουμινόλης, λουσιγενίνης ή DMNH(υδραζίδιο του 7-διμεθυλαμινοναφθαλινο-1,2-δικαρβοξυλικού οξέος). Διερευνήθηκε, ακόμη, και το σύστημα φωταυγούς ανοσοπροσδιορισμού που βασίζεται σε μακροφάγα κύτταρα. Το κυτταρικό σύστημα βιοπροσδιορισμού που περιγράφεται εδώ στηρίζεται στην ακόλουθη μεταβολή.



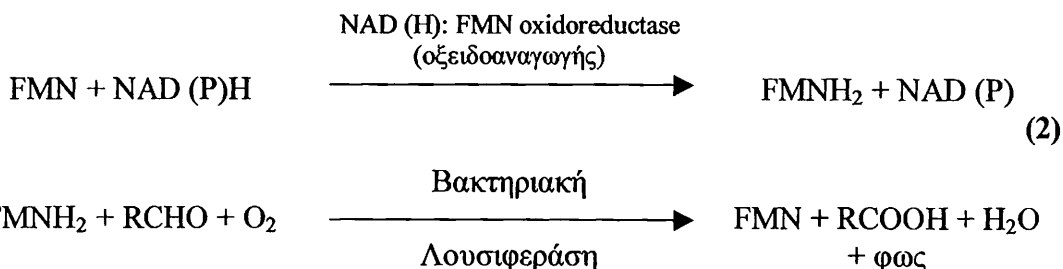
Με βάση την πιο πάνω μεταβολή, το σύστημα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα ακόλουθα πεδία έρευνας. (α) Ανίχνευση των παραγόντων διέγερσης των μακροφάγων, (β) χημειοφωταυγή ανάλυση της αλληλεπίδρασης μεταξύ IFN- γ και LPS (λιποπολυσακχαριτών) στην διέγερση των μακροφάγων, (γ) διαπίστωση

γονίδιο της γλωραμφαινικόλ-ακετυλοτρανσφεράσης (CAT) χρησιμοποιείται ευρέως σε ανασυνδυαστικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν για να μελετήσουν τον έλεγχο προώθησης και ενίσχυσης της έκφρασης του γονιδίου. Για την δοκιμή τοξικότητας και μετάλλαξης (mutant), παρήχθη μέσω μεταλλαξογέννεσης (mutagenesis) με μεθυλοσουλφονικό μεθάνιο το σκοτεινό προϊόν μετάλλαξης του φωτοβακτηρίου *fischeri* (pf-13). Χρησιμοποιώντας μερικά μεταλλαξιγόνα, αυτό το είδος του προϊόντος μετάλλαξης μπορεί να αποκαταστήσει την ικανότητα της εκπομπής φωτός. Αυτό το έργο μπορεί να γίνει με παρεμποδιστές DNA σύνθεσης, με παράγοντες που προκαλούν ζημιές στο DNA, και DNA intercalating παρεμβατικούς παράγοντες. Με μέτρηση της μεταβολής της έντασης της εκπομπής φωτός, είναι δυνατόν να αντιληφθούμε την τοξικότητα και την ικανότητα μεταλλαξογέννεσης (mutagenesis) (μετάλλαξης) μερικών μεταλλικών ενώσεων ή οτιδήποτε άλλο. Μπορεί ακόμη να εφαρμοστεί μια βιοφωταυγής δοκιμή σαν αναλυτικό στοιχείο σε διάφορα επίπεδα τοξικολογίας, φαρμακολογίας και χημειοθεραπείας καθώς επίσης και σαν ισχυρό εργαλείο έρευνας [19]. Στην μικροβιολογία πάλι, έχει όλα τα πλεονεκτήματα της δοκιμής Ames και επιπλέον είναι γρήγορη και απλή στο χειρισμό για τους γονοτοξικούς παράγοντες. Η βιοφωταυγής δοκιμή είναι εν δυνάμει χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη της δραστηριότητας διάφορων φυσικοχημικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με το DNA. Η ικανότης να παρακολουθήσουμε την κινητική των γενετικών συμβάντων σε συνεχή βάση και χωρίς καταστροφή του δείγματος δεν προσφέρεται από άλλα συστήματα.

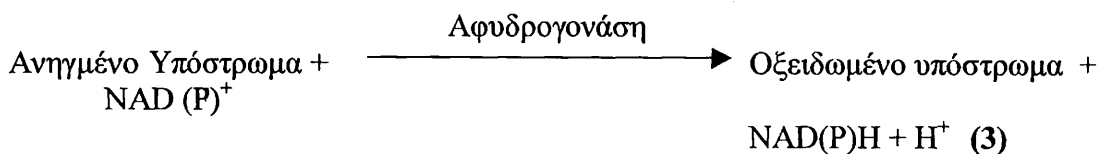
- Γ. **Προσδιορισμός ενζύμων, υποστρωμάτων, παραγόντων.** Το σύστημα luciferase / luciferin χρησιμοποιήθηκε ευρέως για προσδιορισμό διαφόρων ενζύμων όπως αλκοολ-αφυδρογονάση, ATPάση, ενολάση, β-D-Γαλακτοσιδάση κ.ο.κ. Για τα υποστρώματα και τους συμπαράγοντες, πέραν της δυνατότητας προσδιορισμού των (όπως αναφέρθηκε) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των ανδρογόνων, της φωσφορικής κρεατίνης, της κρεατινίνης [21, 22, 23], της θειική διυδρο επιανδροστερόνης, του FAD, των ελευθέρων λιπαρών οξέων, της γλουταθειόνης, της μυο-ινοσιτόλης, του NAD, του NADH, των οξαλικών, των φερομονών, κ.ο.κ. Για παράδειγμα, για τον προσδιορισμό της β-D-Γαλακτοσιδάσης, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την ακόλουθο αντίδραση [2].



συστημάτων αντίδρασης που παράγουν ATP. Ακόμη, οι πρόσφατες έρευνες που στηρίζουν στην βιοφωταύγεια των Marine-βακτηρίων, διεύρυναν το πεδίο της βιοφωταυγούς ανάλυσης. Η φωταύγεια με Marine-Bacteria βασίζεται στην αντίδραση



Σύμφωνα με την πιο πάνω αντίδραση, τα διάφορα συστήματα που παράγουν την NAD (P)H με την χρήση διαφορετικών αφυδρογονασών, καθώς και διάφορα αναγωγικά υποστρώματα όπως χολή [8], οιστρογόνα [7], αιθανόλη, γλυκερίνη [3], αλδεύδη μπορούν να ανιχνευθούν χρησιμοποιώντας στην αντίδραση [100].



Για τον σκοπό αυτό, τα διάφορα ένζυμα συνακτινοποιούνται στο ίδιο σύστημα για την παρασκευή του Βιοφωταυγούς συστήματος. Περισσότερες πληροφορίες για την συνακτινοποίηση της λουσιφεράσης (luciferase) και των άλλων ενζύμων παρατίθενται στην εργασία [101]. Βιοφωταυγείς προσδιορισμοί με συσκευές συνεχούς ροής που χρησιμοποιούν διαφορετικά ένζυμα ακινητοποιημένα σε στηρικτικά υλικά χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό πολλών ανάλογων ενώσεων όπως malate, γλυκόζης, γαλακτικών, L-αλανίνης, L-γλουταμινικού, NAD, NADP κ.τ.λ. [104, 106]. Ακόμη, ανιχνεύθηκε με βιοφωταύγεια ή βακτηρο-ουρία ενώ η luciferase προσαρτάτο σε υπό ανάλυση ενώσεις. Η τεχνική σήμανσης για βιοφωταυγείς προσδιορισμούς όπως η ανάλυση της a-bungaro-τοξίνης [6]. Για την ακινητοποίηση της Luciferase αρχικά ακινητοποιήθηκε σε αρυλάμινο γυάλινα σφαιρίδια αλλά στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν και άλλα στηρικτικά υλικά με επιτυχία όπως η sepharose, η κυτταρίνη, το νάυλον. Κυριάρχησαν οι μέθοδοι χημικής ακινητοποίησης (π.χ. βρωμοκυανικά-ενεργοποιημένη sepharose, γλουταραλδεύδη-ενεργοποιημένο νάυλον), αλλά και οι μέθοδοι φυσικής προσρόφησης χρησιμοποιήθηκαν σαν μια εναλλακτική τεχνική για την βακτηριακή luciferase. Για την περίπτωση της συνακτινοποίησης, όμως, παρατηρείται διαφοροποίηση της

Β. Γρήγορος και απλός προσδιορισμός: Οι πλείστοι προσδιορισμοί είναι ενός σταδίου και περιλαμβάνουν απλά την προσθήκη ενός αντιδραστηρίου ή συνδυασμό αντιδραστηρίων και το δείγμα. Δεν απαιτείται παρατεταμένος χρόνος επώασης ή προσθήκη αντιδραστηρίων για τον τερματισμό της αντίδρασης όπως στις περιπτώσεις των χρωματομετρικών προσδιορισμών. Σε μια μελέτη αντικατάστασης ενός χρωματομετρικού προσδιορισμού ELISA με ενισχυμένη χημειοφωταυγή μέθοδο μέσω σήμανσης με horseradish περοξειδάσης διαπιστώθηκε ένα κέρδος χρόνου κατά 40% κάνοντας χρήση της μεθόδου προσδιορισμού του τελικού σημείου. Επιπροσθέτως, μερικοί ομογενείς προσδιορισμοί στην ανάλυση του DNA με ακριδινεστέρες που κάνουν χρήση προσδιορισμού υβριδοπροστασίας (HPA), η συνολική διαδικασία τελείωσε πολύ γρήγορα χωρίς να γίνει διαχωρισμός.

Γ. Παρατεταμένο και σταθερό σήμα: Μερικά Χήμειο- και Βιοφωταυγή συστήματα μπορούν να έχουν παρατεταμένη και σταθερή εκπομπή φωτός. Για παράδειγμα στο σύστημα ενισχυμένης φωταύγειας HRP-λουμινόλη-ιωδοφαινόλη η εκπομπή φωτός είναι σταθερή τουλάχιστον για 30 λεπτά. Ακόμη, στον χημειοφωταυγή προσδιορισμό με ξανθοξειδάση, το παραγόμενο φως διαρκεί για πολλές μέρες.

Δ. Ασφάλεια: Ο πιο σπουδαίος λόγος που οι τεχνικές της χήμειο- και βιοφωταύγειας έγιναν προσφιλείς στην έρευνα είναι η έντονη ανάγκη για αντικατάσταση των επικίνδυνων ραδιοϊσοτοπικών προσδιορισμών. Τα τελευταία 20 χρόνια, η πιο σημαντική μέθοδος για προσδιορισμούς ενώσεων βιοϊατρικών δεικτών είναι η ραδιοϊσοτοπική λόγω της υψηλής ευαισθησίας της. Με την βελτίωση του επιπέδου ζωής και την οικονομική ανάπτυξη των χωρών, οι άνθρωποι δίνουν μεγαλύτερη σημασία στην προστασία της υγείας των. Ο ραδιοϊσοτοπικός προσδιορισμός έχει πολλά μειονεκτήματα: (α) επικινδυνότητα για τον ανθρώπινο οργανισμό, (β) ρύπανση του περιβάλλοντος, (γ) πολύπλοκα και υψηλής προστασίας όργανα, (δ) μικρό χρόνο ημιζωής των ισοτοπικών αντιδραστηρίων και (ε) μη εύκολη μεταφορά και αποθήκευση. Συγκρίνοντάς την με τις άλλες μη-ραδιοϊσοτοπικές μεθόδους ανίχνευσης, οι Χήμειο- και Βιοφωταυγείς μέθοδοι έχουν υψηλή ευαισθησία. Υπάρχει τάση να αντικατασταθούν οι μέθοδοι ραδιοϊσοτοπικής ανίχνευσης πλήρως από μη-ραδιοϊσοτοπικές και ειδικότερα με τις Χήμειο- και Βιοφωταυγείς.

Το σύστημα Χήμειο- και Βιοφωταύγειας. Πρόσφατα επιτεύγματα στις τεχνικές Χήμειο- και Βιοφωταύγειας μας έδωσαν διάφορα συστήματα ανίχνευσης.

Στο Κεφάλαιο 4 δίνεται μια γενική γνώση γύρω από το πεδίο της διαπίστωσης της διάταξης ακολουθίας βάσεων του DNA, περιλαμβάνοντας την κλασική μέθοδο, την μοντέρνα μέθοδο και τις σχετικές προηγμένες τεχνικές. Ακόμη, περιγράφεται η εφαρμογή της διαπίστωσης της διάταξης ακολουθίας βάσεων του DNA στα πεδία της μεταμόσχευσης μυελού, και στην ταυτοποίηση πατρότητας. Ανασκοπούνται επίσης οι σχετικές τεχνικές HLA τύπωσης ~~τυπώσε~~.

