## ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

## ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

## ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

# ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΕΜΠΕΔΗΣΗΣ ΓΙΑ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΧΡΥΣΟΥ ΚΑΙ ΑΝΘΡΑΚΑ

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΓΙΑΝΝΑΚΑΚΗ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΧΑΝΙΩΤΑΚΗΣ

**НРАКЛЕІО 2020** 

## **UNIVERSITY OF CRETE**

## **DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

## **ENVIRONMENTAL SCIENCE AND ENGINEERING**

## LABORATORY OF ANALYTICAL CHEMISTRY



**MASTER THESIS** 

# DEVELOPMENT OF IMPEDANCE BIOSENSOR FOR CORTISOL BASED ON GOLD AND CARBON SCREEN PRINTED ELECTRODES

EVANGELIA GIANNAKAKI

**THESIS SUPERVISOR: NIKOLAOS CHANIOTAKIS** 

**HERAKLION 2020** 

Στους γονείς μου,

Μύρωνα και Αμαλία

## ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

## Νικόλαος Χανιωτάκης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (Επιβλέπων)

## Δημήτριος Γανωτάκης

Καθηγητής Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης Τμήματος

## Μιχαήλ Παυλίδης

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

#### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης από τον Φεβρουάριο του 2019 μέχρι τον Οκτώβριο του 2020. Πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, με υπεύθυνο εργαστηρίου τον κ. Μιχαήλ Παυλίδη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Νικόλαο Χανιωτάκη για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας με ενθουσιασμό και μεράκι για το συγκεκριμένο ερευνητικό αντικείμενο. Καθοριστική ήταν η συμβολή του με την εμπειρία, την καθοδήγηση και τη μέριμνα που διαθέτει στην επιτυχημένη ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ιωάννη Αλιφραγκή για τη συνεργασία και την καθοδήγηση του, καθώς και την Μαρία Φουσκάκη και τη Δρ. Μαρία Μπελενιώτη για τη συνεργασία, την καθοδήγηση και τη στήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου που είχα την τύχη να συνεργαστώ, τη Φλωρεντία Αλιπράντη και τον υποψ. Δρ. Ιωάννη Μεταξά.

Για την καθοδήγηση και τη συνεργασία θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Μιχαήλ Παυλίδη και όλα τα μέλη της ομάδας του.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, τους καθηγητές Νικόλαο Χανιώτακη, Δημήτριο Γανωτάκη και Μιχαήλ Παυλίδη για τα πολύτιμα σχόλια, τον κόπο και το χρόνο που αφιέρωσαν για την αξιολόγηση της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους ανθρώπους που με στήριξαν και με βοήθησαν με διαφορετικό τρόπο ο καθένας καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής, τα αδέρφια μου Αριστέα, Γιώργο και Μάνο, τις φίλες μου Μαριλένα Ψυχογυίου, Φανή Αλατζόγλου και Πόπη Ταβερναράκη και τον Γιώργο Αλετρά, που με υπομονή, κατανόηση και αγάπη ήταν δίπλα μου όλο αυτό το χρονικό διάστημα δίνοντας μου δύναμη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω του γονείς μου, Μύρωνα και Αμαλία για την αμέριστη συμπαράσταση και τη συνεχή τους υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

## Γιαννακάκη Ευαγγελία

		Τόπος γέννησης: Ηράκλειο Κρήτης
Διεύθυνση:	Καμάρες, Ηρακλείου	<i>Ημ/νία Γέννησης: 28/9/1996</i>
	Ελλάδα, τ.κ. 70002	Υπηκοότητα: Ελληνική
Τηλέφωνο:	+306981388268	Οικ. Κατάσταση: Άναμη
E-mail:	evi.gian28@gmail.com	

## Σπουδές

Οκτώβριος 2018	Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Επιστήμες και Μηχανική		
- Οκτώβριος	Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας,		
2020	Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα		
	<b>Β</b> αθμός πτυχίου: $9.08/10.0$		
Σεπτέμβριος	Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο,		
2014 –	Κρήτη, Ελλάδα		
Οκτώβριος 2018	<ul> <li>Βαθμός πτυχίου: 7.47/10.0</li> </ul>		
Σεπτέμβριος	<b>Γενικό Λύκειο Τυμπακίου</b> , Τυμπάκι Ηρακλείου Κρήτης, Ελλάδα		
2011 - Ιούνιος			
2014			

## Ερευνητική Εμπειρία

Φεβρουάριος	Μεταπτυγιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο				
2019 -	Κοήτης, Εργαστήριο Αγαλυτικής Χημείας, Επιβλέπων καθηνητής κ. Ν.				
Οκτώβριος 2020	Χανιωτάκης				
	<ul> <li>«Ανάπτυξη Βιοαισθητήρα Εμπέδησης για Κορτιζόλη βασισμένος</li> </ul>				
	σε Εκτυπωμένα Ηλεκτρόδια Χρυσού και Άνθρακα».				
Οκτώβριος 2018	Μέλος της ομάδας του Εργαστηρίου Περιβαλλοντικών Χημικών				
- Ιανουάριος	Διεργασιών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.				
2019	Υπεύθυνος καθηγητής κ. Ν. Μιχαλόπουλος				
Σεπτέμβριος	Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας στο Εργαστήριο Υβριδικών				
2017 –	- Νανοδομών στο Ίδρυμά Τεχνολογίας και Έρευνας (ITE), Ινστιτούτο				
Σεπτέμβριος	επτέμβριος Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ (ΙΗΔΛ), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμ				
2018	Κρήτης. Επιβλέπων καθηγητής κ. Σ. Αναστασιάδης				
	<ul> <li>«Μελέτη της Κρυστάλλωσης σε νανοσύνθετα υλικά πολύ</li> </ul>				
	(αιθυλενοξειδίου) με μείγματα ανόργανων νανοπροσθέτων				

## Διδακτική Εμπειρία

Νοέμβριος 2017 – Ιανουάριος 2018	Εκπόνηση της «Πρακτική Άσκηση Διδακτικής Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών» στο Πειραματικό Λύκειο Ηρακλείου. Υπεύθυνος καθηγητής κ. Α. Μαργαρίτης	
Οκτώβριος 2018 – Ιανουάριος 2019	<b>Βοηθός στα προπτυχιακά Εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας ΙΙ</b> , Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Υπεύθυνος κ. Ι. Σαριδάκης	

## Τεχνικές Γνώσεις

Εργασιακές Δεξιότητες	<ul> <li>Ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές (Ποτενσιομετρία, Αμπερομετρία, Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης, Κατασκευή και Ανάπτυξη βιοαισθητήρων)</li> <li>Περίθλαση Ακτίνων-Χ (XRD)</li> <li>Θερμοσταθμική Ανάλυση (TGA)</li> <li>Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)</li> <li>Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)</li> <li>Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζα (GC-MS)</li> <li>Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζα (LC-MS)</li> <li>Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)</li> <li>Φασματοφωτομετρία UV-VIS</li> </ul>
--------------------------	--

### Παρουσιάσεις

30 N	Ιοεμβρίου	Προφορική παρουσίαση στην 7 <sup>η</sup> Ημερίδα Χημείας, Τμήμα Χημείας,	
2019		Πανεπιστήμιο Κρήτης με τίτλο: «Ανάπτυξη ηλεκτροχημικού	
		βιοαισθητήρα κορτιζόλης βασισμένο σε ηλεκτρόδιο χρυσού για την	
	άμεση παρακολούθηση ποιότητας αλιευμάτων».		

#### Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά	Επίπεδο Β2	

## Γνώσεις Υπολογιστών

Δεξιότητες	<ul> <li>Πιστοποιητικό Πληροφορικής και Γνώσεις Η/Υ από το Τμήμα</li> </ul>	
Πληροφορικής	Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.	
	<ul> <li>Microsoft Word; Excel; Power Point; Internet Explorer; Microcal</li> </ul>	
	Origin, Integral	

Συνέδρια και Ι	Ιμερίδες		
30 Ιουνίου	Συνέδριο της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας Πολυμερών, European Polymer		
2019	Congress 2019, Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ (ΙΗΔΛ),		
	Ιδρυμά Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο		
	Κρήτης.		
2017-2019	19°, 20°, 21° Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας. Τμήμα Χημείας		
	Πανεπιστήμιο Κρήτης.		
13 Δεκεμβρίου	1 <sup>η</sup> Ημερίδα Ακαδημαϊκού έτους 2017-2018, «Φαρμακευτικά φυτά: από την		
2017	φύση και την παράδοση στην ιατρική επιστήμη», Πανεπιστήμιο Κρήτης,		
	Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής		

## Σεμινάριο Ασφάλειας

6	Μαρτίου	Σεμινάριο «Ασφάλεια Εργαστηρίου IMBB-ITE», ΙΤΕ, Ηράκλειο, Κρήτη.			
2018		Παρακολούθηση ενοτήτων: Πυρασφάλεια - Ασφαλείς Συνθήκες στους			
		Εργαστηριακούς Χώρους, Ασφαλής Χρήση Χημικών.			

## Άλλες Εμπειρίες

2015-2017	Συμμετοχή σε δραστηριότητες της ομάδας επίδειξης πειραμάτων του	
	Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης.	

## **CURRICULUM VITAE**

## Giannakaki Evangelia

Address:	Kamares, Heraklion, Greece,zip 70 002Birth Year: 28/9/1996		
Phone:	+306981388268	Nationality:	Hellenic (Greek)
E-mail:	evi.gian28@gmail.com		

## Education

October 2018 -	Master's in Analytical chemistry, Environmental Science and
October 2020	Engineering
	Laboratory of Analytical Chemistry, University of Crete, Department of
	Chemistry,
	Heraklion, Crete, Greece
	<ul> <li>Degree grade: 9.08/10</li> </ul>
September 2014	Bachelor in the Department of Chemistry, University of Crete,
– October 2018	Heraklion, Crete, Greece
	<ul> <li>Degree grade 7.47/10</li> </ul>
September 2011	High School diploma, General High School
– June 2014	Tympaki, Heraklion, Crete, Greece

## Laboratory Experience

February 2019 –	Master's thesis, Department of Chemistry, Laboratory of Analytical
October 2020	Chemistry, University of Crete, Greece
	Supervisor prof. N. Chaniotakis
	«Development of Impedance Biosensor for Cortisol based on Gold
	and Carbon Electrodes»
October 2018 -	Team member of the Environmental Chemical Process Laboratory,
January 2019	Department of Chemistry, University of Crete, Greece
-	Prof. N. Michalopoulos
September 2017	Diploma thesis, Department of Chemistry, University of Crete, Laboratory
– September	of Hybrid Nanostructures, Institute of Technology and Research (FORTH),
2018	Institute of Electronic Structure and Laser (IEDL), Department of
	Chemistry, University of Crete, Greece
	Supervisor prof. S. Anastasiadis
	<ul> <li>«Study of Crystallization in Poly (Ethylene Oxide) Nanocomposites</li> </ul>
	with Mixtures of Inorganic Nanoparticles»

## **Technical Experience**

Qualification	<ul> <li>Electroanalytical techniques (Potentiometry, Amperometry,</li> </ul>
	Electrochemical impendace spectroscopy, biosensor construction and
	development)
	<ul> <li>X-ray Diffraction (XRD)</li> </ul>
	<ul> <li>Thermostat Analysis (TGA)</li> </ul>
	<ul> <li>Differential Scanning Calorimetry (DSC)</li> </ul>
	<ul> <li>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</li> </ul>
	<ul> <li>Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS)</li> </ul>
	<ul> <li>Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS)</li> </ul>

1	<ul> <li>Thin Layer Chromatography (TLC)</li> </ul>
	<ul> <li>Mass Spectrometry (MS)</li> </ul>
	<ul> <li>Gas Chromatography - MS (GC-MS)</li> </ul>
	<ul> <li>UV-Vis spectroscopy</li> </ul>
1	<ul> <li>IR, Raman spectroscopy</li> </ul>

## **Teaching Experience**

November 2017 – January 2018	Preparation of the "Practical Teaching of Science and Technology" at the Experimental High School of Heraklion. Managed by Mr. A. Margaritis
October 2018 – January 2019	Assistant in Undergraduate Analytical Chemistry Laboratory II, Department of Chemistry, University of Crete, Greece Managed by Mr. I. Saridakis

Presentations	
30 November	7 <sup>th</sup> Chemistry day, Department of Chemistry, University of Crete, Greece
2019	«Development of Electrochemical Cortisol Biosensor based on Gold
	Electrode for real time Monitoring Fish Stress»

## Languages

LICHON
--------

## **Computer Skills**

B2 level

<ul> <li>University of Crete</li> <li>Knowledge of statistical software programs (Excel) and data analysis (Integral, Origin)</li> </ul>
--

Conferences	
30 June 2019	European Polymer Congress 2019, Institute of Technology and Research
	(FORTH), Institute of Electronic Structure and Laser (IEDL), Department
	of Chemistry, University of Crete
2017-2019	19°, 20°, 21° Postgraduates Conference on Chemistry, Heraklion, Crete,
	Greece
13 December	1st Academic Year Meeting 2017-2018, "Medicinal Plants: From Nature
2017	and Tradition to Medical Science", University of Crete, School of Health
	Science, School of Medicine

## Safety Seminar

6 March 2018	Seminar "Laboratory Safety IMBB-FORTH", FORTH, Heraklion, Crete, Fire Safety - Safe Conditions in Laboratories, Safe Chemical Use

## Other Participations

2015-2017	Participation in open activities of the Department of Chemistry to the
	general public. Member of the Experimental Team of the Department of
	Chemistry, University of Crete

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχο της παρούσης μεταπτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η ανάπτυξη βιοαισθητήρα εμπέδησης σε δυο διαφορετικά υποστρώματα, χρυσού και άνθρακα, για την ανίχνευση των επιπέδων της κορτιζόλης. Αναλυτικότερα, παρουσιάζεται η κατασκευή μη-φαρανταϊκού βιοαισθητήρα σε εκτυπωμένα ηλεκτρόδια (screen printing electrodes) χρυσού και άνθρακα. Ο χρυσός και ο άνθρακας αποτελούν κατάλληλα υποστρώματα για χρήση ως μεταλλάκτες σήματος λόγω της υψηλής αγωγιμότητας και της δυνατότητας ακινητοποίησης του βιομορίου μετά τη χημική τους τροποποίηση. Ως βιομόριο χρησιμοποιείται το μονοκλωνικό αντίσωμα ακινητοποιείται στη χημικά τροποποιημένη επιφάνεια του χρυσού και του άνθρακα μέσω ομοιοπολικής δέσμευσης, μεταξύ των αμινομάδων του αντισώματος με τις καρβοξυλικές ομάδες του υλικού στήριξης. Η ανίχνευση της κορτιζόλης από το μη φαρανταϊκό βιοαισθητήρα βασίζεται στη μεταβολή της χωρητικότητας και της αντίστασης της διεπιφάνειας, η οποία προκύπτει κατά τη δέσμευση της πάνω στην επιφάνεια του τροποποιημένου ηλεκτροδίου.

Για την ανάπτυξη του βιοαισθητήρα αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ενεργότητας του αντισώματος και στη συνέχεια μελετήθηκαν τα στάδια κατασκευής του και η επίδραση διαφορετικών συνθηκών της πειραματικής διαδικασίας στην απόκριση του βιοαισθητήρα κορτιζόλης. Εξετάστηκε η απόκριση του βοαισθητήρα στην κορτιζόλη και τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επαναληψιμότητας κατασκευής του. Ο ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός και η παρακολούθηση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη των βιοαισθητήρων, δείχνουν ότι ο βιοαισθητήρας κορτιζόλης κατασκευάστηκε με επιτυχία στα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια χρυσού και άνθρακα, με τον άνθρακα να αποτελεί καταλληλότερο υπόστρωμα για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα κορτιζόλης με μεγαλύτερη επαναληψιμότητα κατασκευής.

Λέξεις κλειδιά: βιοαισθητήρας εμπέδησης, κορτιζόλη, χρυσός, άνθρακας, εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο, μη φαρανταϊκός βιοαισθητήρας, φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης

#### ABSTRACT

The aim of this thesis was the development of a non-Faradaic impedance biosensor for cortisol, based on gold and carbon screen printed electrodes. Gold and carbon are suitable for electrochemical signal transducers due to their unique electrochemical properties, high conductivity and their ability to immobilize biological element on their chemically modified electrode surface. Cortisol monoclonal antibody is used as a biological element due to its high specificity in cortisol. Antibody was covalently immobilised on the modified electrode surface gold and carbon. The detection of cortisol by the non-Faradaic biosensor is based on the change in the capacitance and resistance at the electrode/electrolyte interface, which occurs when a recognition complex between antibody and cortisol is formated.

For the development of the biosensor, the activity of the antibody was first evaluated and then, the stages of its construction and the effect of different conditions of the experimental process were studied. The response of the biosensor to cortisol and finally, the reproducibility of its construction were examined. The electrochemical characteristics and monitoring of the biosensor response to cortisol were evaluated by an electrochemical method, which was the electrochemical impedance spectroscopy.

The results obtained by this study showed that the cortisol biosensor was successfully fabricated on gold and carbon screen printed electrodes, with the surface of carbon being the most suitable substrate for developing a cortisol biosensor with greater reproducibility during manufacturing.

Key words: impedance biosensor, cortisol, gold, carbon, screen printed electrode, non-Faradaic biosensor, electrochemical impedance spectroscopy

## Περιεχόμενα

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ – ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ1	L4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	. 1
1. Βιοαισθητήρες	. 1
1.1 Ορισμός - Αρχή λειτουργίας	. 1
1.2. Μέθοδοι ακινητοποίησης βιομορίων	. 5
1.3 Βιοαισθητήρες εμπέδησης1	10
1.4 Αναλυτικά χαρακτηριστικά βιοαισθητήρων1	L7
1.5 Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα βιοαισθητήρων1	19
2. Κορτιζόλη	21
2.1 Κορτιζόλη στους ιχθύες2	22
2.2 Μέτρηση της κορτιζόλης2	24
2.3 Βιοαισθητήρες για την ανίχνευση κορτιζόλης2	25
3. Σκοπός μεταπτυχιακής διατριβής2	29
4. Επιλογή υλικών για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα κορτιζόλης	30
4.1 Εκτυπωμένα ηλεκτρόδια	30
4.2 Επιφάνεια άνθρακα3	31
4.3 Επιφάνεια χρυσού3	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΧΡΥΣΟΥ3	35
2.1 Σκοπός	35
2.2 Έλεγχος ενεργότητας αντισώματος κορτιζόλης με ELISA	36
2.2.1 Πειραματική διαδικασία - Αποτελέσματα μέτρησης ενεργότητας του αντισώματος	5 37
2.3 Πειραματική διαδικασία – Αποτελέσματα4	11
2.3.1 Εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού4	11
2.3.2 Σταδία κατασκευής βιοαισθητήρα κορτιζόλης4	11
2.3.3 Παρακολούθηση διαδικασίας κατασκευής βιοαισθητήρα4	13
2.3.4 Έλεγχος απόκρισης βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη5	52
2.4 Συμπεράσματα5	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΑΝΘΡΑΚΑ	52

3.1 Σκοπός	62
3.2 Πειραματική διαδικασία – Αποτελέσματα	63
3.2.1 Εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα	63
3.2.2 Σταδία κατασκευής βιοαισθητήρα κορτιζόλης	63
3.3.3 Παρακολούθηση διαδικασίας κατασκευής βιοαισθητήρα	65
3.3.4 Έλεγχος απόκρισης βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη	70
3.3 Συμπεράσματα	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	79
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	83

## ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ – ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- Ab: Αντίσωμα
- Ag: Αντιγόνο
- EDC: 3-αιθυλο-1-3-διμεθυλοαμινοπροπυλο καρβοδιϊμίδιο
- NHS: Ν-υδροξυηλεκτριμίδιου
- SAMs: Αυτοδιατασσόμενες μονοστοιβάδες
- Rs: Ωμική αντίσταση
- C<sub>dl</sub>: Χωρητικότητα
- Rct: Αντίσταση μεταφοράς φορτίου
- R<sub>p</sub>: Αντίσταση πόλωσης
- W: Στοιχείο Warburg
- CPE: Στοιχείο σταθερής φάσης
- POC: Point of care
- ΠΑΥς: Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
- HPI: Hypothalamus-pituitary-Interrenal tissue
- CRH: Κορτικοτρόπος ορμόνη
- ACTH: Φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη
- LC-MS/MS: Υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας σε σειρά
- GC-MS: Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας
- HPLC: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
- RIA: Ραδιο-ανοσοχημική ανάλυση
- ELISA: Ενζυμική ανοσοπροσρόφηση
- ΑΡ: Αλκαλική φωσφατάση
- pNPP: Φωσφορικό νιτροφαινύλιο
- pNP: p νιτροφαινόλη
- PPAuNPs: Πολυανιλίνη
- GOD: Οξειδάση της γλυκόζης
- QCM: Quartz crystal microbalance
- DSP: dithiobis (succinimidyl propionate)
- SPE: Εκτυπωμένα ηλεκτρόδια
- PVC: Polyvinyl chloride

- NSB: Non-specific binding
- Bo: Maximum binding
- TA: Total activity
- h: Hour
- AchE: Ακετυλοχολινεστεράση
- CV: Κυκλική βολταμετρία
- 11-MUA: 11-καρβόξυ-1-εντεκανοθειόλης
- MES: 2-(N-morpholin) ethanesulfonicacid
- PBS: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων
- EIS: Φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης
- RSD: Τυπική σχετική απόκλιση
- CoPc: Cobalt(II) phthalocyanine

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1. Βιοαισθητήρες

#### 1.1 Ορισμός - Αρχή λειτουργίας

Η μελέτη των βιοαισθητήρων αποτελεί έναν ραγδαία εξελισσόμενο και ταυτόχρονα πολλά υποσχόμενο τομέα έρευνας εξαιτίας της χρήσης τους ως αναλυτικά όργανα για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων χημικών ουσιών. Η ιστορία των βιοαισθητήρων ξεκινά το 1962, όταν ο Clark αναπτύσσει τον πρώτο βιοαισθητήρα γλυκόζης, θέτοντας τις βάσεις για την περαιτέρω εξέλιξη τους<sup>1</sup>. Με την πάροδο του χρόνου οι επιστημονικές προσπάθειες οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων, καινοτόμων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά βιοαισθητήρων, οι οποίοι γνωρίζουν πληθώρα εφαρμογών σε τομείς όπως είναι η χημεία τροφίμων, η χημεία περιβάλλοντος, η ιατρική και η βιομηχανία φαρμάκων. Η ιδιαιτερότητα των βιοαισθητήρων σε σχέση με άλλα αναλυτικά όργανα, οφείλεται στο γεγονός ότι συνδυάζουν την ευαισθησία των χημικών αισθητήρων και την επιλεκτικότητα των βιολογικών μηχανισμών αναγνώρισης<sup>2</sup>.

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση της Θεωρητικής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) ο βιοαισθητήρας ορίζεται ως «μία αυτόνομη και ολοκληρωμένη συσκευή, ικανή να παρέχει ποσοτικές ή ημι-ποσοτικές αναλυτικές πληροφορίες χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης που βρίσκεται σε άμεση επαφή με ένα ηλεκτροχημικό μεταλλάκτη σήματος»<sup>2</sup>.

Οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από δύο βασικά τμήματα, το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης (βιομόριο) και τον ηλεκτροχημικό μεταλλάκτη σήματος (Εικ.1.1). Η γενική αρχή λειτουργίας τους στηρίζεται στην επιλεκτική αλληλεπίδραση του βιομορίου με την προς ανάλυση ουσία και στη μετατροπή της χημικής μεταβολής που προκύπτει, σε αναλυτικό σήμα μέσω του μεταλλάκτη σήματος. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη λειτουργία ενός βιοαισθητήρα είναι το βιομόριο να είναι στενά συνδεδεμένο τόσο με την προς ανάλυση ουσία όσο και με το μεταλλάκτη σήματος<sup>3</sup>.



Εικόνα 1.1: Γενικό διάγραμμα λειτουργίας των βιοαισθητήρων.

#### 1.1.1 Βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης

Το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης είναι ένα βιομόριο, όπως είναι τα ένζυμα, οι πρωτεΐνες, τα αντισώματα, τα κύτταρα και τα νουκλεϊκά οξέα. Βρίσκεται στη διεπιφάνεια του βιοαισθητήρα με το δείγμα και αλληλεπιδρά επιλεκτικά μόνο με την προς ανάλυση ουσία χωρίς να επηρεάζεται από την ύπαρξη παρεμποδιζουσών ουσιών<sup>4</sup>. Ανάλογα με το είδος της αλληλεπίδρασης του βιολογικού μορίου με την προς ανάλυση ουσία προκύπτουν δυο διαφορετικές κατηγορίες βιοαισθητήρων: κατάλυσης και συγγένειας<sup>5</sup>.

#### Βιοαισθητήρες κατάλυσης

Οι βιοαισθητήρες κατάλυσης βασίζονται στην κατάλυση μιας συγκεκριμένης αντίδρασης από το βιομόριο, στην οποία η προς ανάλυση ουσία συμμετέχει είτε ως αντιδρών είτε ως προϊόν. Τα βιομόρια που χρησιμοποιούνται πιο συχνά σε αυτή την κατηγορία βιοαισθητήρων είναι τα ένζυμα (ενζυμικοί βιοαισθητήρες). Τα ένζυμα αποτελούν πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα εξειδικευμένης αναγνώρισης και δέσμευσης ενός συγκεκριμένου υποστρώματος, καταλύοντας την ταχύτερη μετατροπή του στα αντίστοιχα προϊόντα<sup>5,6</sup>.

Οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή σε διάφορους τομείς όπως αυτός της ιατρικής, της κτηνιατρικής, στη βιομηχανία τροφίμων και στην περιβαλλοντική μελέτη. Ο πιο επιτυχημένος εμπορικά βιοαισθητήρας είναι αυτός της γλυκόζης, ο οποίος χρησιμοποιεί ως βιομόριο το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης για την ανίχνευση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα<sup>7</sup>.

#### Βιοαισθητήρες συγγένειας

Στους βιοαισθητήρες συγγένειας τα βιομόρια δεσμεύουν τον αναλύτη σχηματίζοντας σύμπλοκο, λόγω της συμπληρωματικής τους δομής. Η μεγάλη σταθερά δέσμευσης του βιομορίου με τον αναλύτη έχεις ως αποτέλεσμα τη μη-αντιστρεπτή δέσμευσή τους, γεγονός που καθιστά εφικτή την ανίχνευση πολύ μικρών συγκεντρώσεων του αναλύτη. Τα βιομόρια που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι κυρίως τα αντισώματα, τα νουκλεϊκά οξέα και οι υποδοχείς<sup>5</sup>.

Οι βιοαισθητήρες συγγένειας που χρησιμοποιούν αντισώματα (antibody, Ab) ονομάζονται ανοσοαισθητήρες και επιτυγχάνουν εξειδικευμένη δέσμευση και ανίχνευση των αντιγόνων (antigen, Ag). Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες (ανοσοσφαιρίνες) του αμυντικού μηχανισμού των θηλαστικών. Η τρισδιαστάτη δομή των μορίων της ανοσοσφαιρίνης σχηματίζεται από το συνδυασμό δύο βαριών (Η) και δύο ελαφριών (L) πεπτιδικών αλυσίδων και απεικονίζεται με το γράμμα Y<sup>8</sup> (Εικ. 1.2).



**Εικόνα 1.2:** Δομή των αντισωμάτων, η οποία περιλαμβάνει δύο βαριές (Η) και δύο ελαφριές πεπτιδικές αλυσίδες (L)<sup>8</sup>.

Οι ανοσοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μια ποικιλία εφαρμογών με

βάση την αρχή λειτουργίας τους όπως:

- 1. Διάγνωση λοιμώξεων
- 2. Παθογένεια ποικίλων νοσημάτων
- 3. Διάγνωση καρκίνου και στοχευόμενη θεραπεία
- 4. Εκτίμηση αποτελεσματικότητας θεραπευτικής μεθόδου
- 5. Ανίχνευση επιπέδων φαρμάκων
- 6. Μικροβιολογία: Ανίχνευση ιών και βακτηρίων
- 7. Παραγωγή και τον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων
- 8. Κτηνιατρική διάγνωση
- 9. Έλεγχος βιομηχανικών αποβλήτων

- 10. Προσδιορισμός βιομηχανικών (τοξικών) αερίων
- 11. Έλεγχος της ρύπανσης του περιβάλλοντος
- 12. Στρατιωτικές εφαρμογές: Ανίχνευση ουσιών χημικού/βιολογικού πολέμου<sup>7</sup>.

## 1.1.2 Μεταλλάκτης σήματος

Ο μεταλλάκτης σήματος μετατρέπει τις μεταβολές που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση του βιομορίου με τον αναλύτη σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα. Ο κατάλληλος μεταλλάκτης σήματος επιλέγεται ανάλογα με το σήμα που προκύπτει κατά τη βιολογική αναγνώριση και με το είδος των αλλαγών που επέρχονται στο σύστημα. Οι βιοαισθητήρες ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με το μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση: *σε ηλεκτροχημικούς, σε οπτικούς, σε πιεζοηλεκτρικούς και σε θερμικούς*<sup>3,9</sup>.

Στους οπτικούς βιοαισθητήρες, η αναλυτική πληροφορία προκύπτει από την ανίχνευση της αλλαγής στις οπτικές ιδιότητες, είτε του βιομορίου παρουσία του αναλύτη, είτε του ίδιου του αναλύτη.

Στους πιεζοηλεκτρικούς βιοαισθητήρες το βιομόριο βρίσκεται στην επιφάνεια ενός κρυστάλλου. Η αναλυτική πληροφορία προκύπτει από τη μεταβολή της ιδιοσυχνότητας του κρυστάλλου κατά την αλληλεπίδραση του βιομορίου με τον αναλύτη.

Οι θερμικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στο γεγονός ότι πολλές βιοχημικές αντιδράσεις συνοδεύονται με απορρόφηση ή έκλυση θερμότητας. Η αναλυτική πληροφορία προκύπτει από τη μέτρηση της μεταβολής της θερμότητας<sup>3,9</sup>.

#### Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες είναι ευρέως διαδεδομένοι στη χημική ανάλυση εξαιτίας της δυνατότητας τους να μετατρέπουν τη χημική πληροφορία σε ηλεκτρικό σήμα σε ένα μόνο στάδιο. Ο μεταλλάκτης σήματος είναι ηλεκτροχημικός και συνήθως είναι ένα ηλεκτρόδιο<sup>9,10</sup>. Διαχωρίζονται σε τέσσερις υποκατηγορίες: στους αγωγιμομετρικούς, ποτενσιομετρικούς, αμπερομετρικούς και στους βιοαισθητήρες εμπέδησης.

Στους αγωγιμομετρικούς βιοαισθητήρες. μετράται η μεταβολή στον αριθμό, στο φορτίο ή στην κινητικότητα των ιόντων, που παρατηρείται κατά την βιολογική αναγνώριση του αναλύτη.

Στους ποτενσιομετρικούς βιοαισθητήρες, μετράται η διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο σε συνθήκη μηδενικού ρεύματος.

Στους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες, μετράται το ρεύμα που παράγεται κατά την εφαρμογή σταθερού δυναμικού στο ηλεκτρόδιο εργασίας.

Τέλος, στους βιοαισθητήρες εμπέδησης μετράται η μεταβολή της εμπέδησης κατά τη βιολογική αναγνώριση του αναλύτη. Τα χαρακτηριστικά και ο τρόπος λειτουργίας των βιοαισθητήρων εμπέδησης περιγράφονται αναλυτικά σε επόμενη ενότητα<sup>9,10</sup>.

#### 1.2. Μέθοδοι ακινητοποίησης βιομορίων

Η ακινητοποίηση του βιομορίου πάνω στο μεταλλάκτη σήματος είναι απαραίτητο και κρίσιμο βήμα για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Η ακινητοποίηση θα πρέπει να γίνεται με τρόπο ώστε να είναι εφικτή η πρόσβαση του αναλύτη στο βιομόριο αλλά και η διατήρηση της ενεργότητας και της επιλεκτικότητας του βιομορίου<sup>2</sup>. Οι μέθοδοι ακινητοποίησης διαχωρίζονται σε *φυσικές* και χημικές (Σχ. 1.1).

Οι φυσικές μέθοδοι ακινητοποίησης περιλαμβάνουν την προσρόφηση σε στερεό υπόστρωμα, την ενθυλάκωση σε ημιπερατά υλικά και την παγίδευση σε πηκτή πολυμερούς.

Όσον αφορά τις χημικές μεθόδους ακινητοποίησης, πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες είναι η διασταυρούμενη σύνδεση των βιομορίων και η ομοιοπολική σύνδεση σε ενεργοποιημένο φορέα<sup>10,11</sup>.



Σχήμα 1.1: Διαχωρισμός των μεθόδων ακινητοποίησης σε φυσικές και χημικές. Οι φυσικές μέθοδοι ακινητοποίησης περιλαμβάνουν την προσρόφηση, την ενθυλάκωση και την παγίδευση, ενώ οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες χημικές μέθοδοι ακινητοποίησης είναι η διασταυρούμενη σύνδεση και η ομοιοπολική σύνδεση<sup>10</sup>.

# 1.2.1 Φυσικές μέθοδοι ακινητοποίησηςΠροσρόφηση

Η προσρόφηση σε στερεό υπόστρωμα αποτελεί την πιο συνηθισμένη μέθοδο ακινητοποίησης και πραγματοποιείται με την ανάμειξη του βιομορίου με το υλικό στήριξης για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Οι μηχανισμοί προσρόφησης βασίζονται σε ασθενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ του βιομορίου και του φορέα ακινητοποίησης, όπως δυνάμεις Van der Waals, ηλεκτροστατικές ή/και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις (Εικ. 1.3), ενώ κατάλληλα υλικά για την προσρόφηση πρωτεϊνών αποτελούν τα οξείδια μετάλλων, ο άνθρακας, οι ιοντοανταλλακτικές ρητίνες (R4N<sup>+</sup>, R-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) και τα αργιλοπυριτικά υλικά<sup>10</sup>.

#### Ενθυλάκωση σε ημιπερατά υλικά

Κατά την ενθυλάκωση βιομορίων με διάχυση σε ημιπερατές μεμβράνες, τα βιομόρια εγκλωβίζονται σε συγκεκριμένο χώρο εντός του υλικού στήριξης και το περιβάλλον του βιομορίου προσομοιάζεται με διάλυμα (Εικ. 1.3). Ορισμένα υλικά που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι τα νανοσωματίδια ανθρακικού ασβεστίου, τα sol-gel και η πολύ-βινυλαλκοόλη<sup>10,12</sup>.

#### Παγίδευση βιομορίων σε πηκτή πολυμερούς

Τα βιομόρια εμπεριέχονται σε ένα διάλυμα μονομερούς και παγιδεύονται στο τρισδιάστατο πλέγμα που αυτό δημιουργεί με τον πολυμερισμό του (Εικ. 1.3). Ένα βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η περιορισμένη διάχυση των αναλυτών προς τα ακινητοποιημένα βιομόρια, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία βιοαισθητήρων με χαμηλές ταχύτητες αντίδρασης και μεγάλους χρόνους απόκρισης. Κατάλληλα υλικά για την παγίδευση των βιομορίων είναι το πολυακρυλαμίδιο, τα σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου, τα αγώγιμα πολυμερή και η πολυτυραμίνη<sup>10</sup>.



**Εικόνα 1.3:** Σχηματική απεικόνιση των φυσικών μεθόδων ακινητοποίησης των βιομορίων: προσρόφηση, ενθυλάκωση και παγίδευση<sup>7</sup>.

#### 1.2.2 Χημικές μέθοδοι ακινητοποίησης

Στις χημικές μεθόδους ακινητοποίησης, η ακινητοποίηση των βιομορίων πραγματοποιείται μέσω χημικών δεσμών μεταξύ διάφορων δραστικών ομάδων που υπάρχουν στα βιομόρια και κατάλληλων ενεργών ομάδων που υπάρχουν ή δημιουργούνται στο φορέα ακινητοποίησης<sup>10</sup>. Οι χημικές μέθοδοι ακινητοποίησης υποδιαιρούνται σε:

#### Διασταυρούμενη σύνδεση

Με τη μέθοδο της διασταυρούμενης σύνδεσης, τα βιομόρια συνδέονται μεταξύ τους μέσω διλειτουργικών αντιδραστηρίων με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός πρωτεϊνικού πλέγματος (Εικ. 1.4). Τα κυριότερα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι η γλουταραλδεΰδη και το καρβοδιϊμίδιο<sup>10</sup>.

#### Ομοιοπολική σύνδεση

Η ομοιοπολική σύνδεση των βιομορίων πραγματοποιείται σε επιφάνειες ακινητοποίησης είτε απευθείας, είτε έπειτα από ενεργοποίηση των ενεργών ομάδων της επιφάνειας ακινητοποίησης. Η σύνδεση αυτή αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο χημικής ακινητοποίησης για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Ο ομοιοπολικός δεσμός συνήθως σχηματίζεται μεταξύ των δραστικών ομάδων του βιομορίου (καρβοξυλομάδες -COOH, αμινομάδες -NH2, θειολομάδες -SH) και των αντίστοιχων ομάδων του υλικού στήριξης<sup>10</sup> (Εικ.1.4).





Η ενεργοποίηση των ενεργών ομάδων (καρβοξυλομάδες -COOH, αμινομάδες -NH2, υδροξυλομάδες -OH) της επιφάνειας ακινητοποίησης πραγματοποιείται μέσω διλειτουργικών αντιδραστηρίων. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ενεργοποίησης, οι οποίες επιλέγονται ανάλογα με το είδος των ενεργών ομάδων της επιφάνειας ακινητοποίησης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι μέθοδοι του βρωμοκυανίου και του χλωροκυανουριδίου, οι οποίες χρησιμοποιούνται όταν η επιφάνεια ακινητοποίησης φέρει υδροξυλομάδες, η μέθοδος της γλουταραλδεύδης όταν η επιφάνεια ακινητοποίησης φέρει αμινομάδες, ενώ η πιο συνηθισμένη μέθοδος ενεργοποίησης του φορέα ακινητοποίησης, ο οποίος φέρει καρβοξυλικές ομάδες είναι η μέθοδος του καρβοδιϊμιδίου, η οποία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω<sup>10</sup>.

Η ομοιοπολική σύνδεση είναι μια μη αντιστρεπτή διαδικασία και έχει ως αποτέλεσμα τα ακινητοποιημένα βιομόρια να παρουσιάζουν αυξημένη μηχανική αντοχή κατά τη μεταβολή συνθηκών, όπως το pH, ο διαλύτης, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς, ωστόσο, η ίδια μπορεί να προκαλέσει μερική ή ολική απώλεια της αρχικής ενεργότητας των βιομορίων<sup>10,13</sup>.

#### Μέθοδος καρβοδιϊμιδίου

Σε αυτή τη μέθοδο, τα καρβοδιϊμίδια ενεργοποιούν τις καρβοξυλικές ομάδες της επιφάνειας ακινητοποίησης, επιτρέποντας στη συνέχεια τη δημιουργία πεπτιδικού δεσμού μεταξύ των ενεργοποιημένων καρβοξυλικών ομάδων και των αμινομάδων των βιομορίων. Κατάλληλα υλικά για το σκοπό αυτό αποτελούν τα ανθρακικά υλικά, εξαιτίας των καρβοξυλικών ομάδων που φέρουν στην επιφάνεια τους. Μερικά παραδείγματα τέτοιων υλικών είναι οι νανοίνες άνθρακα<sup>14</sup>, το οξείδιο του γραφενίου<sup>15</sup>, τα φουλερένια<sup>16</sup> και οι νανοσωλήνες άνθρακα<sup>17</sup>.

Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο καρβοδιϊμίδιο είναι το 3-αιθυλο-1-(3διμεθυλοαμινοπροπυλο) (C8H17N3, EDC). Οι καρβοξυλικές ομάδες αντιδρούν με το EDC σχηματίζοντας αμινο-ενεργά ενδιάμεσα, τα οποία είναι αρκετά ασταθή κυρίως σε ουδέτερα και αλκαλικά διαλύματα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εύκολη υδρόλυση τους και την αναγέννηση των καρβοξυλομάδων (Εικ. 1.5).



Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση της ακινητοποίησης βιομορίου σε καρβοξυλική επιφάνεια μέσω του καρβοδιϊμιδίου EDC. Η αστάθεια των αμινο-ενεργών ενδιάμεσων κυρίως σε ουδέτερα και αλκαλικά διαλύματα οδηγεί στην υδρόλυση τους<sup>13</sup>.

Εξαιτίας αυτής της αστάθειας, η ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων με EDC γίνεται παρουσία του Ν-υδροξυηλεκτριμίδιου (C4H5NO3, NHS) και έχει ως αποτέλεσμα των σχηματισμό των εστέρων του NHS (Εικ. 1.6). Με το σχηματισμό αυτών αποφεύγεται η υδρόλυση του ασταθούς αμινο-ενεργού ενδιάμεσου.



Εικόνα 1.6. Σχηματική αναπαράσταση της ακινητοποίησης βιομορίου σε καρβοξυλική επιφάνεια μέσω του καρβοδιμιδίου EDC με την παρουσία NHS<sup>13</sup>.

Η σταθερότητα των εστέρων του NHS εξαρτάται από το pH και την περιεκτικότητα σε νερό του μέσου της αντίδρασης. Η αντίδραση ενεργοποίησης έχει ικανοποιητική απόδοση στην περιοχή pH από 4.7 έως 6.0, όπου και διεξάγεται σε χρονικό διάστημα λίγων λεπτών. Ο διαθέσιμος χρόνος για την ακινητοποίηση του βιομορίου στην ενεργοποιημένη επιφάνεια καθορίζεται από τον χρόνο ημιζωής των εστέρων του NHS. Αυτός ο χρόνος εξαρτάται από το pH του διαλύματος ακινητοποίησης και κυμαίνεται από 4 έως 5 ώρες σε pH=7, 1 ώρα σε pH=8 και μόλις 10 λεπτά σε pH=8.6. Η αντίδραση των εστέρων του NHS με τις πρωτοταγείς αμινομάδες ευνοείται σε αλκαλικές τιμές pH. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε λίγα λεπτά σε τιμές pH από 8 έως 8.4 και η όλη πορεία ακινητοποίησης δεν επηρεάζεται από τον βραχύ χρόνο ημιζωής των εστέρων του NHS σε αυτή την περιοχή pH<sup>2,10</sup>.

#### 1.3 Βιοαισθητήρες εμπέδησης

Οι βιοαισθητήρες εμπέδησης αποτελούν εξαιρετικά ευαίσθητες και αξιόπιστες αναλυτικές συσκευές με δυνατότητα ανίχνευσης σε πραγματικό χρόνο. Παρέχουν τη δυνατότητα παρακολούθησης των αλλαγών που λαμβάνουν χώρα στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη, μετρώντας την απόκριση του ρεύματος υπό την εφαρμογή εναλλασσόμενης τάσης μικρού πλάτους<sup>18,19</sup>.

#### 1.3.1 Θεωρητικές αρχές των βιοαισθητήρων εμπέδησης

Η εμπέδηση ενός συστήματος προσδιορίζεται εφαρμόζοντας εναλλασσόμενη τάση μικρού πλάτους και ανιχνεύοντας την απόκριση ρεύματος<sup>20</sup>. Η εμπέδηση (Ζ) είναι ίση με το πηλίκο της εφαρμοζόμενης τάσης (V(t)=V<sub>0</sub>sin(ωt)) προς το παραγόμενο ρεύμα (I(t)=I<sub>0</sub>sin(ωt+φ)) (Εικ. 1.7, Εξ. 1.1).

$$Z(\omega) = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \phi)}$$
 Eξ. 1.1

Όπου V<sub>0</sub> και I<sub>0</sub> είναι τα σήματα μέγιστης τάσης και ρεύματος αντίστοιχα, ω είναι η γωνιακή ταχύτητα (ω=2πf, όπου f είναι η συχνότητα σε Hz), t είναι ο χρόνος και φ είναι η μεταβολή στη γωνία φάσης σε radians<sup>21,10</sup>. Οι μετρήσεις εμπέδησης μπορούν να ληφθούν σε μια συγκεκριμένη συχνότητα ή σε ένα εύρος συχνοτήτων δίνοντας ένα φάσμα εμπέδησης<sup>18</sup>.

Η εμπέδηση εκφράζεται ως μιγαδική ποσότητα (Εικ. 1.7, Εξ. 1.2)

$$Z = Z' + j * (-Z'')$$
 E§. 1.2

όπου j είναι η φανταστική μονάδα (j\*j=-1), Z' είναι το πραγματικό μέρος και -Z'' είναι το φανταστικό μέρος της εμπέδησης<sup>10</sup>.



**Εικόνα 1.7:**a) Μετρήσεις εμπέδησης σε μια συχνότητα. Διαταραχή της ημιτονοειδούς τάσης (πλάτους  $V_0$ ) και της ημιτονοειδούς απόκριση ρεύματος με πλάτος  $I_0$  και με γωνία φάσης φ. b) Η τιμή της εμπέδησης που σχετίζεται με τα δεδομένα από το α) μπορεί να περιγραφεί από το μέγεθος |Z|, την γωνία φάσης φ και το πραγματικό (Z') και το φανταστικό μέρος (-Z'') της εμπέδησης<sup>21</sup>.

Η εμπέδηση είναι μια σύνθετη τιμή η οποία εξαρτάται από πολλαπλούς παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να περιγραφούν είτε από το μέγεθος (|Z|) και τη γωνία φάσης φ, είτε εναλλακτικά ως συνδυασμός του πραγματικού (Z') και του φανταστικού μέρους (-Z'') της εμπέδησης<sup>21</sup>. Το σύστημα που χρησιμοποιείται στην εμπέδηση αποτελείται από τρία ηλεκτρόδια, το ηλεκτρόδιο εργασίας, το ηλεκτρόδιο αναφοράς και το βοηθητικό. Στο ηλεκτρόδιο εργασίας μετριέται η απόκριση του ρεύματος. Η επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας μπορεί να τροποποιηθεί με λειτουργικά μόρια και βιομόρια (πχ αντίσωμα), τα οποία οργανώνονται με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίσουν αυτοδιατασσόμενες μονοστοιβάδες (SAMs) πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου<sup>19</sup>. Όταν ο αναλύτης (π.γ. αντιγόνο) αλληλεπιδρά με την τροποποιημένη επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας μεταβάλλει τις ηλεκτρικές ιδιότητες (π.χ διηλεκτρική σταθερά, αντίσταση) ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη<sup>22</sup>. της διεπιφάνειας То ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιείται για την διατήρηση ενός σταθερού και αναπαραγώγιμου ηλεκτρικού δυναμικού. Το βοηθητικό ηλεκτρόδιο επιτρέπει την ροή ηλεκτρονίων μεταξύ αυτού και του ηλεκτροδίου εργασίας<sup>21</sup>.

Οι βιοαισθητήρες εμπέδησης ταξινομούνται σε δυο κατηγορίες τους φαρανταϊκούς (Faradaic) και τους μη-φαρανταϊκούς/χωρητικούς (non-Faradaic or capacitive), ανάλογα με το αν υπάρχει μεταφορά φορτίου στην διεπιφάνεια ηλεκτροδίουηλεκτρολύτη σχετιζόμενη με την οξειδοαναγωγή<sup>18,19</sup>.

## 1.3.2 Ανάλυση των φασμάτων εμπέδησης χρησιμοποιώντας ισοδύναμα ηλεκτρικά κυκλώματα

Λόγω της πολυπλοκότητας των ηλεκτροχημικών συστημάτων, τα ληφθέντα φάσματα εμπέδησης αναλύονται χρησιμοποιώντας απλοποιημένα ισοδύναμα ηλεκτρικά κυκλώματα. Τα κυκλώματα συνήθως αποτελούνται από στοιχεία όπως αντιστάσεις (R) και πυκνωτές (C), τα οποία αντιπροσωπεύουν τις ανεξάρτητες φυσικοχημικές διεργασίες οι οποίες συμβάλουν στη συνολική συμπεριφορά του συστήματος. Το συνηθισμένο ισοδύναμο απλούστερο και πιο ηλεκτρικό κύκλωμα που γρησιμοποιείται για την ανάλυση των βιοαισθητήρων εμπέδησης είναι το κύκλωμα Randles<sup>18</sup>. Το κύκλωμα Randles ανάλογα με το είδος του βιοαισθητήρα που γρησιμοποιείται (φαρανταϊκός ή μη) αποτελείται από τα παρακάτω στοιγεία: την ωμική αντίσταση (Rs), τη χωρητικότητα (Cd), την αντίσταση μεταφοράς φορτίου (Rct) ή την αντίσταση πόλωσης ( $R_p$ ) και το στοιχείο Warburg (W), στους φαρανταϊκούς<sup>10</sup>.

Η αντίσταση του διαλύματος του ηλεκτρολύτη (R<sub>s</sub>) προκύπτει από την πεπερασμένη αγωγιμότητα των ιόντων στο κύριο διάλυμα και έτσι δεν επηρεάζεται από τη βιολογική αναγνώριση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου<sup>22,21</sup>. Η χωρητικότητα (C<sub>dl</sub>) μεταξύ του ηλεκτροδίου και των ιόντων στο διάλυμα, μπορεί να προκύψει από τον συνδυασμό της χωρητικότητας της επιφάνειας του τροποποιημένου ηλεκτροδίου και της χωρητικότητας της διπλοστοιβάδας λόγω της φόρτισης της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ βιομορίων γίνεται αντιληπτή εξαιτίας είτε της μεταβολής της διηλεκτρικής σταθεράς είτε της αύξησης του πάχους της διηλεκτρικής στοιβάδας στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη. Ένας ηλεκτρολυτικός πυκνωτής αποτελείται από το ηλεκτρόδιο εργασίας, τον ηλεκτρολύτη και το διηλεκτρικό. Το ηλεκτρόδιο εργασίας είναι ένας εκ των δύο οπλισμών του πυκνωτή, ενώ ο ηλεκτρολύτης αντιπροσωπεύει το δεύτερο οπλισμό. Το διηλεκτρικό είναι μια μονωτική στοιβάδα, η οποία αναπτύσσεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και φέρει βιομόριο εξειδικευμένο ως προς έναν αναλύτη με αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση του αναλύτη με το ηλεκτρόδιο εργασίας. Σε ιδανικές συνθήκες η διαμόρφωση αυτή προσομοιάζει τη συμπεριφορά ενός πυκνωτή, ο οποίος αποθηκεύει φορτία και έχει ηλεκτρική χωρητικότητα C, η οποία υπολογίζεται από την εξ. 1.3<sup>10</sup>:

$$C = \frac{\varepsilon_o * \varepsilon * A}{d}$$
 Eξ. 1.3

Όπου:

ε.- διαπερατότητα του κενού (8.85419  $Pf^*m^{-1}$ )

ε- διηλεκτρική σταθερά του μέσου μεταξύ των οπλισμών

Α- επιφάνεια των οπλισμών (m<sup>2</sup>)

d- πάχος (απόσταση) της μονωτικής στοιβάδας (m)

Το στοιχείο Warburg (W) αντιπροσωπεύει την καθυστέρηση που προκύπτει από την διάχυση των ιόντων από τον ηλεκτρολύτη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Αυτή εκτιμάται μόνο σε χαμηλές συχνότητες<sup>22,18</sup>.

#### 1.3.3 Φαρανταϊκοί βιοαισθητήρες

Στην ηλεκτροχημεία οι φαρανταϊκές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τη φυσική μεταφορά των ηλεκτρονίων ή των ιόντων από το ηλεκτρόδιο στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη και αντίστροφα. Οι βιοαισθητήρες εμπέδησης που βασίζονται στην φαρανταϊκή προσέγγιση απαιτούν την προσθήκη ενός οξειδοαναγωγικού ζεύγους στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη. Η επιφάνεια του ηλεκτροδίου καταλύει την αντίδραση του οξειδοαναγωγικού ζεύγους. Η σύνδεση του αναλύτη στο βιομόριο οδηγεί σε μια μεταβολή κατά την ανταλλαγή των ηλεκτρονίων μεταξύ του ηλεκτροδίου και του

οξειδοαναγωγικού ζεύγους. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις παρεμποδίζουν τη φαρανταϊκή αντίδραση με συνέπεια να προκαλούν την αύξηση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου R<sub>ct</sub><sup>10,18</sup>.

Η περιγραφή των φυσικών διεργασιών και των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη πραγματοποιείται μέσω του ισοδύναμου κυκλώματος Randles (Εικ.1.8). Στο κύκλωμα Randles η αντίσταση μεταφοράς φορτίου (Ret) και το στοιχείο Warburg (W) είναι συνδεδεμένα παράλληλα με τη χωρητικότητα της διπλοστοιβάδας (C<sub>dl</sub>), αφού το συνολικό ρεύμα που ρέει διαμέσου του ηλεκτρόδιου εργασίας είναι το άθροισμα των ξεχωριστών συνεισφορών που προέρχονται από τις φαρανταϊκές διαδικασίες και τη φόρτιση της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη. Το σύστημα αυτό είναι συνδεδεμένο σε σειρά με την ωμική αντίσταση (Rs).



**Εικόνα 1.8:** Απεικόνιση κυκλώματος Randles: αποτελείται από μια αντίσταση ( $R_s$ ) σε σειρά με ένα σύστημα που περιέχει την αντίσταση μεταφοράς φορτίου ( $R_{ct}$ ) και το στοιχείο Warburg συνδεδεμένα παράλληλα με έναν πυκνωτή ( $C_{dl}$ )<sup>18</sup>.

Εξαιτίας της τραχύτητας της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, οι ηλεκτρονικές ιδιότητες της διεπιφάνειας δεν μπορούν να περιγραφούν από ένα καθαρά χωρητικό στοιχείο, έτσι ένα στοιχείο σταθερής φάσης (constant phase element, CPE) χρησιμοποιείται συχνά για την αντικατάσταση του C<sub>dl</sub>. Τα δύο στοιχεία του κυκλώματος, R<sub>s</sub> και W αντιπροσωπεύουν τις ιδιότητες του κύριου διαλύματος του ηλεκτρολύτη και τη διάχυση του οξειδοαναγωγικού ζεύγους στο διάλυμα, επομένως δεν επηρεάζονται από την παρουσία βιομορίων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Τα στοιχεία R<sub>ct</sub> και C<sub>dl</sub> εξαρτώνται από τα μονωτικά και διηλεκτρικά χαρακτηριστικά των βιομορίων και αποτελούν τις κύριες παραμέτρους που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της απόκρισης ενός βιοαισθητήρα εμπέδησης<sup>18</sup>.

Το φάσμα εμπέδησης του παραπάνω κυκλώματος παρουσιάζεται με το διάγραμμα Nyquist (Εικ. 1.9), όπου απεικονίζεται το φανταστικό μέρος της εμπέδησης ως προς

το πραγματικό μέρος σε κάθε συχνότητα διέγερσης. Συγκεκριμένα, το διάγραμμα Nyquist περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, ακολουθούμενη από μια ευθεία γραμμή. Η ευθεία γραμμή παρατηρείται σε χαμηλές συχνότητες και αντιπροσωπεύει την καθυστέρηση που προκύπτει από την διάχυση των ιόντων από τον ηλεκτρολύτη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Το ημικύκλιο το οποίο παρατηρείται σε υψηλότερες συχνότητες συνεπάγεται με ένα περιορισμό κατά τη μεταφορά των φορτίων.

Το σχήμα των φασμάτων εμπέδησης ποικίλλει ανάλογα με την ταχύτητα μεταφοράς φορτίου στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη. Το C<sub>dl</sub> μπορεί να υπολογιστεί από τη συχνότητα στο μέγιστο του ημικυκλίου ( $\omega=2\pi f=1/R_{ct}*C_{dl}$ ). Η διάμετρος του ημικυκλίου ισούνται με το R<sub>ct</sub> και η πρώτη τομή του ημικυκλίου με τον άξονα του πραγματικού μέρους σε υψηλές συχνότητες αντιστοιχεί με την R<sub>s</sub> (Εικ. 1.9)<sup>22</sup>.

Σε υψηλές συχνότητες ο πυκνωτής ενεργεί ως βραχυκύκλωμα απομακρύνοντας την αντίσταση  $R_{ct}$  από το κύκλωμα. Επομένως η εμπέδηση του κυκλώματος οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στην  $R_s$ . Αντίθετα, σε πολύ χαμηλές συχνότητες ο πυκνωτής δρα σαν ανοιχτό κύκλωμα, με αποτέλεσμα να παύει η ύπαρξη του στο κύκλωμα και η εμπέδηση του κυκλώματος Randles να είναι ο συνδυασμός των δυο αντιστάσεων  $R_s$  και  $R_{ct}$  σε σειρά (Εικ. 1.9)<sup>10</sup>.



Εικόνα 1.9: Φάσμα εμπέδησης για το κύκλωμα Randles της Εικ. 1.8<sup>10</sup>.

#### 1.3.4 Μη φαρανταϊκοί/χωρητικοί βιοαισθητήρες

Στους μη φαρανταϊκούς βιοαισθητήρες δεν απαιτείται η προσθήκη οξειδοαναγωγικού ζεύγους στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη. Αντίθετα με τους φαρανταϊκους, είναι πιο απλοί και πιο ευνοϊκοί για point of care χρήση ενώ παρέχουν και τη δυνατότητα μέτρησης σε μια μόνο συχνότητα, η οποία σχετίζεται κυρίως με την αλλαγή στην επιφανειακή χωρητικότητα κατά τη διάρκεια δέσμευσης του αναλύτη στο βιομόριο<sup>18</sup>. Η χωρητικότητα προκύπτει όταν ένα ηλεκτρόδιο βυθίζεται σε διάλυμα ηλεκτρολύτη και εφαρμόζεται ένα συγκεκριμένο δυναμικό. Σε αυτή την κατάσταση τα φορτισμένα μόρια και τα δίπολα θα προσανατολιστούν στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίουηλεκτρολύτη, δημιουργώντας την χωρητικότητα της διπλοστοιβάδας, η οποία είναι πολύ ευαίσθητη στις αλλαγές της διεπιφάνειας. Αυτές οι αλλαγές προκύπτουν όταν δεσμεύεται ο αναλύτης (π.χ πρωτεΐνη) πάνω στην επιφάνεια του τροποποιημένου ηλεκτροδίου, μετατοπίζοντας μόρια νερού και ιόντα από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου ή λόγω αλλαγής της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης<sup>21</sup>. Η χωρητικότητα της διεπιφάνειας περιγράφεται ως ο συνδυασμός των χωρητικοτήτων των στρωμάτων από τα οποία αποτελείται. Η χωρητικότητα του μονωτικού στρώματος που δημιουργείται θα πρέπει να είναι όσο το δυνατό υψηλότερη για να επιτρέπει την ανίχνευση αλλαγών στο σύστημα οι οποίες θα προκαλούνται από τη δέσμευση του αναλύτη<sup>21</sup>.

Τα χαρακτηριστικά της εμπέδησης του τροποποιημένου ηλεκτροδίου διερευνούνται μέσω του ισοδύναμου κυκλώματος Randles, το οποίο αποτελείται από μια αντίσταση  $(R_s)$  σε σειρά με ένα σύστημα, το οποίο περιέχει ένα πυκνωτή  $(C_d)$  και την αντίσταση πόλωσης  $(R_p)$  συνδεδεμένα παράλληλα (Εικ.1.10).



**Εικόνα 1.10:** Απεικόνιση κυκλώματος Randles: αποτελείται από μια αντίσταση  $(R_s)$  σε σειρά με ένα σύστημα που περιέχει έναν πυκνωτή  $(C_{dl})$  και μια αντίσταση πόλωσης  $(R_p)$  συνδεδεμένα παράλληλα<sup>10</sup>.

Το φάσμα εμπέδησης του παραπάνω κυκλώματος παρουσιάζεται με το διάγραμμα Nyquist (Εικ. 1.10), το οποίο περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης. Το C<sub>dl</sub> μπορεί να υπολογιστεί από τη συχνότητα στο μέγιστο του ημικυκλίου ( $\omega$ =2πf=1/ R<sub>p</sub>\*C<sub>dl</sub>), ενώ η διάμετρος του ημικυκλίου ισούται με το R<sub>p</sub>. Σε υψηλές συχνότητες η πρώτη τομή του ημικυκλίου με τον άξονα του πραγματικού μέρους αντιστοιχεί στην R<sub>s</sub>(Εικ. 1.10)<sup>22</sup>.

Σε υψηλές συχνότητες ο πυκνωτής ενεργεί ως βραχυκύκλωμα απομακρύνοντας την αντίσταση  $R_p$  από το κύκλωμα, οπότε η εμπέδηση του κυκλώματος οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στην  $R_s$ . Αντίθετα, σε πολύ χαμηλές συχνότητες ο πυκνωτής δρα σαν ανοιχτό κύκλωμα, με αποτέλεσμα να παύει η ύπαρξη του στο κύκλωμα και η εμπέδηση του κυκλώματος Randles να είναι ο συνδυασμός των δυο αντιστάσεων  $R_s$  και  $R_p$  σε σειρά (Εικ. 1.10)<sup>10</sup>.



Εικόνα 1.11: Φάσμα εμπέδησης για το κύκλωμα Randles της Εικ. 1.10<sup>10</sup>.

#### 1.4 Αναλυτικά χαρακτηριστικά βιοαισθητήρων

Η ικανότητα χρήσης ενός βιοαισθητήρα για μια συγκεκριμένη εφαρμογή εξαρτάται από τα αναλυτικά του χαρακτηριστικά, τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω.

#### Καμπύλη βαθμονόμησης

Η καμπύλη βαθμονόμησης ενός βιοαισθητήρα προκύπτει είτε μέσω διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης είτε με τη μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας. Απεικονίζεται με τη γραφική παράσταση του μετρούμενου σήματος σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναλύτη<sup>3,23</sup>.

#### Γραμμικό εύρος

Είναι το εύρος των συγκεντρώσεων στο οποίο η μεταβολή της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου είναι γραμμική ως προς τη συγκέντρωση του αναλύτη. Στους βιοαισθητήρες το γραμμικό εύρος θεωρείται ικανοποιητικό όταν καλύπτει τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους της συγκέντρωσης του αναλύτη<sup>3,23</sup>.

#### Ευαισθησία

Η ευαισθησία προκύπτει από την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης στο γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων του αναλύτη και ορίζεται ως ο λόγος της μεταβολής της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου προς τη συγκέντρωση<sup>3,23</sup>[12].

#### Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης αποτελεί την ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με αξιοπιστία από το βιοαισθητήρα<sup>3,23</sup>.

#### Επιλεκτικότητα

Επιλεκτικότητα είναι η ικανότητα ενός βιοαισθητήρα να αποκρίνεται στον αναλύτη παρουσία άλλων παρεμποδιζουσών ουσιών. Ο προσδιορισμός της πραγματοποιείται με τη μέτρηση της απόκρισης του βιοαισθητήρα στον αναλύτη σε σύγκριση με την αντίστοιχη απόκριση στις ουσίες που παρεμποδίζουν. Εξαρτάται κυρίως από το βιομόριο και το είδος του μεταλλάκτη σήματος<sup>3,23</sup>.

#### Επαναληψιμότητα-αναπαραγωγιμότητα

Η επαναληψιμότητα-αναπαραγωγιμότητα είναι η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, %RSD) μεταξύ των μετρήσεων του ίδιου βιοαισθητήρα ή διαφορετικών βιοαισθητήρων. Διακρίνεται σε επαναληψημότητα μεταξύ των μετρήσεων και σε επαναληψιμότητα κατασκευής των βιοαισθητήρων. Ένας βιοαισθητήρας θεωρείται αξιόπιστο αναλυτικό όργανο όταν έχει %RSD μικρότερο από 10%<sup>3,23</sup>.

#### Σταθερότητα-χρόνος ζωής

Η σταθερότητα ενός βιοαισθητήρα εκφράζεται από το χρονικό διάστημα (t<sub>L</sub>) που απαιτείται για να μειωθεί η ευαισθησία, στο γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων του αναλύτη, κατά ένα συντελεστή 10% (t<sub>L10</sub>) ή 50% (t<sub>L50</sub>) σε συνθήκες αποθήκευσης ή συνεχούς λειτουργίας. Διακρίνεται σε σταθερότητας αποθήκευσης και συνεχούς λειτουργίας<sup>3,23</sup>.

#### Χρόνος απόκρισης

Είναι ο χρόνος που απαιτείται έως ότου η μετρούμενη αναλυτική παράμετρος λάβει το 90% της τελικής της τιμής<sup>3,23</sup>.

#### 1.5 Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα βιοαισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο στην επιστήμη των αισθητήρων καθώς καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, έχουν μεγάλη ευαισθησία, μικρό χρόνο απόκρισης και μικρό κόστος. Επίσης έχουν εξαιρετική απλότητα στην εκτέλεσή τους, απαιτούν μικρή ποσότητα αντιδραστηρίων και δείγματος και παρέχουν μεγάλη εξειδίκευση λόγω του βιομορίου. Επιπροσθέτως παρέχουν τη δυνατότητα συνεχής λειτουργίας και ταυτόχρονου προσδιορισμού διαφορετικών ουσιών στο ίδιο δείγμα, ενώ η δυνατότητα κατασκευής φορητών διατάξεων και χρήσης από μη εξειδικευμένο προσωπικό παρέχει στους βιοαισθητήρες την ικανότητα να λειτουργήσουν ως συστήματα point of care (POC). Τα συστήματα αυτά παρέχουν τη δυνατότητα χρήσης για διαγνωστικές εξετάσεις σε οποιεσδήποτε συνθήκες, αντικαθιστώντας κάποιες από τις παραδοσιακές διαγνωστικές μεθόδους που γίνονται σε μικροβιολογικά εργαστήρια και νοσοκομειακούς χώρους<sup>7</sup>.

Από την άλλη πλευρά, οι βιοαισθητήρες εμφανίζουν ορισμένα προβλήματα τα οποία αφορούν τη σταθερότητα αποθήκευσης και συνεχούς λειτουργίας καθώς και την επαναληψιμότητα κατασκευής τους<sup>24,11</sup>.

Η σταθερότητα αποθήκευσης και συνεχούς λειτουργίας εξαρτάται κυρίως από το χρόνο ζωής του βιομορίου και τους παράγοντες οι οποίοι μπορούν να οδηγήσουν σε μερική ή ολική απώλεια της αρχικής ενεργότητας του. Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες είναι το pH, η θερμοκρασία, ο τρόπος κατασκευής του βιοαισθητήρα και το είδος του μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται<sup>25,26</sup>. Σε μειωμένη επαναληψιμότητα μπορεί να οδηγήσει η τυχαία ακινητοποίηση των βιομορίων πάνω στο υλικό στήριξης<sup>27</sup>, ενώ μπορεί να την επηρεάσει αρνητικά και το pH αλλά και η ιοντική ισχύς του δείγματος<sup>18</sup>.

Οι βιοαισθητήρες εμπέδησης εμφανίζουν ορισμένους τεχνικούς περιορισμούς οι οποίοι μπορούν να περιορίσουν την ευρεία εμπορική χρήση τους, συμπεριλαμβανομένων των πιθανών περιορισμών στην ανίχνευση μικρών αναλυτών, την ευαισθησία σε μη ειδική δέσμευση σε πολύπλοκες μήτρες και τη σταθερότητα

και επαναληψιμότητα στην ακινητοποίηση των βιομορίων στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων<sup>28</sup>. Τα μικρά μόρια (<1000Da) συνήθως προκαλούν πολύ μικρή ανιχνεύσιμη απόκριση, η οποία μπορεί να είναι πολύ δύσκολο να μετρηθεί, ειδικά σε πραγματικά δείγματα στα οποία η συγκέντρωση του αναλύτη μπορεί να είναι πολύ χαμηλή<sup>26</sup>.

Παρά τα μειονεκτήματα που εμφανίζουν, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία βιοαισθητήρες με πληθώρα εφαρμογών σε διάφορους τομείς. Στον τομέα της ιατρικής, οι βιοαισθητήρες βρίσκουν πολλές κλινικές εφαρμογές, όπως είναι η μέτρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης, της λακτάσης, της ουρίας, της κερατίνης, της χοληστερόλης του ουρικού οξέος κλπ., αλλά και στην ανίχνευση καρδιολογικών διαταραχών και ορμονών (π.χ. στεροειδή, κορτιζόλη)<sup>7</sup>. Ακόμη συμβάλλουν και στους περιβαλλοντικούς ελέγχους καθώς μπορούν να ανιχνεύσουν επικίνδυνες για το περιβάλλον ουσίες, όπως είναι τα απόβλητα και οι περιβαλλοντικού ρύποι. Πιο βιοαισθητήρες συγκεκριμένα έγουν κατασκευαστεί για την ανίγνευση παρασιτοκτόνων, γλωροφαινολών, βαρέων μετάλλων και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (ΠΑΥς)<sup>29</sup>. Τέλος, έγουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή και στον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων και της παραγωγής του κρασιού. Όσον αφορά τα τρόφιμα χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ανεπιθύμητων μολυσματικών ουσιών, όπως είναι οι τοξίνες, τα κατάλοιπα αντιβιοτικών, τα αλλεργιογόνα, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί και τα φυτοφάρμακα<sup>30</sup>, ενώ στην παραγωγή του κρασιού χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση της αλκοολικής ζύμωσης, της μηλογαλακτικής ζύμωσης και των πολυφαινολών<sup>31</sup>

20

#### 2. Κορτιζόλη

Η κορτιζόλη (Εικ.2.1) είναι μια στεροειδής ορμόνη, η οποία ανήκει στην κατηγορία των γλυκοκορτικοειδών ορμονών. Είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ζωής και ιδιαίτερα σημαντική για την προστασία του οργανισμού από στρεσσογόνους παράγοντες.



Εικόνα 2.1: Χημική δομή της κορτιζόλης<sup>32</sup>.

Χαρακτηρίζεται ως «ορμόνη του στρες» καθώς εκκρίνεται στο σώμα κατά τη διάρκεια στρεσσογόνων καταστάσεων<sup>33</sup>. Το στρες αποτελεί «έναν φυσικό ή συναισθηματικό παράγοντα που προκαλεί σωματική ή ψυχική ένταση». Οι στρεσσογόνοι παράγοντες μπορεί να είναι εξωτερικοί (από το περιβάλλον, ψυχολογικές ή κοινωνικές καταστάσεις) ή εσωτερικοί (ασθένεια ή από ιατρική διαδικασία). Η απόκριση του οργανισμού σε τέτοιες καταστάσεις περιλαμβάνει πολύπλοκες αντιδράσεις νευρολογικής και ενδοκρινολογικής φύσεως<sup>34</sup>.

Η κορτιζόλη έχει ένα μεγάλο φάσμα δράσεων. Γενικά, η κορτιζόλη διατηρεί τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα, επηρεάζει τη λειτουργία του ΚΝΣ, την καρδιακή λειτουργία κατά τη διάρκεια της ασιτίας και αυξάνει τη συγκέντρωση της γλυκόζης κατά την περίοδο στρες εις βάρος των πρωτεϊνών των μυών. Η κορτιζόλη προστατεύει το σώμα από τις επιδράσεις αυτοτραυματισμού και από τις επικίνδυνες φλεγμονώδεις και άνοσες αποκρίσεις. Επίσης παρέχει ενέργεια για την αντιμετώπιση του στρες αναστέλλοντας την αναπαραγωγική λειτουργία, ενώ έχει και ορισμένες άλλες επιδράσεις, όπως στα οστά, στο δέρμα, στο συνδετικό ιστό, το γαστρεντερικό σωλήνα οι οποίες είναι ανεξάρτητες των λειτουργιών που σχετίζονται με το στρες, όπως φαίνονται και στην Εικ. 2.2<sup>35</sup>.


Εικόνα 2.2: Απεικόνιση δράσεων της κορτιζόλης.

Προβλήματα υγείας μπορούν να προκύψουν είτε από την υπερβολική κυκλοφορία της κορτιζόλης λόγω χρόνιου στρες είτε από παρουσία μειωμένης συγκέντρωσης κορτιζόλης. Υψηλότερα και παρατεταμένα επίπεδα της κορτιζόλης λόγω χρόνιου στρες μπορούν να προκαλέσουν μειωμένη γνωστική απόδοση, μειωμένη θυρεοειδική λειτουργία, αυξομειώσεις του σακχάρου στο αίμα (όπως υπογλυκαιμία), μειωμένη μυϊκή μάζα, διαταραχή ύπνου, αυξημένη αρτηριακή πίεση, μειωμένη ανοσιακή απάντηση και αργή επούλωση τραυμάτων, όπως βέβαια παρόμοια κλινική εικόνα μπορεί να προκληθεί και από τη μειωμένη κυκλοφορία κορτιζόλης σε μακροχρόνια βάση<sup>36</sup>.

Η συμμετοχή της κορτιζόλης σε όλες αυτές τις δράσεις και τα προβλήματα υγείας που μπορούν να προκύψουν είτε από την υπερβολική κυκλοφορία της λόγω χρόνιου στρες είτε από τη μειωμένη παρουσία της, την καθιστούν ένα χρήσιμο δείκτη για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της υγείας του οργανισμού<sup>37</sup>.

#### 2.1 Κορτιζόλη στους ιχθύες

Η κορτιζόλη στους ιχθύες εκκρίνεται στο πλάσμα από τον μεσονεφρικό ιστό δια μέσου του άξονα υποθαλάμου (hypothalamus)-υπόφυσης (pituitary)-μεσονεφρικού ιστού (interrenaltissue) (HPI). Σε αυτό τον άξονα εμπλέκονται ακόμα δυο ορμόνες, η

κορτικοτρόπος ορμόνη (CRH) και η φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη (ACTH)<sup>38</sup> (Εικ. 2.3).



Εικόνα 2.3: Έκκριση κορτιζόλης λόγω στρεσσογόνου παράγοντα (stressor), δια μέσου του άξονα υποθαλάμου (hypothalamus), ο οποίος βρίσκεται στον εγκέφαλο (brain) -υπόφυσης (pituitary) - μεσονεφρικού ιστού (interrenal), στον οποίο εμπλέκεται η κορτικοτρόπος ορμόνη (CRH) και η φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη (ACTH)<sup>39</sup>.

Η αύξηση της κορτιζόλης επιφέρει σημαντικές αλλαγές στο μεταβολισμό και στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων. Σε περιπτώσεις χρόνιου στρες, επιφέρει αλλαγές στον αυξητικό ρυθμό, στην ευαισθησία σε ασθένειες και στην αναπαραγωγή τους<sup>40</sup>. Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες οι οποίοι προκαλούν καταπόνηση (stress) στους ιχθύες και έχουν ως αποτέλεσμα την έκκριση της κορτιζόλης<sup>41,39,42</sup>.

Κάποιοι από τους παράγοντες καταπόνησης είναι: οι ξαφνικές ή ακραίες αλλαγές στο φυσικό τους περιβάλλον (θερμοκρασία, θολότητα, αλατότητα), οι αλληλεπιδράσεις με άλλα ζώα (αρπαγή, παράσιτα, ανάγκη για επιβίωση και κυριαρχία), η ανθρώπινη παρέμβαση συμπεριλαμβανομένων των εφαρμογών στις ιχθυοκαλλιέργειες (τρόπος ψαρέματος, χειρισμός, μεταφορά, συνωστισμός) και η ρύπανση των υδάτων (χαμηλό pH, βαρέα μέταλλα, οργανικές ουσίες)<sup>40</sup>. Η έντονη καταπόνηση (stress) προκαλεί μείωση της ευημερίας των ιχθύων και επηρεάζει την ποιότητα της σάρκας και το χρόνο διατήρησης της νωπότητας μετά τη θανάτωση<sup>43,44,45</sup>.

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές προσεγγίσεις για την περιγραφή και τον ορισμό της ευημερίας των ζώων, η οποία μπορεί να οριστεί ως «η αποφυγή της κατάχρησης και της εκμετάλλευσης των ζώων από τον άνθρωπο, διατηρώντας τα κατάλληλα πρότυπα στέγασης, σίτισης και γενικής φροντίδας, την πρόληψη και τη θεραπεία ασθενειών, καθώς και τη διασφάλιση της ελευθερίας από βασανισμό και μη απαραίτητη ταλαιπωρία και πόνο»<sup>46</sup>.

Για τους παραπάνω λόγους, κρίνεται απαραίτητη η αναζήτηση ενός καλύτερου τρόπου διαχείρισης των ιχθύων, ο οποίος θα τους προσφέρει τις παραπάνω συνθήκες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την εκτίμηση του μεγέθους της καταπόνησης τους. Η εκτίμηση αυτή θα συμβάλει στη διαχείρισή τους με τη μικρότερη δυνατή καταπόνηση και στην ευημερία τους. Η εκτίμηση τους μεγέθους καταπόνησης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη μέτρηση της **κορτιζόλης**, η οποία είναι ένας αξιόπιστος και εύκολα ανιχνεύσιμος δείκτης.

Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης στο πλάσμα μη καταπονημένων ιχθύων (τιμές ηρεμίας) στα περισσότερα είδη, κυμαίνονται μεταξύ 1 έως 10ng/ml, με εξαίρεση το λαβράκι. το οποίο εμφανίζει μεγαλύτερες μέσες συγκεντρώσεις κορτιζόλης, από 50 έως 150ng/ml<sup>47,48</sup>[14]. Έπειτα από οξεία καταπόνηση οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης αυξάνονται γρήγορα, μέσα σε 5 έως 10 λεπτά μετά από την έκθεση, ενώ συνεχίζουν να αυξάνονται, όσο η καταπόνηση επιμένει, φτάνοντας σε 10πλάσιες έως 100πλάσιες τιμές<sup>47</sup>.

# 2.2 Μέτρηση της κορτιζόλης

Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της κορτιζόλης είναι η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας σε σειρά (LC-MS/MS), η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)<sup>49</sup>, η ραδιο-ανοσοχημική ανάλυση (RIA) και η ενζυμική ανοσοπροσρόφηση (ELISA)<sup>8,50</sup>.

Οι μέθοδοι αυτές είναι πολύ ευαίσθητες και ακριβείς, ωστόσο έχουν υψηλό κόστος, είναι πολύπλοκες και χρονοβόρες γιατί το δείγμα συνήθως πρέπει να υποστεί κάποια προεργασία. Παράλληλα δεν είναι δυνατή η εφαρμογή τους για συνεχή (on-line) και άμεση (on-site) παρακολούθηση και ανίχνευση πεδίου (in field) και in vivo αναλύσεις<sup>27,51,10</sup>. Οι μέθοδοι αυτές απαιτούν την αιμοληψία του ιχθύος, διαδικασία η οποία προκαλεί την καταπόνηση του αυξάνοντας τις συγκεντρώσεις κορτιζόλης. Αυτή η καταπόνηση μπορεί να αντιμετωπιστεί μερικώς με τη χρήση αναισθητικού και με τη γρήγορη λήψη του δείγματος<sup>52</sup>. Ωστόσο, με τη διαδικασία της αιμοληψίας, λόγω των χειρισμών και της αναισθησίας μπορεί να επέλθει ο θάνατος<sup>53</sup>. Είναι λοιπόν εμφανής η ανάγκη για νέα οργανολογία, χαμηλού κόστους, με δυνατότητες άμεσης εφαρμογής και συνεχούς παρακολούθησης σε μετρήσεις πεδίου.

#### ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ

Οι παραπάνω απαιτήσεις μπορούν να καλυφθούν με τη χρήση ενός βιοαισθητήρα κορτιζόλης. Η τεχνική αυτή έχει απλή χρήση, χαμηλό κόστος, γρήγορους χρόνους απόκρισης και παρέχει τη δυνατότητα για συνεχή και άμεση, παρακολούθηση και ανίχνευση ουσιών στο πεδίο ενώ με κατάλληλη βελτιστοποίηση δίνει τη δυνατότητα in vivo αναλύσεων<sup>27,51</sup>. Επίσης δεν απαιτεί αιμοληψία καθώς παρέχει τη δυνατότητα μετρήσεων στα βράγχια των ιχθύων, από τα οποία γίνεται η απελευθέρωση της κορτιζόλης στο νερό. Με αυτό τον τρόπο λοιπόν, γίνονται εφικτά τα πειράματα και στους ιχθύες που είναι πολύ μικροί σε μέγεθος ή/και πολύτιμοι για να ληφθεί αίμα<sup>43,44</sup>.

#### 2.3 Βιοαισθητήρες για την ανίχνευση κορτιζόλης

Σε προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες έχουν αναπτυχθεί βιοαισθητήρες για τη μέτρηση των επιπέδων της κορτιζόλης τόσο στους ιχθύες όσο και στον άνθρωπο. Παρακάτω γίνεται ανασκόπηση ορισμένων από αυτούς τους βιοαισθητήρες.

Το 2008 οι Sun et al.<sup>54</sup> κατασκεύασαν ένα βιοαισθητήρα για την ανίχνευση των επιπέδων της κορτιζόλης στο σάλιο. Χρησιμοποίησαν ηλεκτρόδιο χρυσού ως μεταλλάκτη σήματος, στο οποίο ακινητοποίησαν το αντίσωμα της κορτιζόλης μέσω χημικής τροποποίησης. Ο προσδιορισμός της κορτιζόλης βασίστηκε στην χρήση του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση (AP). Πραγματοποιήθηκε ανταγωνιστική ELISA μεταξύ της κορτιζόλης του δείγματος και της κορτιζόλης η οποία ήταν επισημασμένη με το ενζυμο AP. Η επισημασμένη κορτιζόλη ανιχνεύθηκε με την προσθήκη διαλύματος φωσφορικού νιτροφαινυλίου (pNPP). Το pNPP αντιδρά με την αλκαλική φωσφατάση δίνοντας το προϊόν p- νιτροφαινόλη (pNP), το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί με την τεχνική της κυκλικής βολταμετρίας. Το pNP που παράχθηκε χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης για την μέτρηση της κορτιζόλης. Ο βιοαισθητήρας επέδειξε χαμηλό όριο ανίχνευσης αλλά δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για συνεχή παρακολούθηση της κορτιζόλης του σάλιου<sup>55</sup>.

Το 2011 οι Arya et al.<sup>56</sup> κατασκεύασαν ένα βιοαισθητήρα κορτιζόλης χρησιμοποιώντας ως μεταλλάκτη σήματος ηλεκτρόδιο χρυσού, στο οποίο εναπόθεσαν νανοσωματίδια χρυσού και πολυανιλίνη (PPAuNPs). Στην επιφάνεια των PPAuNPs ακινητοποιήθηκε το αντίσωμα της κορτιζόλης μέσω χημικής τροποποίησης. Ο ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός και η παρακολούθηση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της κυκλικής βολταμετρίας. Ο

25

βιοαισθητήρας παρουσίασε γραμμική απόκριση σε ένα εύρος συγκεντρώσεων κορτιζόλης από 1pM έως100nM με καλή ευαισθησία προς την κορτιζόλη<sup>55</sup>.

Το 2013 οι Yamaguchi et al.<sup>57</sup> κατασκεύασαν ένα βιοαισθητήρα για τη μέτρηση των επιπέδων της κορτιζόλης στο σάλιο. Χρησιμοποίησαν ηλεκτρόδιο πλατίνας ως μεταλλάκτη σήματος, στο οποίο ακινητοποιήθηκε το αντίσωμα της κορτιζόλης μέσω χημικής τροποποίησης. Ο προσδιορισμός της κορτιζόλης βασίστηκε στη χρήση του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (GOD). Πραγματοποιήθηκε ανταγωνιστική ELISA μεταξύ της κορτιζόλης του δείγματος και της κορτιζόλης η οποία ήταν ενζυμικά επισημασμένη με το ενζυμο GOD. Με την προσθήκη του διαλύματος γλυκόζης, το ένζυμο GOD καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης, κατά την οποία παράγεται το υδροϋπεροξείδιο. Το υδροϋπεροξείδιο οξειδώνεται με την εφαρμογή κάποιου δυναμικού με αποτέλεσμα την παραγωγή ηλεκτρικού ρεύματος. Η παρακολούθηση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ηλεκτροχημικού αναλυτή. Η παρατηρούμενη αύξηση του ρεύματος σχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με τη συγκέντρωση της κορτιζόλης του δείγματος.

To 2015 οι Wu et al.<sup>27</sup> κατασκεύασαν ένα βιοαισθητήρα για τη μέτρηση των επιπέδων της κορτιζόλης στο πλάσμα των ιχθύων. Χρησιμοποίησαν ως μεταλλάκτη σήματος ηλεκτρόδιο χρυσού, στο οποίο ακινητοποίησαν το αντίσωμα της κορτιζόλης Ο ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός μέσω χημικής τροποποίησης. και η παρακολούθηση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της κυκλικής βολταμετρίας. Ο βιοαισθητήρας παρουσίασε γραμμική απόκριση σε ένα εύρος συγκεντρώσεων κορτιζόλης από 10.3 έως 422.3pg/ml. Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης στο πλάσμα των ιχθύων στα περισσότερα είδη, είναι δεκάδες ή εκατοντάδες ng/ml, επομένως, με βάση το εύρος των συγκεντρώσεων βαθμονόμησης τα δείγματα αραιώθηκαν 1/1000 πριν τη μέτρηση. Το 2017 η ίδια ερευνητική ομάδα<sup>58</sup> προχώρησε στην κατασκευή βιοαισθητήρα για τη μέτρηση των επιπέδων της κορτιζόλης των ιχθύων, χρησιμοποιώντας την ίδια επιφάνεια ακινητοποίησης. Ο βιοαισθητηρας δεν απαιτούσε την αραίωση των δειγμάτων πριν την μέτρηση, καθώς παρουσίαζε γραμμική απόκριση σε ένα εύρος συγκεντρώσεων κορτιζόλης από 1.25 έως 200ng/ml.

Το 2017 οι Pali et al.<sup>59</sup> κατασκεύασαν ένα βιοαισθητήρα για τη μέτρηση των επιπέδων της κορτιζόλης στο πλάσμα των ιχθύων και του περιβάλλοντος νερού.

Χρησιμοποίησαν ως μεταλλάκτη σήματος ηλεκτρόδιο χρυσού, στο οποίο ακινητοποίησαν το αντίσωμα της κορτιζόλης μέσω χημικής τροποποίησης. Η παρακολούθηση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης και της χρήσης μικροζυγού από κρυστάλλους χαλαζία (Quartz crystal microbalance, QCM)<sup>49</sup>, για μετρήσεις σε νανοεπίπεδο.

Το 2017 οι Ainsah et al.<sup>15</sup> κατασκεύασαν ένα βιοαισθητήρα για τη μέτρηση των επιπέδων της κορτιζόλης, χρησιμοποιώντας οξείδιο γραφενίου ως μεταλλάκτη σήματος. Το αντίσωμα της κορτιζόλης ακινητοποιήθηκε στην επιφάνεια του οξειδίου γραφενίου μέσω χημικής τροποποίησης. Ο ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός και η παρακολούθηση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της κυκλικής βολταμετρίας.

Το 2017 οι Kinnamon et al.<sup>56</sup> κατασκεύασαν ένα βιοαισθητήρα για τη μέτρηση των επιπέδων της κορτιζόλης στον ιδρώτα. Χρησιμοποίησαν ως μεταλλάκτη σήματος ημιαγώγιμα nanosheets MoS<sub>2</sub>, τα οποία ήταν προσροφημένα στους πόρους μιας μεμβράνης πολυαμιδίου. Το αντίσωμα της κορτιζόλης ακινητοποιήθηκε στα nanosheets MoS<sub>2</sub> μέσω χημικής τροποποίησης με το διθειο-bis προπιονικό ηλεκτριμίδιο (dithiobis (succinimidyl propionate), DSP). Ο ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός και η παρακολούθηση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης. Ο βιοαισθητήρας παρουσίασε γραμμική απόκριση σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων κορτιζόλης από 1 έως 500ng/mL με όριο ανίχνευσης lng/mL.

Το 2019 οι Sekar et al.<sup>14</sup> κατασκεύασαν ένα βιοαισθητήρα για τη μέτρηση των επιπέδων της κορτιζόλης στον ιδρώτα. Χρησιμοποίησαν ως μεταλλάκτη σήματος αγώγιμη νανοϊνα άνθρακα (carbon yarn), την οποία τροποποίησαν με οξείδια του σιδήρου ΙΙΙ (Fe2O3). Η ακινητοποίηση του αντισώματος της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκε στην επιφάνεια της τροποποιημένης νανοϊνας άνθρακα μέσω χημικής τροποποίησης. Ο ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός και η παρακολούθηση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική της κυκλικής βολταμετρίας. Ο βιοαισθητήρας παρουσίασε γραμμική απόκριση σε ένα εύρος συγκεντρώσεων κορτιζόλης από 1fg έως 1μg και επέδειξε όριο ανίχνευσης 0.005fg/mL.

27

Το 2019 οι Rice et al.<sup>37</sup> κατασκεύασαν ένα βιοαισθητήρα (cortiwatch) για τη μέτρηση των επιπέδων της κορτιζόλης στον ιδρώτα. Πραγματοποιήθηκε εναπόθεση χρυσού σε υπόστρωμα πολυαμιδίου και στη συνέχεια η ακινητοποίηση του αντισώματος της κορτιζόλης στην επιφάνεια του χρυσού, μέσω χημικής τροποποίησης. Η παρακολούθηση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της χρονοαμπερομετρίας. Το cortiwatch χρησιμοποιείται ως ρολόι (Εικ. 2.4) παρέχοντας τη δυνατότητα αυτοπαρακολούθησης του χρήστη, ανιχνεύοντας μικρές ποσότητες ιδρώτα. Συμβάλει στην βελτίωση του τρόπου ζωής του χρήστη ελέγχοντας τον κιρκάδιο του ρυθμό του.



Εικόνα 2.4: Απεικόνιση cortiwatch<sup>37</sup>.

Παρ' όλα αυτά, οι προαναφερθέντες ανοσοαισθητήρες κορτιζόλης που έχουν σχεδιαστεί για άμεση παρακολούθηση και ανίχνευση πεδίου εμφανίζουν κάποιους περιορισμούς, οι οποίοι εμποδίζουν την ευρεία εμπορική χρήση τους. Ο μικρός χρόνος ζωής του βιοαισθητήρα σε θερμοκρασία δωματίου και η μετουσίωση του αντισώματος λόγω περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως είναι οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, η υγρασία, η αλλαγή του pH και η έκθεση στο φως, περιορίζουν την ευρεία εμπορική χρήση τους για μετρήσεις της ημερήσιας κορτιζόλης στο πεδίο<sup>60</sup>. Επιπλέον την ευρεία εμπορική χρήση τους περιορίζει και η μικρή επαναληψιμότητα κατασκευής τους όπως αναλύθηκε στην ενότητα 1.5.

# 3. Σκοπός μεταπτυχιακής διατριβής

Για την ευημερία των ιχθύων και την επιτυχία μιας ιχθυοκαλλιέργειας είναι απαραίτητη η διαχείριση της υγείας των ιχθύων, η οποία επιτυγχάνεται με την αναγνώριση και πρόληψη των καταστάσεων καταπόνησης<sup>43</sup>. Στα πλαίσια της συνεργασίας του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας με το Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων και με τις Ιχθυοκαλλιέργειες Νηρέας γίνεται προσπάθεια για την ανάπτυξη, αξιολόγηση και εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα ενός καινοτόμου συστήματος αλίευσης για θαλασσινά είδη ιχθυοκαλλιέργειας. Αυτό το καινοτόμο σύστημα αλίευσης θα προκαλεί τη μικρότερη δυνατή καταπόνηση των ιχθύων<sup>44</sup>. Ένα πρώτο βήμα σε αυτή την προσπάθεια αποτελεί η ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα κορτιζόλης.

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα εμπέδησης για τη μέτρηση των επιπέδων κορτιζόλης στους ιχθύες. Η έρευνα αυτή αποσκοπεί στην εκτίμηση του βαθμού καταπόνησης των ιχθύων σε βιομηχανικές συνθήκες παραγωγής. Η εκτίμηση αυτή θα συμβάλλει στη διαχείριση τους με τη μικρότερη δυνατή καταπόνηση και στην εύρεση ενός τρόπου θανάτωσης, ο οποίος θα προκαλεί την μικρότερη δυνατή έκκριση κορτιζόλης. Ο βιοαισθητήρας θα παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης των επιπέδων της κορτιζόλης στο πλάσμα των ιχθύων και μακροπρόθεσμα στα βράγχια.

Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ανάπτυξης βιοαισθητήρα κορτιζόλης σε δυο διαφορετικά υποστρώματα, χρυσού και άνθρακα. Τα υποστρώματα αυτά είναι κατάλληλα για χρήση ως μεταλλάκτες σήματος, λόγω της υψηλής αγωγιμότητας και της δυνατότητας ακινητοποίησης του βιομορίου μετά τη χημική τους τροποποίηση. Συγκεκριμένα ως μεταλλάκτες σήματος χρησιμοποιήθηκαν εκτυπωμένα ηλεκτρόδια (screen printing electrodes) χρυσού και άνθρακα, καθώς λόγω των μικρών τους διαστάσεων (π.χ 30x10mm) παρέχουν τη δυνατότητα εφαρμογής για συνεχή, άμεση παρακολούθηση πεδίου και in vivo αναλύσεις. Το βιομόριο, που χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση του αναλύτη ήταν μονοκλωνικό αντίσωμα κορτιζόλης λόγω της υψηλής επιλεκτικότητας του στην κορτιζόλη. Ο ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός και η παρακολούθηση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης.

# 4. Επιλογή υλικών για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα κορτιζόλης

# 4.1 Εκτυπωμένα ηλεκτρόδια

Η ανάπτυξη του φορητού βιοαισθητήρα κορτιζόλης πραγματοποιείται σε εκτυπωμένα ηλεκτρόδια (screen printing electrodes). Τα ηλεκτρόδια αυτά, λόγω των μικρών τους διαστάσεων (π.χ 30x10mm) παρέχουν τη δυνατότητα εφαρμογής για συνεχή, άμεση παρακολούθηση πεδίου και in vivo αναλύσεις, ενώ ταυτόχρονα συνδυάζουν μεγάλη ευκολία στην χρήση τους, μικρό κόστος και απαιτούν μικρή ποσότητα δείγματος.

Τα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια είναι επίπεδα, διαφόρων γεωμετριών και αποτελούνται από αγώγιμες και μονωτικές επιστρώσεις πάνω σε κατάλληλα υλικά στήριξης, όπως PVC (polyvinyl chloride), πολυεστέρας, κεραμικά. Το πάχος τους κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 50-500μm<sup>10</sup>.

Η κατασκευή τους στηρίζεται στην τεχνολογία επίστρωσης πάχους >5μm αγώγιμων, ημιαγώγιμων ή μονωτικών υλικών, με εκτύπωση μέσω πλέγματος (screen printing) (Εικ. 4.1). Το υλικό εκτύπωσης (μελάνι, ink) είναι ένα θιξοτροπικό υλικό κατάλληλου ιξώδους, το οποίο εκτυπώνεται στο υλικό στήριξης υπό πίεση με τη βοήθεια ελαστικού σαρώθρου μέσω ενός πλέγματος-εκμαγείου (screen) με τελικό βήμα τη θερμική επεξεργασία του εκτυπωμένου υλικού<sup>9,10</sup>. Για την κατασκευή ηλεκτροδίων εργασίας (working electrode), αναφοράς (reference electrode) και βοηθητικών ηλεκτροδίων (counter electrode) χρησιμοποιούνται διάφορα μελάνια όπως άνθρακας (carbon), άργυρος (Ag), χρυσός (Au), παλλάδιο(Pd), πλατίνα (Pt), άργυρος/χλωριούχος άργυρος (Ag/AgCl).



Εικόνα 4.1: Κατασκευή εκτυπωμένων ηλεκτρόδιων με την τεχνική της εκτύπωσης μέσω πλέγματος<sup>61</sup>.

Στην Εικ.4.2 απεικονίζεται ένα εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο (29x10mm, πάχους 500μm), το οποίο αποτελείται από άνθρακα ως ηλεκτρόδιο εργασίας (διαμέτρου 4mm) και βοηθητικό ηλεκτρόδιο και από Ag/AgCl ως ηλεκτρόδιο αναφοράς<sup>9,10</sup>.



**Εικόνα 4.2**:. Εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο (29\*10mm, πάχους 500μm) με άνθρακα ως ηλεκτρόδιο εργασίας (διαμέτρου 4mm) και βοηθητικό ηλεκτρόδιο και Ag/AgCl ως ηλεκτρόδιο αναφοράς<sup>62</sup>.

Ορισμένες συσκευές που βασίζονται σε εκτυπωμένα ηλεκτρόδια γνωρίζουν ευρεία εμπορική ανάπτυξη, όπως για παράδειγμα ο αμπερομετρικός ενζυμικός βιοαισθητήρας για τον προσδιορισμό των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα<sup>910</sup>. Ωστόσο η ευρεία χρήση των βιοαισθητήρων ως αξιόπιστων αναλυτικών οργάνων δεν έχει επιτευχθεί στον επιθυμητό βαθμό, λόγω ορισμένων λειτουργικών προβλημάτων τα οποία έχουν περιγραφεί σε προηγούμενη ενότητα<sup>63</sup>.

# 4.2 Επιφάνεια άνθρακα

Ο άνθρακας (carbon, C) αποτελεί ένα από τα πιο ενδιαφέροντα χημικά στοιχεία στη φύση λόγω της ικανότητας του να σχηματίζει δεσμούς με άλλα άτομα άνθρακα, δημιουργώντας μια τεράστια ποικιλία ενώσεων<sup>64</sup>. Από τις πιο γνωστές δομές του άνθρακα είναι οι δυο αλλοτροπικές του μορφές, το διαμάντι και ο γραφίτης (Εικ. 4.3). Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν ανακαλυφθεί πολλές ακόμα αλλοτροπικές του μορφές, όπως τα φουλερένια, τα γραφένια και τα οξείδιά τους, οι νανοσωλήνες άνθρακα, οι νανοϊνες άνθρακα, οι νανοκόκκοι άνθρακα και διάφορες ναναπορώδεις δομές<sup>65,66,16</sup> (Εικ. 4.3).



**Εικόνα 4.3.** Δομή αλλοτροπικών μορφών άνθρακα: διαμάντι, φουλερένια, νανοσωλήνες άνθρακα, γραφίτη, γραφένιο, οξείδια γραφένιου και νανοκώκοι άνθρακα, νανοΐνες άνθρακα<sup>66,67</sup>.

Οι δομές άνθρακα είναι κατάλληλες για την ακινητοποιήση των βιομορίων, εξαιτίας των καρβοξυλικών ομάδων που βρίσκονται στην επιφάνεια τους. Οι καρβοξυλικές ομάδες παρέχουν τη δυνατότητα δημιουργίας πεπτιδικού δεσμού με τις αμινομάδες των βιομορίων. Παράλληλα η μεγάλη ενεργή επιφάνεια και η υψηλή αγωγιμότητα του άνθρακα, τον καθιστούν εξαιρετικό ηλεκτροχημικό μεταλλάκτη σήματος<sup>16,68</sup>.

#### 4.3 Επιφάνεια χρυσού

Ο χρυσός (gold, Au) είναι ένα μέταλλο με μεγάλη ελαστικότητα, ολκιμότητα και μεγάλη ηλεκτρική αγωγιμότητα. Δημιουργεί έναν ειδικό τύπο κρυσταλλικού πλέγματος (ενδοκεντρωμένο κυβικό, face-centred cubic), ο οποίος έχει συγκεκριμένη διαστρωμάτωση επιφανειών<sup>69</sup> (Εικ. 4.4).



Εικόνα 4.4: Κρυσταλλικό πλέγμα χρυσού<sup>70</sup>.

Η υψηλή αγωγιμότητα του χρυσού τον καθιστά εξαιρετικό ηλεκτροχημικό μεταλλάκτη σήματος. Ωστόσο, για να γίνει εφικτή η ακινητοποίηση των βιομορίων στην επιφάνεια του, πρέπει να υποστεί χημική τροποποίηση ώστε να δημιουργηθούν κατάλληλες ενεργές ομάδες. Η χημική αυτή τροποποίηση επιτυγχάνεται με την πρόσδεση μορίων θειολών.

Τα μόρια των θειολών προσδένονται πάνω στο χρυσό λόγω της υψηλής αλληλεπίδρασης του χρυσού με το θείο. Για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων επιλέγονται θειόλες οι οποίες φέρουν κατάλληλες ενεργές ομάδες, όπως είναι οι καρβοξυλομάδες και οι αμινομάδες. Η προσθήκη των θειολών στην επιφάνεια του χρυσού έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αυτοδιατασσόμενων μονοστοιβάδων θειολών (self assempled monolayers, SAMs), οι οποίες είναι κρυσταλλικά χημειοροφημένα υμένια. Τα μόρια προσδένονται στον χρυσό από τις ομάδες των θειολών και οργανώνονται αυθόρμητα με τέτοιο τρόπο, ώστε οι τελικές ενεργές ομάδες να αιωρούνται στην εξωτερική πλευρά της μονοστοιβάδας. Το θείο και η τελική ενεργή ομάδα διαχωρίζονται μεταξύ τους από μια ανθρακική αλυσίδα. Τα μόρια των θειολών είναι διατεταγμένα με κλίση 25-40° και ο προσανατολισμός τους καθορίζεται από την απόσταση του δεσμού Au-S και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων των θειολών (Εικ. 4.5).



Εικόνα 4.5: Προσανατολισμός αυτοδιατασσόμενων μονοστοιβάδων θειολών<sup>71</sup>.

Το πάχος των μονοστοιβάδων βρίσκεται στην κλίμακα των Å και εξαρτάται από το μήκος την ανθρακικής αλυσίδας. Οι μονοστοιβάδες που δημιουργούνται είναι ομοιόμορφες, έχουν σχετικά καλή επαναληψιμότητα και δίνουν τη δυνατότητα τροποποίησης των τελικών ενεργών ομάδων. Η συνολική ποιότητα τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη μορφολογία και την καθαρότητα της επιφάνειας του χρυσού.

Τέλεια καθαρισμένες και ιδανικά επίπεδες επιφάνειες δημιουργούν σταθερές και επαναλαμβανόμενες μονοστοιβάδες θειολών, γεγονός που καθιστά την ανάγκη επιμελούς καθαρισμού της επιφανείας του επιτακτική, πριν την προσθήκη θειολών<sup>10</sup>.

#### 2.1 Σκοπός

Οι βιοαισθητήρες εμπέδησης αποτελούν εξαιρετικά ευαίσθητες συσκευές με δυνατότητα συνεχούς λειτουργίας και ανίχνευσης σε πραγματικό χρόνο, με σχετικά μικρή προ-επεξεργασία του προς ανάλυση δείγματος. Παρέχουν τη δυνατότητα λειτουργίας ως συστήματα point of care (POC) λόγω του μικρού κόστους, της δυνατότητας μικρογραφίας και της εύκολης χρήσης τους, ενώ έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της δυνατότητας ανίχνευσης του αναλύτη χωρίς τη χρήση ιχνηθέτη (label free).

Όπως έχει προαναφερθεί, ένα από τα κατάλληλα υποστρώματα για την ακινητοποίηση των βιομορίων αποτελεί ο χρυσός, καθώς παρέχει τη δυνατότητα ακινητοποίησης τους στην ενεργοποιημένη με θειόλες επιφάνεια του. Επιπλέον, η υψηλή του αγωγιμότητα, τον καθιστά εξαιρετικό ηλεκτροχημικό μεταλλάκτη σήματος.

Σκοπό του παρόντος κεφαλαίου αποτελεί η κατασκευή ενός μη φαρανταϊκού βιοαισθητήρα κορτιζόλης, χρησιμοποιώντας εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού ως μεταλλάκτη σήματος και το αντίσωμα της κορτιζόλης ως βιομόριο. Προτού προχωρήσουμε στην κατασκευή του βιοαισθητήρα και τη χρήση του αντισώματος ως βιομόριο, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ενεργότητας του αντισώματος και εν συνεχεία ακολούθησε μελέτη των σταδίων κατασκευής του βιοαισθητήρα.

Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση του καθαρισμού της επιφάνειας χρυσού με την τεχνική της κυκλικής βολταμετρίας και εξετάστηκε η πρόσδεση των αντίστοιχων μορίων στα στάδια κατασκευής του βιοαισθητήρα. Μελετήθηκε η βελτιστοποίηση της μεθόδου κατασκευής του, εξετάζοντας δυο διαφορετικές παραμέτρους στα στάδια κατασκευής που ακολουθήθηκαν. Εξετάστηκε η απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη, πραγματοποιήθηκε κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης, μελετήθηκε η απόκριση μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου χρυσού στην κορτιζόλη και τέλος, η επαναληψιμότητα κατασκευής του. Τα χαρακτηριστικά και η παρακολούθηση της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη μελετήθηκαν φασματοσκοπίας με την τεχνική της ηλεκτρογημικής εμπέδησης.

35

# 2.2 Έλεγχος ενεργότητας αντισώματος κορτιζόλης με ELISA

Πριν την κατασκευή του βιοαισθητήρα και την ακινητοποίηση του μονοκλωνικού αντισώματος της κορτιζόλης (Abcam), πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ενεργότητας του. Ο προσδιορισμός της ενεργότητας του αντισώματος έγινε με τη μέθοδο της ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (ELISA) χρησιμοποιώντας εμπορική συσκευασία Cortisol ELISA Kit (Cayman)<sup>72</sup>.

Χρησιμοποιήθηκαν οκτώ πηγάδια από ένα πλακίδιο 96 πηγαδιών. Σε αυτά τα πηγάδια ήταν δεσμευμένη σταθερή ποσότητα πολυκλωνικού αντισώματος κατσίκας, εξειδικευμένο στο αντίσωμα της κορτιζόλης. Η χρήση των οκτώ πηγαδιών κατανεμήθηκε ως εξής: δυο χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του υποβάθρου (blank), δυο χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση της μη ειδικής πρόσδεσης του ιχνηθέτη στα πλακίδια (non-specific binding, NSB), τρία χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της ενεργότητας του αντισώματος (maximum binding, Bo) και το όγδοο πηγάδι (total activity, TA) χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της ενεργότητας του ιχνηθέτη (Εικ.2.1).



Εικόνα 2.1: Απεικόνιση των οκτώ πηγαδιών που χρησιμοποιήθηκαν. Δυο χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του υποβάθρου(blank), δύο χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση της μη ειδικής πρόσδεσης του ιχνηθέτη στα πηγάδια (NSB), τρία χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της ενεργότητας του μονοκλωνικού αντισώματος (Bo), ενώ το όγδοο πηγάδι (TA) χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της ενζυμικής ενεργότητας του ιχνηθέτη.

# 2.2.1 Πειραματική διαδικασία - Αποτελέσματα μέτρησης ενεργότητας του αντισώματος

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Cortisol ELISA Kit τα βήματα για τη μέτρηση της ενεργότητας του αντισώματος είναι τα παρακάτω:

<u>1°Βήμα</u>: Προσθήκη 100μl ρυθμιστικού διαλύματος ELISA (ELISA buffer) στα πηγάδια NSB και 50μl στα πηγάδια Bo.

<u>2° Βήμα</u>: Προσθήκη 50μl ιχνηθέτη στις πλάκες NSB και στα πηγάδια Bo. O ιχνηθέτης περιέχει κορτιζόλη επισημασμένη με το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AchE).

<u>3° Βήμα</u>: Προσθήκη 50μl μονοκλωνικού αντισώματος κορτιζόλης συγκέντρωσης 0.02mgr/ml στα πηγάδια Bo. Σε αυτό το βήμα έγινε η πρόσδεση του μονοκλωνικού αντισώματος της κορτιζόλης στο πολυκλωνικό αντίσωμα κατσίκας και πραγματοποιήθηκε και η πρόσδεση της επισημασμένης κορτιζόλης στο αντίσωμα της (Εικ. 2.3). Τα πηγάδια τοποθετήθηκαν στους 4°C για 12h.

<u>4°Βήμα</u>: Πλύση των πηγαδιών με ρυθμιστικό διάλυμα (wash buffer). Με την πλύση επιτεύχθηκε η απομάκρυνση των μη δεσμευμένων μορίων του αντισώματος κορτιζόλης και του ιχνηθέτη.

<u>5°Βήμα</u>: Προσθήκη 200μl αντιδραστηρίου Ellman's στα οκτώ πηγάδια. Το αντιδραστήριο Ellman's αποτελεί υπόστρωμα για την AchE, αποτελείται από την ακετυλοχολίνη και το 5,5΄ διθειο-bis(2-νιτροβενζοικό οξύ). Η AchE καταλύει την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης σε θειοχολίνη. Η μη ενζυματική αντίδραση της θειοχολίνης με το 5,5΄ διθειο-bis (2-νιτροβενζοικό οξύ) δίνει το προϊόν 5-θειο-2νιτροβενζοικό οξύ, το οποίο έχει υψηλή απορρόφηση στα 412nm (Εικ. 2.2, Εικ. 2.3).



**Εικόνα 2.2:** Αντίδραση κατάλυσης από την AchE. Η AchE καταλύει την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης σε θειοχολίνη. Στη συνέχεια ακολουθεί η μη ενζυματική αντίδραση της θειοχολίνης με το 5,5΄ διθειο-bis (2-νιτροβενζοικό οξύ) οξύ δίνοντας το προϊόν 5-θειο-2-νιτροβενζοικο οξύ, το οποίο έχει υψηλή απορρόφηση στα 412 nm<sup>72</sup>.

<u>6°Βήμα</u>: Προσθήκη 5μl ιχνηθέτη στο πηγάδι ΤΑ. Τα πηγάδια τοποθετήθηκαν στους 4°C.

<u>7°Βήμα</u>: Έπειτα από 1h και 30min και 2h και 20min από την προσθήκη του αντιδραστηρίου Ellman's, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 412nm με τη χρήση Φασματοφωτόμετρου UV/VIS (Πιν. 2.1).



Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων μέτρησης της ενεργότητας του αντισώματος: Α) Πηγάδι στο οποίο είναι δεσμευμένο το πολυκλωνικό αντίσωμα κατσίκας και η πρωτεΐνη μπλοκαρίσματος Β) Πηγάδι μετά την προσθήκη του ιχνηθέτη και του αντισώματος της κορτιζόλης Γ) Πηγάδι μετά από πλύση, με την οποία πραγματοποιήθηκε η απομάκρυνση των μη δεσμευμένων μορίων του αντισώματος της κορτιζόλης και του ιχνηθέτη Δ) Ανάπτυξη του πηγαδιού με τη χρήση του αντιδραστηρίου Ellman's<sup>72</sup>.

Πηγάδια:	A (1h και 30min)	A (2h και 20min)
blank	0.151	0.157
blank	0.152	0.157
NSB	0.151	0.156
NSB	0.155	0.161
Bo	0.435	0.552
Bo	0.466	0.613
Bo	0.422	0.552
TA	0.957	1.231

**Πίνακας 1.1**: Τιμές απορρόφησης (A) πηγαδίων blank, NSB, Βο και ΤΑ μετά από 1h και 30min και 2h και 20min από την προσθήκη του αντιδραστηρίου Ellman's.

Όπως έχει γίνει ήδη γνωστό, τα πηγάδια blank χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του υποβάθρου του αντιδραστήριο Ellman's. Η απορρόφηση των πηγαδιών blank αφαιρείται από τις τιμές απορροφήσεις των πηγαδιών NSB, Bo και TA (Πιν. 2.2).

Πίνακας 2.2 Τιμές απορρόφησης (Α) πηγαδιών NSB, Βο και ΤΑ μετά την αφαίρεση της απορρόφηση
του υποβάθρου, 1h και 30min και 2h και 20min από την προσθήκη του αντιδραστηρίου Ellman's.

Πηγάδια:	A (1h και 30min)	A (2h και 20min)
NSB	0	0
NSB	0.003	0.004
Bo	0.283	0.395
Bo	0.314	0.456
Bo	0.271	0.395
TA	0.805	1.074

Όπως φαίνεται και στον Πιν. 2.2 τα πηγάδια NSB δίνουν μηδενική απορρόφηση, γεγονός που συνεπάγεται ότι ο ιχνηθέτης έχει απομακρυνθεί πλήρως από τα πηγάδια. Με αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώνεται ότι το σήμα των πηγαδιών Βο προέρχεται από τη σύνδεση του αντισώματος με τον ιχνηθέτη και όχι από τυχόν τυχαίες αλληλεπιδράσεις του ιχνηθέτη με το πηγάδι.

Το πηγάδι ΤΑ έχει απορρόφηση μεγαλύτερη από 0.5, συνεπώς, το ένζυμο AchE καταλύει την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης του αντιδραστηρίου Ellman's σε θειοχολίνη. Ακολούθως, πραγματοποιείται η μη ενζυματική αντίδραση της

θειοχολίνης με το 5,5΄ διθειο-bis (2-νιτροβενζοικό οξύ) δίνοντας ως προϊόν το 5-θειονιτροβενζοικο οξύ, που έχει υψηλή απορρόφηση στα 412nm. Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών απορρόφησης των τριών πηγαδιών Bo, μετά από 1h και 30min και 2h και 20min από την προσθήκη του αντιδραστηρίου Ellman's παρουσιάζονται στον Πίν. 2.3.

**Πίνακας 2.3** Μέση τιμή απορρόφησης των τριών πηγαδιών Βο μετά από 1h και 30min και 2h και 20min από την προσθήκη του αντιδραστηρίου Ellman's.

	1h και 30min	2h και 20min
Απορρόφηση τριών	0.289±0.023	0.415±0.035
πηγαδιών Βο		

Σύμφωνα με το cortisol ELISA kit το αντίσωμα της κορτιζόλης είναι ενεργό εάν η απορρόφηση των πηγαδιών Βο μετά την αφαίρεση των τιμών blank είναι μεγαλύτερη από τη τιμή 0.3. Όπως φαίνεται και τον Πιν. 2.3, η μέση τιμή απορρόφησης των πηγαδιών Βο μετά από 2h και 20min είναι μεγαλύτερη από την απαιτούμενη τιμή

Με βάση τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι το αντίσωμα είναι ενεργό και έχει υψηλή εζειδίκευση στην κορτιζόλη, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιομόριο για την κατασκευή του βιοαισθητήρα κορτιζόλης.

# 2.3 Πειραματική διαδικασία – Αποτελέσματα

# 2.3.1 Εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία χρησιμοποιείται εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο (3.5\*1cm), το οποίο αποτελείται από χρυσό ως ηλεκτρόδιο εργασίας, με 4mm διάμετρο (DropSens)(Εικ. 2.4).



Εικόνα 2.4: Εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού.

# 2.3.2 Σταδία κατασκευής βιοαισθητήρα κορτιζόλης

Σύμφωνα με προηγούμενα δημοσιευμένες μελέτες<sup>27,15</sup> τα στάδια για την κατασκευή του βιοαισθητήρα είναι τα παρακάτω:

# 1°: Καθαρισμός επιφάνειας ηλεκτροδίου χρυσού

Όπως έχει τονιστεί προηγουμένως, είναι απαραίτητος ο καθαρισμός του χρυσού πριν τη χρήση του<sup>73,27</sup>. Ο καθαρισμός του πραγματοποιήθηκε με κυκλική βολταμετρία (cyclic voltammetry, CV), μέσω της οποίας οξειδώνονται και ανάγονται οι ακαθαρσίες της επιφάνειας του<sup>49</sup>. Χρησιμοποιήθηκε σύστημα τριών ηλεκτροδίων, το οποίο αποτελείται από χρυσό ως ηλεκτρόδιο εργασίας, από Ag/AgCl ως ηλεκτρόδιο αναφοράς και από πλατίνα (Pt) ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο, τα οποία συνδέθηκαν σε ποτενσιοστάτη (PalmSens 4). Τα κυκλικά βολταμογραφήματα ελήφθησαν σε διάλυμα θειικού οξέος συγκέντρωσης 0.5M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) με σάρωση του δυναμικού από 0 έως +1.5V και ταχύτητα σάρωσης 100mV/sec (ως προς Ag/AgCl). Εφαρμόστηκαν 50 κύκλοι κυκλικής βολταμετρίας έως τη σταθεροποίηση των κυκλικών βολταμογραφημάτων<sup>27,15,74</sup>.

#### 2°: Σύνδεση χρυσού με μόρια θειόλης

Σε αυτό το βήμα, πραγματοποιήθηκε εμβάπτιση του ηλεκτροδίου χρυσού σε διάλυμα 11-καρβόξυ-1-εντεκανοθειόλης συγκέντρωσης 1mM (HSCH<sub>2</sub>(CH2)<sub>8</sub>CH<sub>2</sub>COOH, 11-MUA) για 15h. Πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση της επιφάνειας του χρυσού με τα μόρια των θειολών, σχηματίζοντας τις αυτοδιατασσόμενες μονοστοιβάδες θειολών. Τα δυο άκρα, θειόλη και καρβοξυλική ομάδα διαχωρίζονται μεταξύ τους από μια ανθρακική αλυσίδα έντεκα ατόμων άνθρακα. Έπειτα, ακολούθησαν πλύσεις του ηλεκτροδίου με αιθανόλη με σκοπό την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων μορίων θειόλης<sup>10,27</sup>.

# <u>3°: Ενεργοποίηση καρβοξυλικών ομάδων</u>

Η ενεργοποίηση των καρβοξυλικών ομάδων, οι οποίες είναι προσδεμένες πάνω στην επιφάνεια του χρυσού, υλοποιήθηκε με την προσθήκη διαλύματος EDC-NHS (Nαιθυλο-Ν'-3-διμεθυλοαμινοπρόπυλο καρβοδιιμίδιο - Ν-υδροξυηλεκτριμίδιου). Η προσθήκη αυτή έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση των καρβοξυλικών ομάδων μέσω του σχηματισμού των εστέρων του NHS. Μελετήθηκαν δυο διαφορετικοί τρόποι προσθήκης του διαλύματος EDC-NHS. Στον πρώτο τρόπο, τοποθετήθηκαν πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας 15μl διαλύματος EDC-NHS. Αυτό το διάλυμα προκύπτει από την ανάμειξη διαλύματος 0.5M EDC σε ρυθμιστικό MES (100mM 2-(N-morpholin) ethanesulfonicacid, pH=5), με διάλυμα 0.5M NHS σε ρυθμιστικό MES (100mM), σε αναλογία 1:1<sup>15</sup>. Ο δεύτερος τρόπος προσθήκης, περιελάμβανε την εμβάπτιση του ηλεκτροδίου του χρυσού σε 4ml διαλύματος 0.5M EDC σε ρυθμιστικό MES (100mM) και στη συνέχεια την προσθήκη 0.1159gr NHS<sup>60</sup>. Επίσης μελετήθηκε και ο χρόνος επώασης του διαλύματος EDC-NHS πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας, 3 και 5h, για την αποτελεσματικότερη ενεργοποίηση των καρβοξυλικών ομάδων. Έπειτα, ακολούθησαν πλύσεις του ηλεκτροδίου με ακετόνη με σκοπό την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων εστέρων του NHS.

# 4°: Ακινητοποίηση αντισώματος κορτιζόλης

Η ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος κορτιζόλης (10μl) συγκέντρωσης 0.004mg/ml πάνω στην επιφάνεια του χρυσού για 24h<sup>27</sup>. Στην Εικ.2.5 απεικονίζονται τα βήματα κατασκευής του βιοαισθητήρα.



Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση των βημάτων κατασκευής του βιοαισθητήρα. Στο πρώτο βήμα πραγματοποιείται ο καθαρισμός του ηλεκτροδίου του χρυσού με CV -Στο δεύτερο βήμα πραγματοποιείται η ενεργοποίηση του χρυσού με τις ομάδες του 11-MUA -Στο τρίτο βήμα οι καρβοζυλικές ομάδες ενεργοποιούνται με την προσθήκη διαλύματος EDC-NHS σχηματίζοντας τους εστέρες του NHS και τέλος, στο τέταρτο βήμα προστίθεται το αντίσωμα της κορτιζόλης, το οποίο ακινητοποιείται πάνω στις καρβοζυλικές ομάδες.

#### 2.3.3 Παρακολούθηση διαδικασίας κατασκευής βιοαισθητήρα

Σε αυτή την ενότητα πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του καθαρισμού του ηλεκτροδίου χρυσού. Μελετήθηκαν τα στάδια κατασκευής του βιοαισθητήρα με σκοπό την επιβεβαίωση της διαδοχικής πρόσδεσης των μορίων σε κάθε στάδιο και τέλος, εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών συνθηκών της πειραματικής διαδικασίας με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν δυο διαφορετικοί τρόποι προσθήκης και δυο διαφορετικοί χρόνοι επώασης του διαλύματος EDC-NHS.

Οι παραπάνω μελέτες χαρακτηρίστηκαν με την τεχνική της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης (electrochemical impedance spectroscopy, EIS), με τη χρήση ποτενσιοστάτη (PalmSens 4). Ως ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (phosphate-buffered saline, PBS) με pH=7.5, στο οποίο η βιολογική ενεργότητα του αντισώματος διατηρείται. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση εμπέδησης δέκα λεπτά μετά την εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε ρυθμιστικό διάλυμά 0.1M PBS, εφαρμόζοντας εναλλασσόμενη τάση (10mV) σε εύρος συχνοτήτων από 10<sup>5</sup> έως 0.01Hz. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο Ag/AgCl και ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο πλατίνας (Pt).

Με τις ίδιες συνθήκες φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης πραγματοποιήθηκαν όλες οι μετρήσεις που αναφέρονται στο κεφάλαιο. Κάποια

βήματα ελέγχονται μόνο μέσω της αντίστασης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου μετά την τροποποίηση του ενώ κάποια μέσω της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη σε συγκέντρωση 0.1ng/ml.

#### 2.3.3.1 Επίδραση καθαρισμού της επιφάνειας χρυσού

Πριν τη χημική τροποποίηση του χρυσού επιβάλλεται ο καθαρισμός της επιφάνειας του, καθώς όπως έχει γίνει ήδη γνωστό η καθαρότητα της επιφάνειας του θα καθορίσει την ομοιομορφία και την επαναληψιμότητα πρόσδεσης των θειολών και θα συμβάλλει και στην απομάκρυνση των ακαθαρσιών, οι οποίες έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στην επιφάνεια του<sup>10,73,27</sup>.

Ο έλεγχος της επίδρασης του καθαρισμού της επιφάνειας του χρυσού στην πρόσδεση της θειόλης πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση δυο διαφορετικών ηλεκτροδίων (1 και 2). Το ηλεκτρόδιο 1 εμβαπτίστηκε σε διάλυμα 11-MUA χωρίς να καθαριστεί η επιφάνεια του χρυσού, ενώ στο ηλεκτρόδιο 2 πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός με κυκλική βολταμετρία και στη συνέχεια η εμβάπτιση σε διάλυμα 11-MUA. Η πρόσδεση της θειόλης στην επιφάνεια του χρυσού ελέγχθηκε με φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης στα δυο διαφορετικά ηλεκτρόδια (Εικ. 2.6).



Εικόνα 2.6: Σύγκριση των φασμάτων εμπέδησης στα δυο διαφορετικά ηλεκτρόδια: (**n**) Ηλεκτρόδιο 1 (προσθήκη 11-MUA χωρίς καθαρισμό της επιφάνειας χρυσού) (**•**) Ηλεκτρόδιο 2 (καθαρισμός της επιφάνειας χρυσού και προσθήκη 11-MUA). Ο χαρακτηρισμός έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 2.6, το φάσμα της εμπέδησης στο ηλεκτρόδιο 1 δεν περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή, αλλά μια κυρτή γραμμή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, χαρακτηριστική για ένα μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εμβαπτισμένο σε διάλυμα ηλεκτρολύτη. Το φάσμα εμπέδησης της κυρτής γραμμής προκύπτει από ένα ισοδύναμο κύκλωμα που αποτελείται από μια αντίσταση (ωμική αντίσταση) και ένα πυκνωτή σε σειρά<sup>10</sup>. Αυτό συνεπάγεται ότι η διεπιφάνεια που έχει σχηματιστεί μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη οφείλεται στην εμβάπτιση του ηλεκτροδίου του χρυσού στον ηλεκτρολύτη και όχι λόγω της χημικής τροποποίησης<sup>10</sup>. Επομένως, στο ηλεκτρόδιο 1 δεν έχει πραγματοποιηθεί η πρόσδεση των μορίων του 11-MUA.

Αντίθετα, στο ηλεκτρόδιο 2 το φάσμα της εμπέδησης περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, η οποία υποδηλώνει τον μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη σχηματισμό διεπιφάνειας λόγω χημικής τροποποίησης της επιφάνειας του χρυσού. Το φάσμα εμπέδησης της ημικυκλικής περιοχής προκύπτει από ένα ισοδύναμο κύκλωμα Randles, το οποίο αποτελείται από μια αντίσταση ( $R_s$ ) σε σειρά με ένα σύστημα, το οποίο περιέχει ένα πυκνωτή ( $C_{dl}$ ) και την αντίσταση πόλωσης (R<sub>p</sub>) συνδεδεμένα παράλληλα (Εικ.1.10)<sup>10</sup>. Οπότε έχει πραγματοποιηθεί η πρόσδεση των μορίων του 11-MUA στο γρυσό και η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια καθιστά πιο δύσκολη τη μεταφορά φορτίων, προκαλώντας μεταβολή στην εμπέδηση του συστήματος<sup>21,18</sup>. Επομένως, στο ηλεκτρόδιο 2 έχουν προσδεθεί τα μόρια του 11-MUA πάνω στην επιφάνεια του χρυσού ενώ στο ηλεκτρόδιο 1 δεν έχει πραγματοποιηθεί η πρόσδεσή τους.

Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι ο καθαρισμός της επιφάνειας του χρυσού πριν τη χημική του τροποποίηση είναι αναγκαίος για την πρόσδεση των μορίων του 11-MUA<sup>74</sup>.

# 2.3.3.2 Έλεγχος της διαδοχικής πρόσδεσης των μορίων σε κάθε στάδιο κατασκευής του βιοαισθητήρα

Στόχος είναι η επιβεβαίωση της διαδοχικής πρόσδεσης των μορίων του 11-MUA, των εστέρων του NHS και του αντισώματος της κορτιζόλης πάνω στην επιφάνεια του χρυσού. Ο έλεγχος της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης σε μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού και σε

45

ηλεκτρόδιο χρυσού έπειτα από τα διαδοχικά βήματα χημικής του τροποποίησης με μόρια 11-MUA (Au/11-MUA), με διάλυμα EDC-NHS (τοποθέτηση 15μl διαλύματος EDC-NHS πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας για 3h, Au/11-MUA/EDC-NHS) και με αντίσωμα της κορτιζόλης (Au/11-MUA/EDC-NHS/Ab) (Εικ. 2.7).



Εικόνα 2.7: Φάσματα εμπέδησης των υπό μελέτη συστημάτων: (■) μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού και ηλεκτρόδιο χρυσού έπειτα από διαδοχικά βήματα τροποποίησης: (●) εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε διάλυμα 11-MUA (▲) προσθήκη διαλύματος EDC-NHS (▼) προσθήκη αντισώματος κορτιζόλης. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 2.7, το φάσμα της εμπέδησης στο μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού δεν περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή, αλλά μια κυρτή γραμμή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, χαρακτηριστική για ένα μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εμβαπτισμένο σε διάλυμα ηλεκτρολύτη. Επομένως, η διεπιφάνεια που έχει σχηματιστεί οφείλεται στην εμβάπτιση του ηλεκτροδίου στον ηλεκτρολύτη, γεγονός το οποίο αναμενόταν καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί κάποια τροποποιήση στο ηλεκτρόδιο<sup>10</sup>.

Το φάσμα της εμπέδησης στο ηλεκτρόδιο χρυσού μετά τον καθαρισμό της επιφάνειας του και την εμβάπτιση του σε διάλυμα 11-MUA (Au/11-MUA), περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, η οποία υποδηλώνει το σχηματισμό διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη λόγω χημικής τροποποίησης. Αυτό συνεπάγεται ότι έχει πραγματοποιηθεί η πρόσδεση των μορίων του 11-MUA στο χρυσό και η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια καθιστά πιο δύσκολη τη μεταφορά των φορτίων, μεταβάλλοντας την εμπέδηση του συστήματος<sup>21,18</sup>.

Το φάσμα της εμπέδησης στο επόμενο διαδοχικό βήμα της χημικής τροποποίησης του χρυσού, το οποίο περιελάμβανε την προσθήκη του διαλύματος του EDC-NHS (Au/11-MUA/EDC-NHS), περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, με αυξημένη αντίσταση πόλωσης σε σχέση με το φάσμα της εμπέδησης στο προηγούμενο βήμα χημικής τροποποίησης (Au/11-MUA). Η αλλαγή αυτή στο σήμα της εμπέδησης αποδίδεται στο σχηματισμό μιας διαφορετικής διεπιφάνειας, η οποία περιλαμβάνει ένα επιπλέον στρώμα σε σχέση με τη διεπιφάνεια του προηγούμενου βήματος. Επομένως, η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια περιλαμβάνει τα μόρια του 11-MUA ενεργοποιημένα με τους εστέρες του NHS, καθιστώντας πιο δύσκολη τη μεταφορά φορτίων σε σχέση με τη διεπιφάνεια του προηγούμενου βήματος, αυξάνοντας την αντίσταση πόλωσης του συστήματος<sup>21,18</sup>.

Το φάσμα της εμπέδησης στο επόμενο διαδοχικό βήμα της χημικής τροποποίησης του χρυσού, το οποίο περιελάμβανε την προσθήκη του αντισώματος κορτιζόλης (Au/11-MUA/EDC-NHS/Ab), περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, με αυξημένη αντίσταση πόλωσης σε σχέση με τα φάσματα εμπέδησης των προηγούμενων βημάτων χημικής τροποποίησης (Au/11-MUA και Au/11-MUA/EDC-NHS). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια περιλαμβάνει τα μόρια του 11-MUA συνδεδεμένα με το αντίσωμα της κορτιζόλης. Το αντίσωμα είναι ένα μεγάλο βιομόριο με αποτέλεσμα η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια να καθιστά ακόμα πιο δύσκολη τη μεταφορά φορτίων σε σχέση με τις σχηματιζόμενες διεπιφάνειες των προηγούμενων βημάτων χημικής τροποποίησης, αυξάνοντας την αντίσταση πόλωσης του συστήματος<sup>21,18</sup>.

Πραγματοποιήθηκε προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων του μη τροποποιημένου ηλεκτρόδιου χρυσού, με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, σε κύκλωμα το οποίο περιείχε μια αντίσταση ( $\mathbf{R}_s$ ) και ένα πυκνωτή συνδεδεμένα σε σειρά<sup>10</sup>. Στα πειραματικά δεδομένα του ηλεκτροδίου του χρυσού έπειτα από τα διαδοχικά βήματα της χημικής του τροποποίησης, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση σε κύκλωμα Randles, το οποίο αποτελείται από μια αντίσταση ( $\mathbf{R}_s$ ) σε σειρά με ένα σύστημα, το οποίο περιέχει ένα πυκνωτή ( $\mathbf{C}_{dl}$ ) και την αντίσταση πόλωσης ( $\mathbf{R}_p$ ) συνδεδεμένα παράλληλα (Εικ.1.10)<sup>10</sup>. Μέσω της προσομοίωσης προκύπτουν οι τιμές

47

της ωμικής αντίστασης ( $R_s$ ), της αντίστασης πόλωσης ( $R_p$ ) και της χωρητικότητας της διεπιφάνειας ( $C_{dl}$ )(Πιν. 2.4).

Πίνακας 2.4: Αποτελέσματα προσομοίωσης των μετρήσεων εμπέδησης στο μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού και στο ηλεκτρόδιο χρυσού έπειτα από διαδοχικά βήματα τροποποίησης: Au/11-MUA, Au/11-MUA/EDC-NHS και Au/11-MUA/EDC-NHS/Ab.

	Ωμική αντίσταση R <sub>S</sub> (KΩ)	Αντίσταση πόλωσης R <sub>p</sub> (KΩ)	Χωρητικότητα διεπιφάνειας C <sub>dl</sub> (μF)
Μη τροποποιημένο	0.040	-	2.000
ηλεκτρόδιο χρυσού			
Au/11-MUA	0.076	494.6	2.630
Au/11-MUA/EDC-NHS	0.086	848.0	2.951
Au/11-MUA/EDC-NHS/Ab	0.013	2719	2.824

Από τα αποτελέσματα της προσομοίωσης (Πιν. 2.4), επιβεβαιώνεται η αύξηση της αντίστασης πόλωσης στα διαδοχικά βήματα τροποποίησης της επιφάνειας του χρυσού, από το βήμα της εμβάπτισης του ηλεκτροδίου σε διάλυμα 11-MUA (Au-11-MUA) έως το βήμα της προσθήκης του αντισώματος πάνω στην επιφάνεια του χρυσού (Au/11-MUA/EDC-NHS/Ab), γεγονός που επιβεβαιώνει τη δημιουργία μιας διαφορετικής διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη σε κάθε βήμα<sup>21,18</sup>.

Συνοψίζοντας, σε κάθε στάδιο κατασκευής του βιοαισθητήρα γίνεται διαδοχική προσθήκη πάνω στην επιφάνεια του χρυσού των μορίων του 11-MUA, των εστέρων τους NHS και του αντισώματος της κορτιζόλης, επομένως επιτεύχθηκε η επιτυχής πρόσδεση των μορίων κατά τα διαδοχικά στάδια κατασκευής του βιοαισθητήρα<sup>75,10</sup>.

# 2.3.3.3 Βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών

Μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συνθηκών της πειραματικής διαδικασίας στην απόκριση του βιοαισθητήρα κορτιζόλης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος δυο διαφορετικών χρόνων επώασης και δυο διαφορετικών τρόπων προσθήκης του διαλύματος EDC-NHS. Ο έλεγχος υλοποιήθηκε μέσω της απόκρισης του βιοαισθητήρα σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1ng/ml.

#### Έλεγχος χρόνου επώασης διαλύματος EDC-NHS

Η επίδραση του χρόνου επώασης του διαλύματος EDC-NHS πάνω στο ηλεκτροδίου εργασίας ελέγχθηκε σε δυο διαφορετικούς βιοαισθητήρες (1 και 2). Μετά την πρόσδεση της θειόλης στην επιφάνεια χρυσού τοποθετήθηκαν πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας 15μl διαλύματος EDC-NHS για 3h (βιοαισθητήρας 1) και για 5h (βιοαισθητήρας 2). Οι υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν στους δυο βιοαισθητήρες παρέμειναν σταθερές. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις εμπέδησης χωρίς την προσθήκη κορτιζόλης και σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1ng/ml στους δύο βιοαισθητήρες (Εικ. 2.8).



Εικόνα 2.8: Φάσματα εμπέδησης των δυο διαφορετικών βιοαισθήτηρων Α) βιοαισθητήρας 1 (επώαση του διαλύματος EDC-NHS για 3h) B) βιοαισθητήρας 2 (επώαση του διαλύματος EDC-NHS για 5h): (■, ▲): χωρίς την προσθήκη κορτιζόλης (■, ▲): σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1ng/ml. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 2.8, οι κύριες αλλαγές στην εμπέδηση του συστήματος συμβαίνουν σε χαμηλές συχνότητες<sup>75</sup>, έτσι επιλέχθηκε η συχνότητα 0.03Hz για τη σύγκριση των δυο βιοαισθητήρων. Στο βιοαισθητήρα 1 η διαφορά του φανταστικού μέρους της εμπέδησης (-Z´´) σε συχνότητα 0.03Hz, χωρίς την προσθήκη κορτιζόλης και σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1ng/ml, είναι  $\Delta$ (-Z´´)=1046-956.5=**89.5KOhm**, ενώ στο βιοαισθητήρα 2 η αντίστοιχη διαφορά του φανταστικού μέρους της εμπέδησης (-Z´´) σε συχνότητα 0.03Hz, είναι  $\Delta$ (-Z´´)=1263-1236=**27KOhm**.

Συμπεραίνουμε ότι στο βιοαισθητήρα 1 έχουν προσδεθεί περισσότερα μόρια κορτιζόλης σε σχέση με το βιοαισθητήρα 2. Συνεπώς, στο βιοαισθητήρα 1 έχει προηγηθεί και η πρόσδεση περισσότερων αντισωμάτων κορτιζόλης, η οποία υποδηλώνει ότι έχει προηγηθεί και η πρόσδεση περισσότερων εστέρων του NHS στην τροποποιημένη με θειόλες επιφάνεια χρυσού. Αυτό υποδεικνύει ότι στην τροποποιημένη επιφάνεια του βιοαισθητήρα 2 υπήρχαν λιγότεροι εστέρες του NHS, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην υδρόλυση ορισμένων εστέρων του NHS στις 5h επώασης του διαλύματος EDC-NHS.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι ο βιοαισθητήρας 1, στον οποίο πραγματοποιήθηκε για 3h επώαση του διαλύματος EDC-NHS πάνω στο ηλεκτρόδιο χρυσού, εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην κορτιζόλη σε σχέση με το βιοαισθητήρα 2, στον οποίο πραγματοποιήθηκε για 5h επώαση του διαλύματος EDC-NHS. Επομένως ο βέλτιστος χρόνος επώασης του διαλύματος EDC-NHS στο ηλεκτρόδιο του χρυσού για την κατασκευή του βιοαισθητήρα είναι οι 3h.

### Έλεγχος τρόπου προσθήκης διαλύματος EDC-NHS

Η επίδραση του τρόπου προσθήκης του διαλύματος EDC-NHS ελέγχθηκε σε δυο διαφορετικούς βιοαισθητήρες (1 και 3). Στο βιοαισθητήρα 1 τοποθετήθηκαν πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας 15μl διαλύματος EDC-NHS (για 3h). Αυτό το διάλυμα προκύπτει από την ανάμειξη διαλύματος 0.5M EDC σε ρυθμιστικό MES (100mM), με διάλυμα 0.5M NHS σε ρυθμιστικό MES (100mM), σε αναλογία 1:1. Αντίθετα, στο βιοαισθητήρα 3, πραγματοποιήθηκε η εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε 4ml διαλύματος 0.5M EDC σε ρυθμιστικό MES (100mM) και στη συνέχεια προσθήκη 0.1159gr NHS (για 3h). Οι υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν στους δυο βιοαισθητήρες παρέμειναν σταθερές. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις εμπέδησης χωρίς την προσθήκη κορτιζόλης και σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1ng/ml στους δύο βιοαισθητήρες (Εικ. 2.9).



**Εικόνα 2.9:** Φάσματα εμπέδησης των δυο διαφορετικών βιοαισθήτηρων A) βιοαισθητήρας 1 (τοποθέτηση 15μl διαλύματος EDC-NHS στο WE) B) βιοαισθητήρας 3 (εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε διάλυμα EDC και προσθήκη 0.1159gr NHS): (**•**,•): χωρίς την προσθήκη κορτιζόλης (**•**,•): σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1ng/ml. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 2.9, οι κύριες αλλαγές στην εμπέδηση του συστήματος συμβαίνουν σε χαμηλές συχνότητες<sup>75</sup>, έτσι επιλέχθηκε η συχνότητα 0.03Hz για την σύγκριση των δυο βιοαισθητήρων<sup>75</sup>. Στο βιοαισθητήρα 1, όπως υπολογίστηκε παραπάνω, η διαφορά του φανταστικού μέρους της εμπέδησης (-Z΄) σε συχνότητα 0.03Hz, είναι **89.5KOhm**. Όσον αφορά το βιοαισθητήρα 3 η διαφορά του φανταστικού μέρους της ευπέδησης την προσθήκη κορτιζόλης και σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1ng/ml, είναι Δ(-Z΄)=696.5-503.2=**193.3KOhm**.

Συμπεραίνουμε ότι στο βιοαισθητήρα 3 έχουν προσδεθεί περισσότερα μόρια κορτιζόλης σε σχέση με το βιοαισθητήρα 1. Αυτό συνεπάγεται ότι στο βιοαισθητήρα 3 έχει προηγηθεί και η πρόσδεση περισσότερων αντισωμάτων κορτιζόλης, η οποία υποδηλώνει ότι έχει προηγηθεί και η πρόσδεση περισσότερων αντισωμάτων κορτιζόλης, η οποία υποδηλώνει ότι έχει προηγηθεί και η πρόσδεση περισσότερων εστέρων του NHS στην τροποποιημένη με θειόλες επιφάνεια χρυσού, σε σχέση την τροποποιημένη επιφάνεια του βιοαισθητήρα 1. Αυτό σημαίνει ότι στην τροποποιημένη επιφάνεια του βιοαισθητήρα 3 υπήρχαν περισσότεροι εστέρες του NHS, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στη περίσσεια του EDC-NHS.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι ο βιοαισθητήρας 3, στον οποίο πραγματοποιήθηκε η εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε 4ml διαλύματος EDC σε

ρυθμιστικό MES και στη συνέχεια προσθήκη 0.1159gr NHS, εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην κορτιζόλη σε σχέση με το βιοαισθητήρα 1, στον οποίο τοποθετήθηκαν πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας 15μl διαλύματος EDC-NHS. Ο βέλτιστος τρόπος προσθήκης λοιπόν, του διαλύματος EDC-NHS στο ηλεκτρόδιο του χρυσού είναι η εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε 4ml διαλύματος 0.5M EDC σε ρυθμιστικό MES και στη συνέχεια προσθήκη 0.1159gr NHS.

#### 2.3.4 Έλεγχος απόκρισης βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη

#### 2.3.4.1 Επιβεβαίωση της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη

Αρχικά, επιβεβαιώθηκε η απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη, ο οποίος είχε κατασκευαστεί με τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε εμπέδηση και σύγκριση της απόκρισης του βιοαισθητήρα με αυτήν ενός μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου χρυσού, σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1ng/ml (Εικ. 2.10).



**Εικόνα 2.10:**Φάσματα εμπέδησης σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1 ng/ml: (**■**) βιοαισθητήρα κορτιζόλης (•) μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου χρυσού. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 2.10, το φάσμα της εμπέδησης στο μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο δεν περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή, αλλά μια κυρτή γραμμή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, χαρακτηριστική για ένα μη

τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εμβαπτισμένο σε διάλυμα ηλεκτρολύτη. Αυτό συνεπάγεται ότι η διεπιφάνεια που έχει σχηματιστεί μεταξύ ηλεκτροδίουηλεκτρολύτη οφείλεται στην εμβάπτιση του ηλεκτροδίου χρυσού στον ηλεκτρολύτη και όχι λόγω χημικής τροποποίησης<sup>10</sup>. Επομένως, το μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού δεν αποκρίνεται στην κορτιζόλη.

Αντίθετα, το φάσμα της εμπέδησης του βιοαισθητήρα περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, η οποία υποδηλώνει τη δημιουργία διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη λόγω χημικής τροποποίησης της επιφάνειας του χρυσού. Η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια μεταβάλλει την εμπέδηση του συστήματος υποδηλώνοντας την πρόσδεση της κορτιζόλης στην τροποποιημένη με το αντίσωμα επιφάνεια χρυσού<sup>21,18</sup>.

Ο βιοαισθητήρας λοιπόν αποκρίνεται με επιτυχία στην κορτιζόλη μεταβάλλοντας την εμπέδηση του συστήματος κατά την ακινητοποίηση της κορτιζόλης στην τροποποιημένη επιφάνεια του βιοαισθητήρα.

### 2.3.4.2 Κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της απόκρισης του βιοαισθητήρα, ο οποίος κατασκευάστηκε με τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, σε συγκεντρώσεις κορτιζόλης στο εύρος 0.1 έως 10ng/ml. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν προσθήκες διαφορετικών ποσοτήτων 2μl, 50μl, 100μl και 200μl πρότυπου διαλύματος κορτιζόλης με συγκέντρωση 1μg/ml, σε 20ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.1M PBS, οι οποίες αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις κορτιζόλης 0.1, 2.5, 5 και 10ng/ml αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκε εμπέδηση σε κάθε διαφορετική συγκέντρωση κορτιζόλης.

Ακολούθησε προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων του βιοαισθητήρα στις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις της κορτιζόλης (0.1, 2.5, 5 και 10ng/ml), με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, σε κύκλωμα Randles το οποίο αποτελείται από μια αντίσταση ( $R_s$ ) σε σειρά με ένα σύστημα, το οποίο περιέχει ένα πυκνωτή ( $C_d$ ) και την αντίσταση πόλωσης ( $R_p$ ) συνδεδεμένα παράλληλα (Εικ.1.10)<sup>10</sup>. Μέσω της προσομοίωσης προκύπτουν οι τιμές της ωμικής αντίστασης ( $R_s$ ), της αντίστασης πόλωσης ( $R_p$ ) και της χωρητικότητας της διεπιφάνειας ( $C_d$ )(Πιν. 2.5).

53

Συγκέντρωση κορτιζόλης (ng/ml)	Ωμική αντίσταση R <sub>S</sub> (KΩ)	Αντίσταση πόλωσης R <sub>p</sub> (KΩ)	Χωρητικότητα διεπιφάνειας C <sub>dl</sub> (μF)
0.1	0.076	808.1	1.987
2.5	0.089	748.2	2.028
5	0.090	697.7	2.000
10	0.092	579.6	1.937

Πίνακας 2.5: Αποτελέσματα προσομοίωσης σε κύκλωμα Randles των μετρήσεων εμπέδησης του βιοαισθητήρα σε συγκεντρώσεις κορτιζόλης 0.1, 2.5, 5 και 10ng/ml.

Βάσει των αποτελεσμάτων της προσομοίωσης, παρατηρείται μείωση της αντίστασης πόλωσης όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της κορτιζόλης πάνω στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, γεγονός το οποίο υποδηλώνει τη δημιουργία διαφορετικής διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη σε κάθε διαφορετική συγκέντρωση κορτιζόλης. Η πιο πιθανή εξήγηση που προτείνεται για τη μείωση της αντίστασης πόλωσης είναι ότι με την προσθήκη της κορτιζόλης, η οποία είναι ένα μικρό μη ιοντικό μόριο με μοριακό βάρος 362.46Da, σχηματίζεται μια καινούργια διεπιφάνεια μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη, στην οποία η κορτιζόλη, κατά την πρόσδεση στο αντίσωμα της, προκαλεί αλλαγή στη διάταξη του αντισώματος στο χώρο. Αυτό οδηγεί σε μια πιο «σφικτή» διαμόρφωση του αντισώματος, η οποία καθιστά πιο εύκολη τη μεταφορά φορτίων, προκαλώντας μείωση στην αντίσταση πόλωσης<sup>76</sup>.

Ο βιοαισθητήρας λοιπόν, αποκρίνεται στην κορτιζόλη στο εύρος συγκεντρώσεων κορτιζόλης από 0.1 έως 10ng/ml, μεταβάλλοντας της αντίσταση πόλωσης του συστήματος όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της κορτιζόλης.

Οι κύριες αλλαγές στην εμπέδηση του συστήματος συμβαίνουν σε χαμηλές συχνότητες<sup>75</sup>, έτσι επιλέχθηκε η συχνότητα 0.079Hz για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα. Η καμπύλη βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα προκύπτει από τη γραφική παράσταση των τιμών του φανταστικού μέρους της εμπέδησης (-Z´) σε συχνότητα 0.079Hz, σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της κορτιζόλης, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 0.1, 2.5, 5 και 10ng/ml (Εικ.2.11).



**Εικόνα 2.11:** Καμπύλη βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα σε συγκεντρώσεις κορτιζόλης 0.1, 2.5, 5 και 10ng/ml

#### 2.3.4.3 Μελέτη της απόκρισης μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου στην κορτιζόλη

Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η επιβεβαίωση ότι η απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη προέρχεται από το αντίσωμα και όχι από τυχόν τυχαίες αλληλεπιδράσεις της επιφάνειας του χρυσού με την κορτιζόλη.

Ο έλεγχος αυτός επιτυγχάνεται με μετρήσεις εμπέδησης σε μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού και ακολούθως σε μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού με την προσθήκη κορτιζόλης συγκέντρωσης 0.1, 2.5, 5 και 10ng/ml διαδοχικά (Εικ. 2.12).



Εικόνα 2.12: Σύγκριση των φασμάτων εμπέδησης των υπό μελέτη συστημάτων: (■) μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού και μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού με προσθήκες κορτιζόλης συγκέντρωσης (●) 0.1ng/ml (▼) 2.5ng/ml (◄) 5ng/ml (►) 10ng/ml. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 2.12, το φάσμα της εμπέδησης σε κάθε ένα από τα υπό μελέτη συστήματα δεν περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή, αλλά μια κυρτή γραμμή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, χαρακτηριστική για ένα μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εμβαπτισμένο σε διάλυμα ηλεκτρολύτη. Η διεπιφάνεια που έχει σχηματιστεί μεταξύ του ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη οφείλεται στην εμβάπτιση του ηλεκτροδίου του χρυσού στον ηλεκτρολύτη και όχι λόγω χημικής τροποποιήσης, οπότε δεν έχει πραγματοποιηθεί πρόσδεση των μορίων της κορτιζόλης στον ηλεκτρολύτη (από 0 έως 10 μ) η κυρτή γραμμή μετακινείται σε υψηλότερες τιμές πραγματικού μέρους της εμπέδησης (Z'), δηλαδή αυξάνεται η ωμική αντίσταση του συστήματος<sup>10</sup>.

Πραγματοποιήθηκε προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων των υπό μελέτη συστημάτων με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, σε κύκλωμα το οποίο περιείχε μια αντίσταση και ένα πυκνωτή συνδεδεμένα σε σειρά<sup>10</sup>. Μέσω της προσομοίωσης

προκύπτουν οι τιμές της αντίστασης (ωμική αντίσταση,  $R_s$ ) και της χωρητικότητας του πυκνωτή (C)(Πιν. 2.6).

**Πίνακας 2.6:** Αποτελέσματα προσομοίωσης των μετρήσεων εμπέδησης των υπό μελέτη συστημάτων: μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού και μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού με προσθήκες κορτιζόλης συγκέντρωσης 0.1, 2.5, 5 και 10 ng/ml.

Μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού με συγκέντρωση κορτιζόλης (ng/ml):	Αντίσταση (Rs) (KΩ)	Χωρητικότητα πυκνωτή (C) (μF)
0	0.040	2.000
0.1	0.041	2.144
2.5	0.041	2.107
5	0.042	2.248
10	0.042	2.284

Με βάση τα αποτελέσματα της προσομοίωσης (Πιν. 2.6), επιβεβαιώνεται η αύξηση της ωμικής αντίστασης όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της κορτιζόλης στον ηλεκτρολύτη. Γεγονός το οποίο αναμενόταν, καθώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του μη ιοντικού μορίου της κορτιζόλης στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη καθίσταται πιο δύσκολη η μεταφορά φορτίων, οπότε αυξάνεται η ωμική αντίσταση<sup>10</sup>.

Συμπεραίνεται ότι η απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη προέρχεται από το αντίσωμα και όχι από τυχόν τυχαίες αλληλεπιδράσεις της επιφάνειας του χρυσού με την κορτιζόλη.

# 2.3.4.4 Έλεγχος επαναληψιμότητας κατασκευής του βιοαισθητήρα

Η επιφάνεια του χρυσού δεν μπορεί να αναγεννηθεί λόγω της μη αντιστρεπτής δέσμευσης της κορτιζόλης στο αντίσωμα της, γεγονός που σημαίνει ότι η επαναχρησιμοποίηση του βιοαισθητήρα δεν είναι εφικτή και δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί έλεγχος της επαναληψιμότητας μεταξύ των μετρήσεων<sup>10</sup>. Μπορεί ωστόσο, να πραγματοποιηθεί έλεγχος της επαναληψιμότητας κατασκευής του βιοαισθητήρα.

Ο έλεγχος αυτός υλοποιήθηκε με τρεις βιοαισθητήρες, οι οποίοι κατασκευάστηκαν με την ίδια βελτιστοποιημένη πειραματική διαδικασία. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις εμπέδησης στους τρεις βιοαισθητήρες σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1ng/ml. Πραγματοποιήθηκε προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων των τριών
#### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΧΡΥΣΟΥ

βιοαισθητήρων με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, σε κύκλωμα Randles το οποίο αποτελείται από μια αντίσταση ( $R_s$ ) σε σειρά με ένα σύστημα, το οποίο περιέχει ένα πυκνωτή ( $C_{dl}$ ) και την αντίσταση πόλωσης ( $R_p$ ) συνδεδεμένα παράλληλα (Εικ. 1.10)<sup>10</sup>. Η επί τοις εκατό τυπική σχετική απόκλιση (%RSD) της αντίστασης πόλωσης υπολογίστηκε ίση με 28%, συνεπώς για την εφαρμογή του βιοαισθητήρα θα χρειαστεί περαιτέρω βελτιστοποίηση το σύστημα του βιοαισθητήρα.

Υπάρχει πιθανότητα να μην πραγματοποιείται πλήρης και επαναλήψιμος καθαρισμός της επιφάνειας του χρυσού, με αποτέλεσμα να υπάρχουν ατέλειες και ακαθαρσίες. οι οποίες οδηγούν στην ύπαρξη διαφορών από ηλεκτρόδιο σε ηλεκτρόδιο. Διαφορετική επιφάνεια χρυσού σε κάθε ηλεκτρόδιο θα δεσμεύσει διαφορετικό αριθμό θειολών, διότι τα οργανικά μόρια θα αυτοδιατάσσωνται με τυχαίο και διαφορετικό τρόπο πάνω στην επιφάνεια του κάθε ηλεκτροδίου. Αυτό έχει τελικό αποτέλεσμα τη δέσμευση διαφορετικού αριθμού μορίων κορτιζόλης στο κάθε ηλεκτρόδιο, που θα έχει επίδραση στην απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη.

#### 2.4 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό επιτεύχθηκε η επιτυχής κατασκευή του βιοαισθητήρα κορτιζόλης σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού. Τα χαρακτηριστικά και η παρακολούθηση της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη μελετήθηκαν με την τεχνική της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης, σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS. Κάποια βήματα ελέγχθηκαν μόνο μέσω της αντίστασης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου μετά την τροποποίηση του ενώ κάποια μέσω της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη σε συγκέντρωση 0.1ng/ml.

Αρχικά, με τη μέθοδο της ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (ELISA) αποδείχτηκε ότι το αντίσωμα ήταν στην ενεργή του μορφή, οπότε μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιομόριο στην κατασκευή του βιοαισθητήρα.

Μελετώντας την επίδραση του καθαρισμού της επιφάνειας του χρυσού με την εφαρμογή της κυκλικής βολταμετρίας, επιβεβαιώθηκε η σημασία του καθαρισμού του χρυσού πριν τη χημική τροποποίηση του. Σε ηλεκτρόδιο στο οποίο δεν πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της επιφάνειας του χρυσού δεν προσδέθηκαν τα μόρια των θειολών στο χρυσό, σε αντίθεση με ηλεκτρόδιο στο οποίο πραγματοποιήθηκε, όπου επετεύχθη η παραπάνω πρόσδεση. Η πρόσδεση των θειολών πάνω στο χρυσό επιβεβαιώθηκε μέσω μεταβολής στην εμπέδηση του συστήματος.

Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε η διαδοχική πρόσδεση των μορίων σε κάθε στάδιο κατασκευής του βιοαισθητήρα. Συγκεκριμένα, με την προσθήκη των μορίων του 11-MUA μεταβάλλεται η εμπέδηση του συστήματος σε σχέση με το φάσμα εμπέδησης μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει το σχηματισμό διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη λόγω χημικής τροποποιήσης και επομένως οφείλεται στην πρόσδεση των μορίων του 11-MUA στο χρυσό. Με την προσθήκη του διαλύματος EDC-NHS αυξάνεται η αντίσταση πόλωσης σε σχέση με το προηγούμενο βήμα, γεγονός που σημαίνει τη δημιουργία μιας διαφορετικής διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη και συνεπώς το σχηματισμό των εστέρων του NHS στις καρβοξυλικές ομάδες της επιφάνειας του χρυσού. Τέλος, με την προσθήκη του αντισώματος αυξάνεται η αντίσταση πόλωσης σε σχέση με το προηγούμενο βήμα, που ομοίως συνεπάγεται τη δημιουργία μια διαφορετικής

#### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΧΡΥΣΟΥ

διεπιφάνειας και την πρόσδεση του αντισώματος πάνω στην τροποποιημένη επιφάνεια χρυσού. Η αύξηση της αντίστασης πόλωσης του συστήματος επιβεβαιώθηκε με προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων σε κύκλωμα Randles, το οποίο αποτελείται από μια αντίσταση ( $R_s$ ) σε σειρά με ένα σύστημα, το οποίο περιέχει ένα πυκνωτή ( $C_{dl}$ ) και την αντίσταση πόλωσης ( $R_p$ ) συνδεδεμένα παράλληλα (Εικ.1.10). Σε κάθε στάδιο κατασκευής η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια καθιστά πιο δύσκολη τη μεταφορά φορτίου, αυξάνοντας την αντίσταση πόλωσης του συστήματος.

Από τη μελέτη της επίδρασης δυο διαφορετικών χρόνων επώασης, 3h και 5h, και δυο διαφορετικών τρόπων προσθήκης του διαλύματος EDC-NHS, προσθήκη 15 μl διαλύματος EDC-NHS πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας και εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε 4ml διαλύματος EDC και στη συνέχεια η προσθήκη 0.1159gr NHS, στην απόδοση του βιοαισθητήρα, βρέθηκε ότι ο βιοαισθητήρας στον οποίο έχει πραγματοποιηθεί η εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε 4ml διαλύματος 0.5M EDC και στη συνέχεια η προσθήκη 0.1159gr NHS, στην κορτιζόλη. Καθίσταται λοιπόν σαφές ότι οι παραπάνω συνθήκες είναι οι βέλτιστες για την κατασκευή του βιοαισθητήρα κορτιζόλης.

Στη συνέχεια, επιβεβαιώθηκε η απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη, μέσω σύγκρισης της απόκρισης του βιοαισθητήρα με αυτήν ενός μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου χρυσού. Ο βιοαισθητήρας αποκρίνεται στην κορτιζόλη μεταβάλλοντας την εμπέδηση του συστήματος. Ο βιοαισθητήρας που κατασκευάστηκε αποκρίνεται στην κορτιζόλη σε εύρος συγκεντρώσεων κορτιζόλης από 0.1 έως 10ng/ml. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της κορτιζόλης μειώνεται η αντίσταση πόλωσης του συστήματος, γεγονός που υποδηλώνει τη δημιουργία μιας διαφορετικής διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη σε κάθε διαφορετική συγκέντρωση της κορτιζόλης. Η πιο πιθανή εξήγηση που προτείνεται για τη μείωση της αντίστασης πόλωσης είναι ότι με την προσθήκη της κορτιζόλης, σχηματίζεται μια καινούργια διεπιφάνεια στην οποία η κορτιζόλη, κατά την πρόσδεση στο αντίσωμα της, προκαλεί αλλαγή στη διάταξη του αντισώματος στο χώρο. Αυτό οδηγεί σε μια πιο «σφικτή» διαμόρφωση του αντισώματος, η οποία καθιστά πιο εύκολη τη μεταφορά φορτίων, προκαλώντας μείωση στην αντίσταση πόλωσης του συστήματος.

Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι η απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη προέρχεται από το αντίσωμα και όχι από τυχόν τυχαίες αλληλεπιδράσεις της

επιφάνειας του χρυσού με την κορτιζόλη, ενώ από τη μελέτη της επαναληψιμότητας κατασκευής του βιοαισθητήρα βρέθηκε ότι η επί τοις εκατό τυπική σχετική απόκλιση (%RSD) της αντίστασης πόλωσης είναι ίση με 28% (n=3), συνεπώς για την εφαρμογή του βιοαισθητήρα θα χρειαστεί περαιτέρω βελτιστοποίηση το σύστημα του βιοαισθητήρα.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΑΝΘΡΑΚΑ

#### 3.1 Σκοπός

Όπως έχει προαναφερθεί, ένα από τα κατάλληλα υποστρώματα για την ακινητοποίηση των βιομορίων αποτελεί ο άνθρακας, καθώς παρέχει τη δυνατότητα ακινητοποίησης τους στις καρβοξυλικές ομάδες της επιφάνειας του. Επιπλέον, η υψηλή του αγωγιμότητα, τον καθιστά εξαιρετικό ηλεκτροχημικό μεταλλάκτη σήματος.

Σκοπό του παρόντος κεφαλαίου αποτελεί η κατασκευή ενός μη φαρανταϊκού βιοαισθητήρα κορτιζόλης, χρησιμοποιώντας εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα ως μεταλλάκτη σήματος και το αντίσωμα της κορτιζόλης ως βιομόριο. Το εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα ήταν τροποποιημένο με το σύμπλοκο φθαλοκυανίνη του κοβαλτίου (II).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μελέτη των σταδίων κατασκευής του βιοαισθητήρα. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η πρόσδεση των αντίστοιχων μορίων στα στάδια κατασκευής του βιοαισθητήρα και μελετήθηκε η βελτιστοποίηση της μεθόδου κατασκευής του. Εξετάστηκε η απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη, πραγματοποιήθηκε κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης, μελετήθηκε η απόκριση μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου άνθρακα στην κορτιζόλη και τέλος, η επαναληψιμότητα κατασκευής του. Τα χαρακτηριστικά και η παρακολούθηση της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη μελετήθηκαν με την τεχνική της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης.

62

#### 3.2 Πειραματική διαδικασία – Αποτελέσματα

#### 3.2.1 Εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία χρησιμοποιείται εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο (2.5\*2.5cm), το οποίο αποτελείται από άνθρακα τροποποιημένο με το σύμπλοκο φθαλοκυανίνη του κοβαλτίου (II) (cobalt(II) phthalocyanine, CoPc) ως ηλεκτρόδιο εργασίας, με 3.5mm διάμετρο (Gwent Electronic Materials)(Εικ. 3.1).



Εικόνα 3.1: Εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιημένο με φθαλοκυανίνη του κοβαλτίου (ΙΙ).

#### 3.2.2 Σταδία κατασκευής βιοαισθητήρα κορτιζόλης

Σύμφωνα με προηγούμενα δημοσιευμένες μελέτες<sup>15,77</sup> τα στάδια για την κατασκευή του βιοαισθητήρα είναι τα παρακάτω:

#### 1°: Καθαρισμός επιφάνειας ηλεκτροδίου άνθρακα

Ο καθαρισμός του άνθρακα πραγματοποιήθηκε με κυκλική βολταμετρία (cyclic voltammetry, CV), μέσω της οποίας οξειδώνονται και ανάγονται οι ακαθαρσίες της επιφάνειας του<sup>49</sup>. Χρησιμοποιήθηκε σύστημα τριών ηλεκτροδίων, το οποίο αποτελείται από άνθρακα ως ηλεκτρόδιο εργασίας, από Ag/AgCl ως ηλεκτρόδιο αναφοράς και από πλατίνα (Pt) ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο, τα οποία συνδέθηκαν σε ποτενσιοστάτη (EmStat3 Blue). Τα κυκλικά βολταμογραφήματα ελήφθησαν σε διάλυμα θειικού οξέος συγκέντρωσης 0.1M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) με σάρωση του δυναμικού από - 0.85 έως +1V και ταχύτητα σάρωσης 100mV/sec (ως προς Ag/AgCl). Εφαρμόστηκαν 40 κύκλοι κυκλικής βολταμετρίας έως τη σταθεροποίηση των κυκλικών βολταμογραφημάτων, όπως απεικονίζεται στην Εικ. 3.2 η κορυφή αναγωγής του

κοβαλτίου στα -0.35V έχει σταθεροποιηθεί στους τελευταίους κύκλους (38°ς, 39°ς και 40°ς).



**Εικόνα 3.2:** Κυκλικά βολταμογραφήματα ηλεκτροδίου άνθρακα σε διάλυμα 0.1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> με σάρωση του δυναμικού από -0.85 έως +1V και ταχύτητα σάρωσης 100mV/sec (ως προς Ag/AgCl) (38°ς, 39°ς και 40°ς κύκλος).

#### <u>2°: Ενεργοποίηση καρβοξυλικών ομάδων</u>

Η ενεργοποίηση των καρβοζυλικών ομάδων της επιφάνειας του άνθρακα προσθήκη διαλύματος EDC-NHS υλοποιήθηκε με την (Ν-αιθυλο-Ν'-3διμεθυλοαμινοπρόπυλο καρβοδιιμίδιο - Ν-υδροξυηλεκτριμίδιου). Η προσθήκη αυτή έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση των καρβοξυλικών ομάδων μέσω του σχηματισμού των εστέρων του NHS. Τοποθετήθηκαν πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας 7μl διαλύματος EDC-NHS για 3h. Αυτό το διάλυμα προκύπτει από την ανάμειξη διαλύματος 0.4M EDC σε ρυθμιστικό MES (100mM, 2-(N-morpholin) ethanesulfonicacid, pH=5), με διάλυμα 0.1M NHS σε ρυθμιστικό MES (100mM), σε αναλογία 1:1<sup>15</sup>. Ακολούθησαν πλύσεις του ηλεκτροδίου με ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS με σκοπό την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων εστέρων του NHS.

#### <u>3°: Ακινητοποίηση αντισώματος κορτιζόλης</u>

Η ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 7μl μονοκλωνικού αντισώματος κορτιζόλης πάνω στην επιφάνεια του άνθρακα για 24h<sup>27</sup>. Ακολούθησαν πλύσεις του ηλεκτροδίου με 0.1M PBS με σκοπό την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων αντισωμάτων. Μελετήθηκαν δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντισώματος, 0.004mg/ml και 0.7mg/ml με σκοπό την εύρεση της συγκέντρωσης η οποία θα οδηγήσει σε βιοαισθητήρα με μεγαλύτερη απόκριση στην κορτιζόλη. Στην Εικ. 3.3 απεικονίζονται τα βήματα κατασκευής του βιοαισθητήρα.



Εικόνα 3.3: Σχηματική απεικόνιση των βημάτων κατασκευής του βιοαισθητήρα. Στο πρώτο βήμα πραγματοποιείται ο καθαρισμός του ηλεκτροδίου του άνθρακα με CV -Στο δεύτερο βήμα πραγματοποιείται η ενεργοποίηση των καρβοξυλικών ομάδων του άνθρακα με την προσθήκη διαλύματος EDC-NHS, σχηματίζοντας τους εστέρες του NHS και τέλος, στο τρίτο βήμα προστίθεται το αντίσωμα της κορτιζόλης, το οποίο ακινητοποιείται πάνω στις καρβοξυλικές ομάδες.

#### 3.3.3 Παρακολούθηση διαδικασίας κατασκευής βιοαισθητήρα

Σε αυτή την ενότητα πραγματοποιήθηκε μελέτη των σταδίων κατασκευής του βιοαισθητήρα με σκοπό την επιβεβαίωση της διαδοχικής πρόσδεσης των μορίων σε κάθε στάδιο και τέλος, εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών συνθηκών της πειραματικής διαδικασίας με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντισώματος.

Οι παραπάνω μελέτες χαρακτηρίστηκαν με την τεχνική της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης, με τη χρήση ποτενσιοστάτη (Autolab PGSTAT 302 N). Ως ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.1M PBS) με pH=7.5. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση εμπέδησης δέκα λεπτά μετά την εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε ρυθμιστικό διάλυμά 0.1M PBS υπό ανάδευση, εφαρμόζοντας εναλλασσόμενη τάση (10mV) σε εύρος συχνοτήτων από 10<sup>5</sup> έως 0.05Hz. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο Ag/AgCl και ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο πλατίνας (Pt).

Με τις ίδιες συνθήκες φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης πραγματοποιήθηκαν όλες οι μετρήσεις που αναφέρονται στο κεφάλαιο. Κάποια βήματα ελέγχονται μόνο μέσω της αντίστασης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου μετά την τροποποίηση του ενώ κάποια μέσω της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη, είτε σε συγκέντρωση 0.1ng/ml είτε σε συγκέντρωση 5.8ng/ml.

# 3.3.3.1 Έλεγχος της διαδοχικής πρόσδεσης των μορίων σε κάθε στάδιο κατασκευής του βιοαισθητήρα

Στόχος είναι η επιβεβαίωση της διαδοχικής πρόσδεσης των εστέρων του NHS και του αντισώματος της κορτιζόλης πάνω στην επιφάνεια του άνθρακα. Ο έλεγχος της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης σε μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα και σε ηλεκτρόδιο άνθρακα έπειτα από τα διαδοχικά βήματα χημικής τροποποίησης, με διάλυμα EDC-NHS (carbon/EDC-NHS) και με αντίσωμα της κορτιζόλης (carbon/EDC-NHS/Ab) (Εικ. 3.4).



Εικόνα 3.4: Φάσματα εμπέδησης των υπό μελέτη συστημάτων: (■) μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα και ηλεκτρόδιο άνθρακα έπειτα από διαδοχικά βήματα τροποποίησης: (▲) προσθήκη διαλύματος EDC-NHS (▼) προσθήκη αντισώματος κορτιζόλης. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 3.4, το φάσμα της εμπέδησης στο μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού δεν περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή, αλλά μια κυρτή γραμμή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, χαρακτηριστική για ένα μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εμβαπτισμένο σε διάλυμα ηλεκτρολύτη. Επομένως, η διεπιφάνεια που έχει σχηματιστεί οφείλεται στην εμβάπτιση του ηλεκτροδίου στον ηλεκτρολύτη, γεγονός το οποίο ήταν αναμενόμενο καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί κάποια τροποποίηση στο ηλεκτρόδιο<sup>10</sup>.

#### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΑΝΘΡΑΚΑ

Το φάσμα της εμπέδησης στο ηλεκτρόδιο άνθρακα μετά τον καθαρισμό της επιφάνειας του και την προσθήκη του διαλύματος του EDC-NHS (carbon/EDC-NHS), περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, η οποία υποδηλώνει το σχηματισμό διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη λόγω χημικής τροποποίησης. Αυτό συνεπάγεται ότι έχει πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός των εστέρων του NHS στις καρβοξυλικές ομάδες του άνθρακα και η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια καθιστά πιο δύσκολη τη μεταφορά φορτίων, μεταβάλλοντας την εμπέδηση του συστήματος<sup>21,18</sup>.

Το φάσμα της εμπέδησης στο επόμενο διαδοχικό βήμα της χημικής τροποποίησης του άνθρακα, το οποίο περιελάμβανε την προσθήκη του αντισώματος κορτιζόλης (carbon/EDC-NHS/Ab), περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, με αυξημένη αντίσταση πόλωσης σε σχέση με το φάσμα της εμπέδησης στο προηγούμενο βήμα χημικής τροποποίησης (carbon/EDC-NHS). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια περιλαμβάνει τις καρβοξυλικές ομάδες συνδεδεμένες με το αντίσωμα της κορτιζόλης. Το αντίσωμα είναι ένα μεγάλο βιομόριο με αποτέλεσμα η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια να καθιστά ακόμα πιο δύσκολη τη μεταφορά φορτίων, αυξάνοντας την αντίσταση πόλωσης του συστήματος<sup>21,18</sup>.

Πραγματοποιήθηκε προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων του μη τροποποιημένου ηλεκτρόδιου άνθρακα, με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, σε κύκλωμα το οποίο περιείχε μια αντίσταση ( $\mathbf{R}_s$ ) και ένα πυκνωτή συνδεδεμένα σε σειρά<sup>10</sup>. Στα πειραματικά δεδομένα του ηλεκτροδίου του άνθρακα έπειτα από τα διαδοχικά βήματα χημικής τροποποίησης, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση σε κύκλωμα Randles, το οποίο αποτελείται από μια αντίσταση ( $\mathbf{R}_s$ ) σε σειρά με ένα σύστημα, το οποίο περιέχει ένα πυκνωτή ( $\mathbf{C}_{dl}$ ) και την αντίσταση πόλωσης ( $\mathbf{R}_p$ ) συνδεδεμένα παράλληλα (Εικ.1.10)<sup>10</sup>. Μέσω της προσομοίωσης προκύπτουν οι τιμές της ωμικής αντίστασης ( $\mathbf{R}_s$ ), της αντίστασης πόλωσης ( $\mathbf{R}_p$ ) και της χωρητικότητας της διεπιφάνειας ( $\mathbf{C}_{dl}$ )(Πιν. 3.1).

67

#### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΑΝΘΡΑΚΑ

Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα προσομοίωσης των μετρήσεων εμπέδησης στο μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα και στο ηλεκτρόδιο άνθρακα έπειτα από διαδοχικά βήματα τροποποίησης: carbon/EDC-NHS και carbon/EDC-NHS/Ab.

	Ωμική αντίσταση R <sub>S</sub> (KΩ)	Αντίσταση πόλωσης R <sub>p</sub> (KΩ)	Χωρητικότητα διεπιφάνειας C <sub>dl</sub> (μF)
Μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα	0.098	-	1.19
carbon/EDC-NHS	0.069	0.061	0.024
carbon/EDC-NHS/Ab	0.122	32.8	66.6

Από τα αποτελέσματα της προσομοίωσης (Πιν. 3.1), επιβεβαιώνεται η αύξηση της αντίστασης πόλωσης στα διαδοχικά βήματα τροποποίησης της επιφάνειας του άνθρακα, από το βήμα της προσθήκης του διαλύματος EDC-NHS (carbon/EDC-NHS) έως το βήμα της προσθήκης του αντισώματος πάνω στην επιφάνεια του άνθρακα (carbon/EDC-NHS/Ab), γεγονός που επιβεβαιώνει τη δημιουργία μιας διαφορετικής διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη σε κάθε βήμα<sup>21,18</sup>.

Συνοψίζοντας, σε κάθε στάδιο κατασκευής του βιοαισθητήρα γίνεται διαδοχική προσθήκη πάνω στην επιφάνεια του άνθρακα των εστέρων τους NHS και του αντισώματος της κορτιζόλης, επομένως επιτεύχθηκε η επιτυχής πρόσδεση των μορίων κατά τα διαδοχικά στάδια κατασκευής του βιοαισθητήρα <sup>75,10</sup>.

#### 3.3.3.2 Βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών

Μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συνθηκών της πειραματικής διαδικασίας στην απόκριση του βιοαισθητήρα κορτιζόλης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων του αντισώματος της κορτιζόλης. Ο έλεγχος υλοποιήθηκε μέσω της απόκρισης του βιοαισθητήρα σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1ng/ml.

#### Έλεγχος συγκέντρωσης αντισώματος κορτιζόλης

Η επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος της κορτιζόλης ελέγχθηκε σε δυο διαφορετικούς βιοαισθητήρες (1 και 2). Στο βιοαισθητήρα 1 τοποθετήθηκε πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας αντίσωμα συγκέντρωσης 0.004mg/ml, αντίθετα στο βιοαισθητήρα 2 τοποθετήθηκε αντίσωμα συγκέντρωσης 0.7mg/ml. Οι υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν στους δυο βιοαισθητήρες παρέμειναν σταθερές. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις εμπέδησης χωρίς την προσθήκη κορτιζόλης και σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1ng/ml στους δυο βιοαισθητήρες (Εικ.

3.5)



Εικόνα 3.5: Φάσματα εμπέδησης των δυο διαφορετικών βιοαισθήτηρων Α) βιοαισθητήρας 1 (τοποθέτηση αντισώματος συγκέντρωσης 0.004mg/ml πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας) Β) βιοαισθητήρας 2 (τοποθέτηση αντισώματος συγκέντρωσης 0.7mg/ml πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας): (■, ▲): χωρίς την προσθήκη κορτιζόλης (■, ▲): σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1ng/ml. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 3.5, οι κύριες αλλαγές στην εμπέδηση του συστήματος συμβαίνουν σε χαμηλές συχνότητες<sup>75</sup>, έτσι επιλέχθηκε η συχνότητα 0.079Hz για τη σύγκριση των δυο βιοαισθητήρων. Στο βιοαισθητήρα 1 η διαφορά του φανταστικού μέρους της εμπέδησης (-Z΄) σε συχνότητα 0.079Hz, χωρίς την προσθήκη κορτιζόλης και σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1ng/ml, είναι  $\Delta$ (-Z΄)=16.356-16.063=0.293KOhm, ενώ στο βιοαισθητήρα 2 η αντίστοιχη διαφορά του φανταστικού μέρους της εμπέδησης (-Ζ΄) σε συχνότητα 0.079Hz, είναι  $\Delta$ (-Ζ΄)=22.836-20.523=2.313KOhm.

Συμπεραίνουμε ότι στο βιοαισθητήρα 2, έχουν προσδεθεί περισσότερα μόρια κορτιζόλης σε σχέση με το βιοαισθητήρα 1, αυτό συνεπάγεται ότι στο βιοαισθητήρα 2 έχει προηγηθεί και η πρόσδεση περισσότερων αντισωμάτων κορτιζόλης, γεγονός που οφείλεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του αντισώματος.

Από τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι ο βιοαισθητήρας 2, στον οποίο τοποθετήθηκε αντίσωμα κορτιζόλης συγκέντρωσης 0.7mg/ml, εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην κορτιζόλη σε σχέση με το βιοαισθητήρα 1, στον οποίο τοποθετήθηκε αντίσωμα κορτιζόλης συγκέντρωσης 0.004mg/ml. Επομένως η βέλτιστη συγκέντρωση αντισώματος για την κατασκευή του βιοαισθητήρα είναι 0.7mg/ml.

#### 3.3.4 Έλεγχος απόκρισης βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη

#### 3.3.4.1 Επιβεβαίωση της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη

Αρχικά, επιβεβαιώθηκε η απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη, ο οποίος είχε κατασκευαστεί με τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε εμπέδηση και σύγκριση της απόκρισης του βιοαισθητήρα με αυτήν ενός μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου άνθρακα, σε συγκέντρωση κορτιζόλης 5.8ng/ml (Εικ. 3.6).



**Εικόνα 3.6:**Φάσματα εμπέδησης σε συγκέντρωση κορτιζόλης 0.1 ng/ml: (**■**) βιοαισθητήρα κορτιζόλης (•) μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου άνθρακα. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 3.6, το φάσμα της εμπέδησης στο μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο δεν περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή, αλλά μια κυρτή γραμμή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, χαρακτηριστική για ένα μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εμβαπτισμένο σε διάλυμα ηλεκτρολύτη. Αυτό συνεπάγεται ότι η διεπιφάνεια που έχει σχηματιστεί μεταξύ ηλεκτροδίουηλεκτρολύτη οφείλεται στην εμβάπτιση του ηλεκτροδίου άνθρακα στον ηλεκτρολύτη και όχι λόγω χημικής τροποποίησης<sup>10</sup>. Επομένως, το μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα δεν αποκρίνεται στην κορτιζόλη.

Αντίθετα, το φάσμα της εμπέδησης του βιοαισθητήρα περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή στον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, η οποία υποδηλώνει τη δημιουργία διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη λόγω χημικής τροποποίησης της επιφάνειας του άνθρακα. Η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια μεταβάλλει την εμπέδηση του συστήματος υποδηλώνοντας την πρόσδεση της κορτιζόλης στην τροποποιημένη με το αντίσωμα επιφάνεια του άνθρακα<sup>21,18</sup>.

Ο βιοαισθητήρας λοιπόν αποκρίνεται με επιτυχία στην κορτιζόλη μεταβάλλοντας την εμπέδηση του συστήματος κατά την ακινητοποίηση της κορτιζόλης στην τροποποιημένη επιφάνεια του βιοαισθητήρα.

#### 3.3.4.2 Κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της απόκρισης του βιοαισθητήρα, ο οποίος κατασκευάστηκε με τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, σε συγκεντρώσεις κορτιζόλης στο εύρος 5.8 έως 464ng/ml. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν προσθήκες διαφορετικών ποσοτήτων 10μl, 200μl και 800μl πρότυπου διαλύματος κορτιζόλης με συγκέντρωση 16.6 μg/ml, σε 20ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.1M PBS, οι οποίες αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις κορτιζόλης 5.8, 116 και 464ng/ml αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκε εμπέδηση σε κάθε διαφορετική συγκέντρωση κορτιζόλης.

Ακολούθησε προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων του βιοαισθητήρα στις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις της κορτιζόλης (5.8, 116 και 464ng/ml), με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, σε κύκλωμα Randles, το οποίο αποτελείται από μια αντίσταση ( $R_s$ ) σε σειρά με ένα σύστημα, το οποίο περιέχει ένα πυκνωτή ( $C_d$ ) και την αντίσταση πόλωσης ( $R_p$ ) συνδεδεμένα παράλληλα (Εικ.1.10)<sup>10</sup>. Μέσω της προσομοίωσης προκύπτουν οι τιμές της ωμικής αντίστασης ( $R_s$ ), της αντίστασης πόλωσης ( $R_p$ ) και της χωρητικότητας της διεπιφάνειας ( $C_d$ )(Πιν. 3.2).

#### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΑΝΘΡΑΚΑ

Συγκέντρωση κορτιζόλης (ng/ml)	Ωμική αντίσταση R <sub>S</sub> (KΩ)	Αντίσταση πόλωσης R <sub>p</sub> (KΩ)	Χωρητικότητα διεπιφάνειας C <sub>dl</sub> (μF)
5.8	0.130	34.5	66.4
116	0.130	32.5	67.4
464	0.146	30.5	68.2

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα προσομοίωσης σε κύκλωμα Randles, των μετρήσεων εμπέδησης του βιοαισθητήρα σε συγκεντρώσεις κορτιζόλης 5.8, 116 και 464ng/ml.

Βάσει των αποτελεσμάτων της προσομοίωσης, παρατηρείται μείωση της αντίστασης πόλωσης όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της κορτιζόλης πάνω στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, γεγονός που σημαίνει τη δημιουργία διαφορετικής διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη σε κάθε διαφορετική συγκέντρωση κορτιζόλης. Η πιο πιθανή εξήγηση που προτείνεται για τη μείωση της αντίστασης πόλωσης είναι ότι με την προσθήκη της κορτιζόλης, η οποία είναι ένα μικρό μη ιοντικό μόριο με μοριακό βάρος 362.46Da, σχηματίζεται μια καινούργια διεπιφάνεια μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη, στην οποία η κορτιζόλη, κατά την πρόσδεση στο αντίσωμα της, προκαλεί αλλαγή στη διάταξη του αντισώματος στο χώρο. Αυτό οδηγεί σε μια πιο «σφικτή» διαμόρφωση του αντισώματος, η οποία καθιστά πιο εύκολη τη μεταφορά φορτίων, προκαλώντας μείωση στην αντίσταση πόλωσης<sup>76</sup>.

Ο βιοαισθητήρας λοιπόν, αποκρίνεται στην κορτιζόλη στο εύρος συγκεντρώσεων κορτιζόλης από 5.8 έως 464ng/ml, μεταβάλλοντας της αντίσταση πόλωσης του συστήματος όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της κορτιζόλης.

Οι κύριες αλλαγές στην εμπέδηση του συστήματος συμβαίνουν σε χαμηλές συχνότητες<sup>75</sup>, έτσι επιλέχθηκε η συχνότητα 0.50Hz για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα. Η καμπύλη βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα προκύπτει από τη γραφική παράσταση των τιμών του πραγματικού μέρους της εμπέδησης (-Z') σε συχνότητα 0.50Hz, σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της κορτιζόλης, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 5.8, 116 και 464ng/ml (Εικ.3.7).



**Εικόνα 3.7:** Καμπύλη βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα σε συγκεντρώσεις κορτιζόλης 5.8, 116 και 464ng/ml

#### 3.3.4.3 Μελέτη της απόκρισης μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου στην κορτιζόλη

Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η επιβεβαίωση ότι η απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη προέρχεται από το αντίσωμα και όχι από τυχόν τυχαίες αλληλεπιδράσεις της επιφάνειας του άνθρακα με την κορτιζόλη.

Ο έλεγχος αυτός επιτυγχάνεται με μετρήσεις εμπέδησης σε μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα και ακολούθως σε μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με την προσθήκη κορτιζόλης συγκέντρωσης 5.8, 116 και 464ng/ml διαδοχικά. Στην Εικ. 3.8 παρουσιάζεται το φάσμα εμπέδησης των παραπάνω μετρήσεων, σε εύρος συχνοτήτων από 10<sup>5</sup> έως 79.34Hz.



**Εικόνα 3.8:** Σύγκριση των φασμάτων εμπέδησης σε εύρος συχνοτήτων από 10<sup>5</sup> έως 79.34Hz, των υπό μελέτη συστημάτων: (■) μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα και μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με προσθήκες κορτιζόλης συγκέντρωσης (●) 5.8ng/ml (▼) 116ng/ml (◀) 464ng/ml. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 3.8, το φάσμα της εμπέδησης σε κάθε ένα από τα υπό μελέτη συστήματα δεν περιλαμβάνει μια ημικυκλική περιοχή, αλλά μια κυρτή γραμμή στον άζονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης, χαρακτηριστική για ένα μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εμβαπτισμένο σε διάλυμα ηλεκτρολύτη. Η διεπιφάνεια που έχει σχηματιστεί μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη οφείλεται στην εμβάπτιση του ηλεκτροδίου του άνθρακα στον ηλεκτρολύτη και όχι λόγω χημικής τροποποιήσης, οπότε δεν έχει πραγματοποιηθεί πρόσδεση των μορίων της κορτιζόλης στον ηλεκτρολύτη (από 0 έως 464ng/ml) η κυρτή γραμμή μετακινείται σε υψηλότερες τιμές πραγματικού μέρους της εμπέδησης (Z'), δηλαδή αυξάνεται η ωμική αντίσταση του συστήματος<sup>10</sup>.

Πραγματοποιήθηκε προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων των υπό μελέτη συστημάτων με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, σε κύκλωμα το οποίο περιείχε μια αντίσταση και ένα πυκνωτή συνδεδεμένα σε σειρά<sup>10</sup>. Μέσω της προσομοίωσης προκύπτουν οι τιμές της αντίστασης (ωμική αντίσταση, R<sub>s</sub>) και της χωρητικότητας του πυκνωτή (C)(Πιν. 3.3).

#### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΑΝΘΡΑΚΑ

Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα προσομοίωσης σε κύκλωμα των μετρήσεων εμπέδησης των υπό μελέτη συστημάτων: μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα και μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με προσθήκες κορτιζόλης συγκέντρωσης 5.8, 116 και 464 ng/ml.

Μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού με συγκέντρωση κορτιζόλης (ng/ml):	Αντίσταση (Rs) (KΩ)	Χωρητικότητα πυκνωτή (C) (μF)
0	0.098	1.19
5.8	0.100	1.22
116	0.106	1.28
464	0.113	1.41

Με βάση τα αποτελέσματα της προσομοίωσης (Πιν. 3.3), επιβεβαιώνεται η αύξηση της ωμικής αντίστασης όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της κορτιζόλης στον ηλεκτρολύτη. Γεγονός το οποίο αναμενόταν καθώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του μη ιοντικού μορίου της κορτιζόλης στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη καθίσταται πιο δύσκολη η μεταφορά φορτίων, οπότε αυξάνεται η ωμική αντίσταση<sup>10</sup>.

Συμπεραίνεται ότι η απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη προέρχεται από το αντίσωμα και όχι από τυχόν τυχαίες αλληλεπιδράσεις της επιφάνειας του άνθρακα με την κορτιζόλη.

#### 3.3.4.4 Έλεγχος επαναληψιμότητας κατασκευής του βιοαισθητήρα

Η επιφάνεια του άνθρακα δεν μπορεί να αναγεννηθεί λόγω της μη αντιστρεπτής δέσμευσης της κορτιζόλης στο αντίσωμα της, γεγονός που σημαίνει ότι η επαναχρησιμοποίηση του βιοαισθητήρα δεν είναι εφικτή και δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί έλεγχος της επαναληψιμότητας μεταξύ των μετρήσεων<sup>10</sup>. Μπορεί ωστόσο, να πραγματοποιηθεί έλεγχος της επαναληψιμότητας κατασκευής του βιοαισθητήρα.

Ο έλεγχος αυτός υλοποιήθηκε με τρεις βιοαισθητήρες, οι οποίοι κατασκευάστηκαν με την ίδια βελτιστοποιημένη πειραματική διαδικασία. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις εμπέδησης στους τρεις βιοαισθητήρες σε συγκέντρωση κορτιζόλης 5.6ng/ml. Οι κύριες αλλαγές στην εμπέδηση του συστήματος συμβαίνουν σε χαμηλές συχνότητες<sup>75</sup>, έτσι επιλέχθηκε η συχνότητα 0.50Hz για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας κατασκευής των τριών βιοαισθητήρων. Η επί τοις εκατό τυπική σχετική απόκλιση (%RSD) του πραγματικού μέρους της εμπέδησης (-Z') σε

#### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΑΝΘΡΑΚΑ

συχνότητα 0.50Hz υπολογίστηκε ίση με 9.2%, τιμή η οποία μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητική για τα συστήματα των βιοαισθητήρων.

Υπάρχει πιθανότητα να μην πραγματοποιείται πλήρης και επαναλήψιμος καθαρισμός της επιφάνειας του άνθρακα, με αποτέλεσμα να υπάρχουν ατέλειες και ακαθαρσίες. οι οποίες οδηγούν στην ύπαρξη διαφορών από ηλεκτρόδιο σε ηλεκτρόδιο. Διαφορετική επιφάνεια άνθρακα σε κάθε ηλεκτρόδιο θα δεσμεύσει διαφορετικό αριθμό αντισωμάτων κορτιζόλης, με τελικό αποτέλεσμα τη δέσμευση διαφορετικού αριθμού μορίων κορτιζόλης στο κάθε ηλεκτρόδιο που θα έχει επίδραση στην απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη.

#### 3.3 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό επιτεύχθηκε η επιτυχής κατασκευή του βιοαισθητήρα κορτιζόλης σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα. Τα χαρακτηριστικά και η παρακολούθηση της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη μελετήθηκαν με την τεχνική της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης, σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS. Κάποια βήματα ελέγχθηκαν μόνο μέσω της αντίστασης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου μετά την τροποποίηση του ενώ κάποια μέσω της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη, είτε σε συγκέντρωση 0.1ng/ml είτε σε συγκέντρωση 5.8ng/ml. Το εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα ήταν τροποποιημένο με το σύμπλοκο φθαλοκυανίνη του κοβαλτίου(II).

Αρχικά, διαπιστώθηκε η διαδοχική πρόσδεση των μορίων σε κάθε στάδιο κατασκευής του βιοαισθητήρα. Συγκεκριμένα, με την προσθήκη του διαλύματος EDC-NHS μεταβάλλεται η εμπέδηση του συστήματος σε σχέση με το φάσμα εμπέδησης μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη δημιουργία διεπιφάνειας λόγω **χημικής** τροποποίησης και επομένως οφείλεται στο σγηματισμό των εστέρων του NHS στις καρβοξυλικές ομάδες της επιφάνειας του άνθρακα. Με την προσθήκη του αντισώματος της κορτιζόλης αυξάνεται η αντίσταση πόλωσης σε σχέση με το προηγούμενο βήμα, γεγονός που σημαίνει τη δημιουργία μιας διαφορετικής διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη, οπότε την πρόσδεση του αντισώματος πάνω στις καρβοξυλικές ομάδες του άνθρακα. Η αύξηση της αντίστασης πόλωσης του συστήματος επιβεβαιώθηκε με προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων σε κύκλωμα Randles, το οποίο αποτελείται από μια αντίσταση ( $R_s$ ) σε σειρά με ένα σύστημα, το οποίο περιέχει ένα πυκνωτή ( $C_d$ ) και την αντίσταση πόλωσης (R<sub>p</sub>) συνδεδεμένα παράλληλα (Εικ.1.10). Σε κάθε στάδιο κατασκευής η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια καθιστά πιο δύσκολη τη μεταφορά φορτίων, αυξάνοντας την αντίσταση πόλωσης του συστήματος

Από τη μελέτη της επίδρασης δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων του αντισώματος της κορτιζόλης, 0.004mg/ml και 0.7mg/ml, στην απόδοση του βιοαισθητήρα, βρέθηκε ότι ο βιοαισθητήρας ο οποίος έχει κατασκευαστεί με αντίσωμα συγκέντρωσης 0.7mg/ml, εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην κορτιζόλη. Αυτό

77

#### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΑΝΘΡΑΚΑ

υποδεικνύει ότι η βέλτιστη συγκέντρωση αντισώματος για την κατασκευή του βιοαισθητήρα είναι 0.7mg/ml.

Στη συνέχεια, επιβεβαιώθηκε η απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη, μέσω σύγκρισης της απόκρισης του βιοαισθητήρα με αυτήν ενός μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου άνθρακα. Ο βιοαισθητήρας αποκρίνεται στην κορτιζόλη μεταβάλλοντας την εμπέδηση του συστήματος. Ο βιοαισθητήρας που κατασκευάστηκε αποκρίνεται στην κορτιζόλη σε εύρος συγκεντρώσεων κορτιζόλης από 5.8 έως 464ng/ml. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της κορτιζόλης μειώνεται η αντίσταση πόλωσης του συστήματος, γεγονός που σημαίνει τη δημιουργία μιας διαφορετικής διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη σε κάθε διαφορετική συγκέντρωση της κορτιζόλης. Η πιο πιθανή εξήγηση που προτείνεται για τη μείωση της αντίστασης πόλωσης είναι ότι με την προσθήκη της κορτιζόλης, σχηματίζεται μια καινούργια διεπιφάνεια στην οποία η κορτιζόλη, κατά την πρόσδεση στο αντίσωμα της, προκαλεί αλλαγή στη διάταξη του αντισώματος στο χώρο. Αυτό οδηγεί σε μια πιο «σφικτή» διαμόρφωση του αντισώματος, η οποία καθιστά πιο εύκολη τη μεταφορά φορτίων, προκαλώντας μείωση στην αντίσταση πόλωσης του συστήματος.

Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι η απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη προέρχεται από το αντίσωμα και όχι από τυχόν τυχαίες αλληλεπιδράσεις της επιφάνειας του άνθρακα με την κορτιζόλη, ενώ από τη μελέτη της επαναληψιμότητας κατασκευής του βιοαισθητήρα βρέθηκε ότι η επί τοις εκατό τυπική σχετική απόκλιση (%RSD) του πραγματικού μέρους της εμπέδησης (-Z') σε συχνότητα 0.50Hz είναι ίση με 9.2% (n=3), τιμή η οποία μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητική για τα συστήματα των βιοαισθητήρων.

78

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Στην παρούσα εργασία επιτεύχθηκε η ανάπτυξη βιοαισθητήρα κορτιζόλης σε δυο διαφορετικά εκτυπωμένα ηλεκτρόδια, χρυσού και άνθρακα. Τα χαρακτηριστικά και η παρακολούθηση της απόκρισης του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη μελετήθηκαν με την τεχνική της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS.

Η μελέτη ξεκίνησε με τον έλεγχο της ενεργότητας του μονοκλωνικού αντισώματος κορτιζόλης. Διαπιστώθηκε με τη μέθοδο της ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (ELISA), ότι το αντίσωμα ήταν ενεργό και είχε υψηλή εξειδίκευση στην κορτιζόλη, επομένως μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιομόριο για την κατασκευή του βιοαισθητήρα κορτιζόλης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ανάπτυξης βιοαισθητήρα κορτιζόλης βασισμένος σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού. Διαπιστώθηκε ότι ο καθαρισμός της επιφάνειας του χρυσού πριν τη χημική του τροποποίηση είναι αναγκαίος για την πρόσδεση των θειολών στο χρυσό, καθώς σε ηλεκτρόδιο στο οποίο δεν πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της επιφάνειας του χρυσού δεν προσδέθηκαν τα μόρια των θειολών, σε αντίθεση με ηλεκτρόδιο στο οποίο πραγματοποιήθηκε, όπου επετεύχθη η παραπάνω πρόσδεση. Η πρόσδεση των θειολών στο χρυσό επιβεβαιώθηκε μέσω μεταβολής στην εμπέδηση του συστήματος.

Επιβεβαιώθηκε η διαδοχική πρόσδεση των μορίων σε κάθε στάδιο κατασκευής του βιοαισθητήρα, συγκεκριμένα προσδέθηκαν τα μόρια του 11-MUA, σχηματίστηκαν οι εστέρες του NHS και ακινητοποιήθηκε το αντίσωμα της κορτιζόλης. Σε κάθε στάδιο κατασκευής μεταβάλλονταν η εμπέδηση του συστήματος, υποδηλώνοντας τη δημιουργία μιας διαφορετικής διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη και συνεπώς τη διαδοχική πρόσδεση των μορίων σε κάθε στάδιο κατασκευής. Σε κάθε στάδιο κατασκευής η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια καθιστά πιο δύσκολη τη μεταφορά φορτίων, αυξάνοντας την αντίσταση πόλωσης του συστήματος.

Από τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συνθηκών της πειραματικής διαδικασίας και συγκεκριμένα, δυο διαφορετικών τρόπων προσθήκης και δυο διαφορετικών χρόνων επώασης του διαλύματος EDC-NHS, αποδείχτηκε ότι ο βέλτιστος χρόνος επώασης του διαλύματος EDC-NHS είναι οι 3h και ο βέλτιστος τρόπος προσθήκης

του διαλύματος EDC-NHS είναι η εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε 4ml διαλύματος EDC και στη συνέχεια η προσθήκη 0.1159gr NHS. Ο βιοαισθητήρας ο οποίος είχε κατασκευαστεί με αυτές τις συνθήκες εμφάνισε μεγαλύτερη ευαισθησία στην κορτιζόλη, επομένως οι συνθήκες αυτές αποτελούν τις βέλτιστες για την κατασκευή του βιοαισθητήρα.

Στο επόμενο κεφάλαιο, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ανάπτυξης βιοαισθητήρα κορτιζόλης βασισμένος σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα. Αρχικά, διαπιστώθηκε η διαδοχική πρόσδεση των μορίων σε κάθε στάδιο κατασκευής του βιοαισθητήρα, και πιο συγκεκριμένα σχηματίστηκαν οι εστέρες του NHS και ακινητοποιήθηκε το αντίσωμα της κορτιζόλης πάνω στην επιφάνεια του άνθρακα. Σε κάθε στάδιο κατασκευής μεταβάλλονταν η εμπέδηση του συστήματος, υποδηλώνοντας τη δημιουργία μιας διαφορετικής διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη και επομένως τη διαδοχική πρόσδεση των μορίων σε κάθε στάδιο κατασκευής. Σε κάθε στάδιο κατασκευής του διοαισθητήρα, και ακινητοποιήθηκε το αντίσωμα της κορτιζόλης πάνω στην επιφάνεια του άνθρακα. Σε κάθε στάδιο κατασκευής μεταβάλλονταν η εμπέδηση του συστήματος, υποδηλώνοντας τη δημιουργία μιας διαφορετικής διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη και επομένως τη διαδοχική πρόσδεση των μορίων σε κάθε στάδιο κατασκευής. Σε κάθε στάδιο κατασκευής η σχηματιζόμενη διεπιφάνεια καθιστά πιο δύσκολη τη μεταφορά φορτίων, αυξάνοντας την αντίσταση πόλωσης του συστήματος.

Από τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συνθηκών της πειραματικής διαδικασίας και συγκεκριμένα δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων του αντισώματος της κορτιζόλης, 0.004mg/ml και 0.7mg/ml, αποδείχτηκε ότι ο βιοαισθητήρας ο οποίος έχει κατασκευαστεί με αντίσωμα συγκέντρωσης 0.7mg/ml, εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην κορτιζόλη, άρα η βέλτιστη συγκέντρωση αντισώματος για την κατασκευή του βιοαισθητήρα είναι 0.7mg/ml.

Διαπιστώθηκε ότι και οι δυο βιοαισθητήρες στα δυο διαφορετικά εκτυπωμένα ηλεκτρόδια, χρυσού και άνθρακα, αποκρίνονται στην κορτιζόλη μεταβάλλοντας την εμπέδηση του συστήματος. Ο βιοαισθητήρας που κατασκευάστηκε σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού αποκρίνεται στην κορτιζόλη στο εύρος συγκεντρώσεων κορτιζόλης που δοκιμάστηκαν, από 0.1 έως 10ng/ml. Ο βιοαισθητήρας που κατασκευάστηκε σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα αποκρίνεται στην κορτιζόλη στο εύρος συγκεντρώσεων κορτιζόλης που δοκιμάστηκαν, από 5.8 έως 464ng/ml. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της κορτιζόλης μειώνεται η αντίσταση πόλωσης του συστήματος και στους δυο βιοαισθητήρες, στις δυο διαφορετικές επιφάνειες, χρυσού και άνθρακα. Το γεγονός αυτό σημαίνει τη δημιουργία μιας διαφορετικής διεπιφάνειας μεταξύ ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη σε κάθε διαφορετική συγκέντρωση

80

της κορτιζόλης. Η πιο πιθανή εξήγηση που προτείνεται για τη μείωση της αντίστασης πόλωσης είναι ότι με την προσθήκη της κορτιζόλης, σχηματίζεται μια καινούργια διεπιφάνεια στην οποία η κορτιζόλη, κατά την πρόσδεση στο αντίσωμα της, προκαλεί αλλαγή στη διάταξη του αντισώματος στο χώρο. Αυτό οδηγεί σε μια πιο «σφικτή» διαμόρφωση του αντισώματος, η οποία καθιστά πιο εύκολη τη μεταφορά φορτίων, προκαλώντας μείωση στην αντίσταση πόλωσης του συστήματος.

Διαπιστώθηκε και στους δυο βιοαισθητήρες κορτιζόλης στα δυο διαφορετικά εκτυπωμένα ηλεκτρόδια, χρυσού και άνθρακα, ότι η απόκριση του βιοαισθητήρα στην κορτιζόλη προέρχεται από το αντίσωμα και όχι από τυχόν τυχαίες αλληλεπιδράσεις της επιφάνειας του άνθρακα με την κορτιζόλη.

Τέλος, από τη μελέτη της επαναληψιμότητας κατασκευής του βιοαισθητήρα βρέθηκε ότι στο βιοαισθητήρα κορτιζόλης σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού, η επί τοις εκατό τυπική σχετική απόκλιση (%RSD) της αντίστασης πόλωσης είναι ίση με 28% (n=3), συνεπώς για την εφαρμογή του βιοαισθητήρα θα χρειαστεί περαιτέρω βελτιστοποίηση το σύστημα του βιοαισθητήρα. Αντίθετα, στο βιοαισθητήρα κορτιζόλης σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα η επί τοις εκατό τυπική σχετική απόκλιση (%RSD) του πραγματικού μέρους της εμπέδησης (-Z') σε συχνότητα 0.50Hz είναι ίση με 9.2% (n=3), τιμή η οποία μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητική για τα συστήματα των βιοαισθητήρων.

Συνοψίζοντας, ο βιοαισθητήρας κορτιζόλης κατασκευάστηκε με επιτυχία στα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια χρυσού και άνθρακα, με τον άνθρακα να αποτελεί καταλληλότερο υπόστρωμα για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα κορτιζόλης με μεγαλύτερη επαναληψιμότητα κατασκευής.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούν να αποτελέσουν την βάση για την περαιτέρω βελτιστοποίηση των δυο βιοαισθητήρων κορτιζόλης, είτε σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού είτε σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα. Επόμενο βήμα για το βιοαισθητήρα κορτιζόλης σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού αποτελεί η περαιτέρω μελέτη του καθαρισμού της επιφάνειας του, συγκεκριμένα και με άλλους τρόπους, όπως με το διάλυμα piranha (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, σε αναλογία 3:1) ή με ηπιότερους ηλεκτροχημικούς τρόπους με εφαρμογή τάσης (π.χ σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS). Για το βιοαισθητήρα κορτιζόλης σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα επόμενο βήμα αποτελεί η τροποποίηση της επιφάνεια του άνθρακα χωρίς να έχει προηγηθεί καμία τεχνική καθαρισμού ή ενώ έχει προηγηθεί εφαρμογή ηπιότερων ηλεκτροχημικών τρόπων καθαρισμού της επιφάνειας του άνθρακα. Επιπροσθέτως, μελλοντικό στόχο αποτελεί η ποσοτικοποίηση της κορτιζόλης στο πλάσμα ιχθύων από το βελτιστοποιημένο σύστημα του βιοαισθητήρα κορτιζόλης σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο χρυσού και από το βιοαισθητήρα κορτιζόλης σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα.

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Clark LC, Lyons C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. Ann N Y Acad Sci. 1962;102(1):29-45. doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x
- Sassolas A, Blum LJ, Leca-Bouvier BD. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol Adv.* 2012;30(3):489-511. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.003
- 3. Thevenot D, Toth K, Durst R, Wilson G. Electrochemical biosensors : Recommended definitions and classification. 2014.
- 4. Byfield MP, Abuknesha RA. Biochemical aspects of biosensors. *Biosens Bioelectron*. 1994;9(4-5):373-399. doi:10.1016/0956-5663(94)80038-3
- Cowley RA. Reports on Progress in Physics Related content. *Rep Prog Phys.* 1963;59:1665-1735. doi:10.1088/0034-4885/77/5/056502
- 6. J. M. Berg, J. Tymoczko LS. *Βιοχημεία*.; 2017.
- 7. Γηρούση Σ. Βιοαισθητήρες.; 2015.
- 8. Γ.Θεοδωρίδης. Ανοσοχημικές Τεχνικές Ανάλυσης.; 2015.
- Stradiotto NR, Yamanaka H, Zanoni MVB. Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. *J Braz Chem Soc.* 2003;14(2):159-173. doi:10.1590/S0103-50532003000200003
- Προδρομίδης Μ. Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες Και Βιοαισθητήρες. Ιωάννινα;
  2010.
- 11. B.R.Eggins. Chemical Sensors and Biosensors, John Wiley & Sons.; 2002.
- Μ. Προδρομίδης. *Https://Docplayer.Gr/32063298-Himikoi-Aisthitires-Vioaisthitires-Mamantos-Prodromidis.Html*,20/07/2020.
- 13. K. Drauz HW. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. 2nd ed.; 2002.
- 14. Sekar M, Pandiaraj M, Bhansali S, Ponpandian N, Viswanathan C. Carbon

fiber based electrochemical sensor for sweat cortisol measurement. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-14. doi:10.1038/s41598-018-37243-w

- Omar A, Rashid J, Latif A. Development of cortisol immunosensor based reduced graphene oxide (rGO) for future application in monitoring stress levels among military personnel. *Def S T Tech Bull*. 2017;10(2):142-149.
- 16. McCreery RL. Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chem Rev.* 2008;108(7):2646-2687. doi:10.1021/cr068076m
- Gao Y, Kyratzis I. Covalent immobilization of proteins on carbon nanotubes using the cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide- a Critical Assessment. *Bioconjug Chem.* 2008;19(10):1945-1950. doi:10.1021/bc800051c
- Chuang C, M S. Label free impedance biosensors for point of care diagnostics. 2001:162-173.
- Chakraborty A, Tibarewala DN, Barui A. Impedance-Based Biosensors. Elsevier Ltd; 2019. doi:10.1016/B978-0-08-102420-1.00005-4
- 20. Marinesco S, Dale N. Microelectrode Biosensors. *Neuromethods*. 2013;80(2016):179-199. doi:10.1007/978-1-62703-370-1
- Santos A. Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. J Anal Bioanal Tech. 2014;S7(012). doi:10.4172/2155-9872.s7-016
- Daniels JS, Pourmand N. Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges. *Electroanalysis*. 2007;19(12):1239-1257. doi:10.1002/elan.200603855
- 23. B.Eggins. Biosensors an Introduction. New York; 1997.
- Perdomo J, Sundermeier C, Hinkers H, Martínez Morell O, Seifert W, Knoll M. Containment sensors for the determination of L-lactate and glucose. *Biosens Bioelectron*. 1999;14(1):27-32. doi:10.1016/S0956-5663(98)00104-3
- 25. Mehrvar M, Abdi M. Recent developments, characteristics, and potential

applications of electrochemical biosensors. *Anal Sci.* 2004;20(8):1113-1126. doi:10.2116/analsci.20.1113

- Kivirand K, Min M, Rinken T. Challenges and Applications of Impedance-Based Biosensors in Water Analysis. *Biosens Environ Monit.* 2019. doi:10.5772/intechopen.89334
- Wu H, Ohnuki H, Hibi K, Ren H, Endo H. Development of a label-free immunosensor system for detecting plasma cortisol levels in fish. *Fish Physiol Biochem*. 2016;42(1):19-27. doi:10.1007/s10695-015-0113-2
- Radhakrishnan R, Suni II, Bever CS, Hammock BD. Impedance biosensors: Applications to sustainability and remaining technical challenges. ACS Sustain Chem Eng. 2014;2(7):1649-1655. doi:10.1021/sc500106y
- Rodriguez-Mozaz S, Marco MP, Lopez De Alda MJ, Barceló D. Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: A review article. *Anal Bioanal Chem.* 2004;378(3):588-598. doi:10.1007/s00216-003-2385-0
- 30. Mishra GK, Barfidokht A, Tehrani F, Mishra RK. Food safety analysis using electrochemical biosensors. *Foods*. 2018;7(9). doi:10.3390/foods7090141
- Vasilescu A, Fanjul-Bolado P, Titoiu AM, Porumb R, Epure P. Progress in electrochemical (bio)sensors for monitoring wine production. *Chemosensors*. 2019;7(4). doi:10.3390/chemosensors7040066
- 32. https://www.arborassays.com/cortisol\_2016/,15/07/2020.
- 33. Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: Evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2011;301(1). doi:10.1152/ajpendo.00100.2011
- 34. *Https://Www.Medicinenet.Com/Script/Main/Art.Asp?Articlekey=20104, 20/07/2020.*
- 35. Guyton and Hall. Ιατρική Φυσιολογία.
- 36. *Https://Adrenalfatigue.Org/Cortisol-Adrenal-Function/, Wilson, 20/07/2020.*
- 37. Rice P, Upasham S, Jagannath B, Manuel R, Pali M, Prasad S. CortiWatch:

Watch-based cortisol tracker. *Futur Sci OA*. 2019;5(9). doi:10.2144/fsoa-2019-0061

- 38. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids Author (s): Bruce A. Barton Source: Integrative and Comparative Biology, Vol. 42, No. 3 (Jun., 2002), pp. 517-525 Published by: Ox. 2016;42(3):517-525.
- Schreck CB, Tort L. *The Concept of Stress in Fish*. Vol 35. First Edit. Elsevier Inc.; 2016. doi:10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1
- 40. Wendelaar E, Introduction I, Axis C, et al. The Stress Response in Fish. 2018;77(3).
- 41. Balasch JC, Tort L. Netting the stress responses in fish. *Front Endocrinol* (*Lausanne*). 2019;10(FEB):1-12. doi:10.3389/fendo.2019.00062
- 42. Group FB, Building GK, Buildings K, et al. Current issues in fish welfare. *J Fish Biol.* 2006;44(2018):332-372. doi:10.1111/j.1095-8649.2005.01046.x
- 43. Φανουράκη Ε. Μελέτη της καταπόνησης και ανάπτυξη μη-επεμβατικής μεθόδου προσδιορισμού της ελεύθερης κορτιζόλης στο Μελέτη της καταπόνησης και ανάπτυξη μη-επεμβατικής μεθόδου θαλασσινό νερό σε μεσογειακά είδη ιχθύων, με έμφαση στο προσδιορισμού της ελεύθερης κορτιζόλης. 2010.
- 44. Τεχνικό Παράρτημα Έργου: Ανάπτυζη Και Αζιολόγηση Σε Βιομηχανική Κλίμακα Καινοτόμου Συστήματος Αλίευσης Και Εκτίμησης Της Ευζωίας Σε Θαλασσινά Είδη Ιχθυοκαλλιέργειας.
- Ahmed Z, Donkor O, Street WA, Vasiljevic T. Calpains- and cathepsinsinduced myofibrillar changes in post-mortem fish: Impact on structural softening and release of bioactive peptides. *Trends Food Sci Technol*. 2015;45(1):130-146. doi:10.1016/j.tifs.2015.04.002
- 46. *Https://Medical-Dictionary.Thefreedictionary.Com/Animal+welfare.*
- 47. Pottinger T. Differences in plasma cortisol and cortisone dynamics during stress in two strains of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *J Fish Biol.*

1993;43(1):121-130. doi:10.1006/jfbi.1993.1114

- 48. Fanouraki E, Mylonas CC, Papandroulakis N, Pavlidis M. Species specificity in the magnitude and duration of the acute stress response in Mediterranean marine fish in culture. *Gen Comp Endocrinol.* 2011;173(2):313-322. doi:10.1016/j.ygcen.2011.06.004
- 49. Skoog D. A. HFJ. Principles of Instrumental Analysis.
- 50. Velasco-Santamaría Y, Cruz-Casallas P. Methodology for determination of plasma cortisolin fish using competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Rev MVZ Córdoba*. 2007;12(1):869-877. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0122-02682007000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- Arya SK, Chornokur G, Venugopal M, Bhansali S. Antibody functionalized interdigitated μ-electrode (IDμE) based impedimetric cortisol biosensor. *Analyst.* 2010;135(8):1941-1946. doi:10.1039/c0an00242a
- Pottinger TG, Moran TA, Cranwell PA. The biliary accumulation of corticosteroids in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, during acute and chronic stress. *Fish Physiol Biochem*. 1992;10(1):55-66. doi:10.1007/BF00004654
- 53. Laidley CW, Leatherland JF. Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weight in rainbow trout, Salmo gairdneri richardson. Comp Biochem Physiol -- Part A Physiol. 1988;89(3):495-502. doi:10.1016/0300-9629(88)91063-8
- Sun K, Ramgir N, Bhansali S. An immunoelectrochemical sensor for salivary cortisol measurement. *Sensors Actuators, B Chem.* 2008;133(2):533-537. doi:10.1016/j.snb.2008.03.018
- Sekar M, Sriramprabha R, Sekhar PK, et al. Review—Towards Wearable Sensor Platforms for the Electrochemical Detection of Cortisol. *J Electrochem* Soc. 2020;167(6):067508. doi:10.1149/1945-7111/ab7e24

- 56. Kinnamon D, Ghanta R, Lin KC, Muthukumar S, Prasad S. Portable biosensor for monitoring cortisol in low-volume perspired human sweat. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-13. doi:10.1038/s41598-017-13684-7
- Yamaguchi M, Matsuda Y, Sasaki S. Immunosensor with fluid control mechanism for salivary cortisol analysis. *Biosens Bioelectron*. 2013;41(1):186-191. doi:10.1016/j.bios.2012.08.016
- Wu H, Ohnuki H, Ota S, Murata M, Yoshiura Y, Endo H. New approach for monitoring fish stress: A novel enzyme-functionalized label-free immunosensor system for detecting cortisol levels in fish. *Biosens Bioelectron*. 2017;93:57-64. doi:10.1016/j.bios.2016.10.001
- Pali M, Garvey JE, Small B, Suni II. Detection of Fish Hormones by Electrochemical Impedance Spectroscopy and Quartz Crystal Microbalance. Vol 13. Elsevier B.V; 2017. doi:10.1016/j.sbsr.2017.01.001
- Singh A, Kaushik A, Kumar R, Nair M, Bhansali S. Electrochemical Sensing of Cortisol: A Recent Update. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;174(3):1115-1126. doi:10.1007/s12010-014-0894-2
- 61. http://www.gwent.org/gem\_biosensors.html,15/07/2020.
- 62. https://www.nanochemazone.com/product/nanostructured-carbon-screenprinted-electrodes/,15/07/2020.
- 63. Βαμβακάκη Β. Σταθεροποίηση βιομορίων σε νανοδομές για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. 2005;1(60).
- 64. McMurry J. Οργανική Χημεία.
- 65. Ali M. Raman Characterization of Structural Properties of Thermally Modified Nanographite .
- 66. Power A., B. Gorey, S. Chandra JC. Carbon nanomaterials and their application to electrochemical sensors. 2011.
- 67. Yan QL, Gozin M, Zhao FQ, Cohen A, Pang SP. Highly energetic compositions based on functionalized carbon nanomaterials. *Nanoscale*.

2016;8(9):4799-4851. doi:10.1039/c5nr07855e

- Dzenis Y. Spinning continuous fibers for nanotechnology. Science (80-).
  2004;304(5679):1917-1919. doi:10.1126/science.1099074
- 69. Gold Physical, Mechanical, Thermal, and Electrical Properties.
- 70. http://gold.yabz.com/facts.htm, 15/07/2020.
- 71. https://eng.thesaurus.rusnano.com/wiki/article1643?sphrase\_id=6504, 15/07/2020.
- 72. Cortisol ELISA Kit, Item No. 500360. 2018;700592:1-7.
- 73. Dobson PJ. The surface structure of gold. *Gold Bull*. 1974;7(1):15-19. doi:10.1007/bf03215028
- Fouskaki M, Chaniotakis N. Fullerene-based electrochemical buffer layer for ion-selective electrodes. *Analyst.* 2008;133(8):1072-1075. doi:10.1039/b719759d
- 75. Ouerghi O, Touhami A, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Ouada H Ben, Cosnier S. Impedimetric immunosensor using avidin-biotin for antibody immobilization. *Bioelectrochemistry*. 2002;56(1-2):131-133. doi:10.1016/S1567-5394(02)00029-4
- Berggren C, Bjarnason B, Johansson G. Capacitive biosensors. *Electroanalysis*. 2001;13(3):173-180. doi:10.1002/1521-4109(200103)13:3<173::AID-ELAN173>3.0.CO;2-B
- 77. Tuteja SK, Ormsby C, Neethirajan S. Noninvasive Label-Free Detection of Cortisol and Lactate Using Graphene Embedded Screen-Printed Electrode. *Nano-Micro Lett.* 2018;10(3):1-10. doi:10.1007/s40820-018-0193-5