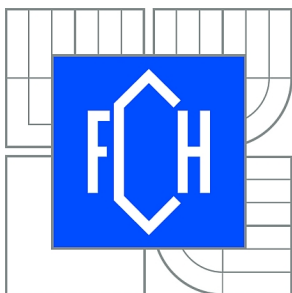




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

VÝZNAM BIOSENZORŮ A BIOMARKERŮ PRO POSUZOVÁNÍ KONTAMINACE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

IMPORTANCE OF BIOSENSORS AND BIOMARKERS FOR ENVIRONMENT CONTAMINATION
ASSESSMENT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MILAN MIŠO

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. HELENA ZLÁMALOVÁ
GARGOŠOVÁ, Ph.D.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0580/2010** Akademický rok: **2010/2011**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Milan Mišo**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)
Vedoucí práce: **MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Význam biosenzorů a biomarkerů pro posuzování kontaminace životního prostředí

Zadání bakalářské práce:

Formou literární rešerše bude zpracována problematika využití různých typů biosenzorů při posuzování znečištění životního prostředí. Dále budou zpřehledněny základní biochemické, fyziologické a histologické indikátory expozice xenobiotiky na živé organismy tzv. biomarkery a jejich význam pro odhad kontaminace ekosystému.

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Milan Mišo
Student(ka)

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca je čisto teoretického charakteru. Je zameraná na vysvetlenie princípu a podstaty fungovania biosenzorov a biomarkerov, ich vlastnosti, rozdelenie a využitie pri posudzovaní kontaminácii životného prostredia. Ďalej popisuje ich praktické použitie. V prvej časti bakalárskej práce sú popísané biosenzory. Biosenzory sú kombináciou biorekogničnej molekuly a vhodného prevodníku, tato kombinácia umožňuje previesť (bio)chemickú informáciu na elektrický signál, ktorý je možné ľahko zmerať a preto sú stále viac využívané k stanoveniu rôznych látok. V druhej časti sú popísané včasné varovné signály, takzvané biomarkery. Biomarkery poskytujú informácie o zmenách v ekosystéme skôr ako je ešte nenávratne poškodený a môžeme včas zasiahnuť.

ABSTRACT

This bachelor thesis is purely theoretical. It aims to explain the principle and nature of operation of biosensors and biomarkers, their properties, distribution and use in the assessment of environmental contamination. It describes their practical use. In the first part of the thesis are described biosensors. Biosensors combine biorecognition molecules and a suitable converter, this combination allows you to convert (bio)chemical information into electrical signals that can be easily measured and therefore are becoming more used for determination of different substances. The second section describes the early warning signs called biomarkers. Biomarkers provide information on changes in the ecosystem before it is irreversibly damaged, and we can intervene early.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Biosenzory, biomarkery, kontaminácia životného prostredia

KEYWORDS

Biosensors, biomarkers, contamination of environment

MIŠO, M. *Význam biosenzorů a biomarkerů pro posuzování kontaminace životního prostředí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 34 s. Vedoucí bakalářské práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

Pod'akovanie:

*Tu by som rád pod'akoval vedúcemu
mojej bakalárskej práce MVDr.
Helene Zlámalovej Gargošovej, Ph.D.
za cenné rady a pomoc pri jej
vypracovaní. Ďakujem.*

OBSAH

1 ÚVOD.....	7
2 CIELE PRÁCE	8
3 BIOSENZORY	9
3.1 Definícia biosenzorov.....	9
3.2 História biosenzorov.....	10
3.3 Vlastnosti biosenzorov	10
3.3.1 Citlivosť.....	10
3.3.2 Kalibrácia.....	11
3.3.3 Rýchlosť odozvy.....	11
3.3.4 Doba odozvy.....	11
3.3.5 Selektivita	11
3.3.6 Životnosť biosenzorov.....	11
3.4 Využitie biosenzorov v životnom prostredí.....	11
3.5 Rozdelenie biosenzorov podľa fyzikálno-chemického prevodníku	12
3.5.1 Elektrochemické biosenzory.....	12
3.5.2 Optické biosenzory	13
3.5.3 Kalorimetrické biosenzory	14
3.5.4 Piezo-elektrické biosenzory.....	14
3.6 Rozdelenie biosenzorov podľa biologickej zložky.....	14
3.6.1 Enzýmové biosenzory.....	14
3.6.2 Mikrobiálne a tkanivové elektródy.....	15
3.6.3 Imunosenzory	16
3.7 Podmienky merania s biosenzormi a použitie v praxi.....	17
4 BIOMARKERY	20
4.1 Definícia biomarkerov.....	20
4.2 História biomarkerov.....	21
4.3 Vlastnosti a výhody použitia biomarkerov	21
4.4 Rozdelenie biomarkerov.....	22
4.4.1 Biomarkery expozície.....	23
4.4.2 Biomarkery účinku	25
4.4.3 Biomarkery citlivosti	26

4.5 Podmienky merania s biomarkermi a použitie v praxi	27
4.6 Obmedzenie použitia biomarkerov pri monitorovaní znečistenia.....	27
5 ZÁVER.....	29
6. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	30
7. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK, SYMBOLOV, KONŠTÁNT.....	33
8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK CHEMICKÝCH NÁZVOV	34

1 ÚVOD

Každý deň sa dostávajú chemické látky do životného prostredia bez toho aby bola známa ich toxicita, ich účinky a dopad na zdravie jedinca či celej populácie v ekosystéme. Veľa látok prítomných v zložkách životného prostredia pôsobí na hormonálny systém organizmov rôznymi mechanizmami. K zisteniu týchto látok v environmentálnom prostredí sa okrem chemických analýz používajú najrôznejšie biotesty. Za špecifické typy biotestov je možné považovať aj biosenzory.

Vývoj a využitie biosenzorov je progresívny analytický odbor, ktorý v sebe zahŕňa poznatky z oblasti biológie, chémie, fyziky a matematiky. Svojimi aplikačnými výstupmi zasahuje do oblastí fermentačného, potravinárskeho a farmaceutického priemyslu, do analytickej chémie, poľnohospodárstva, medicíny, životného prostredia i petrochémie. Biosenzor je zariadenie, ktoré pozostáva z biologickej časti, ktorá sa nachádza v tesnom kontakte s fyzikálno-chemickým prevodníkom, alebo je súčasťou prevodníka. Výsledkom takéhoto usporiadania je elektronický signál, ktorý je proporcionálny koncentrácii analytu. Spojenie týchto dvoch odlišných oblastí kombinuje v sebe špecifickosť a senzitivitu biologického systému so silou elektrotechniky a počítačovej techniky. Takýmto analytickým zariadením sa rozšíri špecifickosť i rozsah stanoviteľných substrátov oproti senzorum založeným na princípe fyzikálno-chemického prevodníka. Rôznymi kombináciami biologickej časti s prevodníkom možno docieľiť veľké množstvo rôznych konštrukcií [1].

Toxické látky, ktoré sa dostávajú do životného prostredia môžu organizmy, populácie ale aj celé spoločenstvá poškodiť ešte skôr ako sme schopní tieto poškodenia odhaliť klasickými ekotoxikologickými testami. Na rozpoznanie biochemických a bunkových mechanizmov toxicity sa v ekotoxikologických testoch využívajú biomarkery, ktoré poskytujú včasné varovné signály potenciálneho poškodenia organizmu alebo celej populácie aj bez morfológických zmien. Biomarkery umožňujú aj zistenie zmien bunkových alebo biochemických zložiek, štruktúr alebo funkcií vyvolaných cudzorodými látkami, ktoré sú merateľné v biologickej zložke. Poskytujú citlivé a rýchle odpovede poukazujúce na mechanizmus účinku, ktorý predchádza viditeľným symptómom toxicity. Biomarkery sú najlepšie preštudované u vyšších živočíchov (cicavce, ryby) ale dajú sa sledovať aj pri organizmoch používaných v štandardných akvatických biotestoch (riasy, makrofýta, bezstavovce) [2].

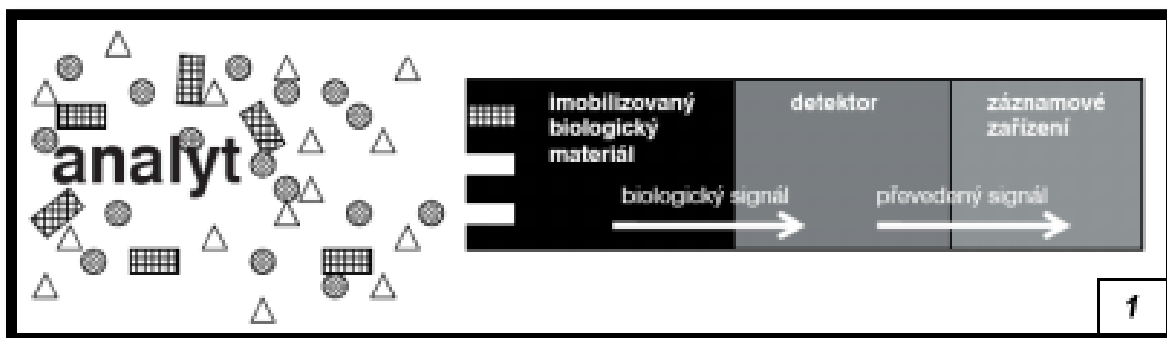
2 CIELE PRÁCE

Formou literárnej rešerše spracovať problematiku využitia rôznych typov biosenzorov pri posudzovaní znečistenia životného prostredia. Ďalej sprehľadnenie základných biochemických, fyziologických a histologických indikátorov na žive organizmy, takzvané biomarkery a ich význam pre odhad kontaminácie ekosystému.

3 BIOSENZORY

3.1 Definícia biosenzorov

Biosenzor je analytický prístroj obsahujúci citlivý prvok biologického pôvodu, ktorý je buď súčasťou alebo v tesnom kontakte s fyzikálno-chemickým prevodníkom. Poskytuje priebežný elektronický signál, ktorý je priamo úmerný koncentrácii jednej alebo viacerým chemickým látkam vo vzorke [3]. Skladá sa z troch hlavných komponentov: biorekogničná časť, prevodník a výstupné zariadenie [4].



Obr. č. 1: Obecné schéma biosenzoru [5]

Biorekogničná časť alebo bioreceptor, je tvorená biologickým prvkom, ktorý je nanosený alebo inak zachytený na povrchu prevodníku. Je to časť, ktorá dáva biosenzoru jeho unikátne vlastnosti selektivity [6, 7]. Ďalej je ju možné deliť do dvoch základných skupín:

- Biokatalytická - analyt podlieha premene v priebehu chemickej reakcie a obvykle vystupuje ako substrát enzýmovej reakcie (enzým, organela, bunka, orgán, organizmus),
- Bioafinitná - analyt je špecifický viazaný vo vznikajúcom afinitnom komplexe (lektín, protilátka, receptor, nukleová kyselina) [3].

Najčastejšie používaným bioreceptorom je enzým. Enzým dokáže rozpoznať špecifickú cieľovú molekulu [4].

Fyzikálno-chemické prevodníky poskytujú najčastejšie elektrický alebo optický signál, ktorý je priamo úmerný koncentrácii analytu vo vzorke [6]. Prevodníky teda poskytujú vhodný signál k ďalšiemu spracovaniu a môžu byť rozdelené do niekoľkých skupín:

- Elektrochemické (potenciometria, amperometria, konduktometria, voltametria)
- Optické (fotometria, fluorimetria, luminometria, nelineárna optika)
- Piezoelektrické a akustické
- Kalorimetrické [3]

Prevodník sa niekedy označuje ako detektor, senzor alebo elektróda. Existuje veľa detektorov, ktoré môžu byť použité v biosenzoroch. Výber je limitovaný typom chemickej interakcie, ktorá prebieha medzi analytom a rekogničnou zložkou [7]. Z dôvodu ich ľahkej konštrukcie a nízkej ceny sú prevodníky najvyužívanejšie. Výhodou optických biosenzorov je možnosť miniaturizácie a ich prispôsobivosť [6].

3.2 História biosenzorov

Prvý chemický senzor bola sklenená *pH* merná elektróda určená k meraniu koncentrácie vodíkových jonov vo forme sondy umiestnenej vo vzorke [7].

V roku 1956 Leland C. Clark Jr., ktorý je považovaný za zakladateľa biosenzorov popísal kyslíkovú elektródu a spoločne v roku 1962 s Lyonsem spojili kyslíkovú elektródu s enzýmom a vytvorili tak glukózovú elektródu. Jednalo sa o glukózový biosenzor, jeho princípom bolo meranie glukózy v krvi u pacientov s cukrovkou [7].



Prvý komerčný biosenzor pre glukózu uviedla na trh úspešná firma Yellow Springs Instrument Company (Ohio) v roku 1975. V tomto roku bolo navrhnuté použitie bakteriálnej bunky miesto enzýmu, čím sa začína rozvoj výskumu biosenzorov v Japonsku a vôbec na poli biotechnológie a ochrany životného prostredia. O rok neskôr Clemens začlenil glukózový senzor do systému umelého pankreasu uvedeného na trh firmou Miles ako Biostator, firma La Roche zase zaviedla biosenzor pre laktát LA 640 s umelým mediátorom ferrikyanidom. Ďalším medzníkom bol rok 1982, keď Schichiri popísal implantovateľný glukózový biosenzor - ihlovou enzýmovou elektródou. Doteraz najúspešnejší biosenzor je založený na ferrocene - prenášač elektrónov z oxidoreduktáz na elektródu. Neskôr bol vyvinutý firmou Medisense lacný osobný biosenzor pre domáce meranie krvnej glukózy diabetikmi [3]. Pôvodne mal formát pera, neskôr mal tvar kreditnej karty [8].



Obr. č. 2: Glukometer založený na princípe biosenzoru [9]

Dnes pokračuje explozívny nárast výskumu biosenzorov v celosvetovom merítke. Biosenzory vystupujú z vedeckých laboratórií do reálneho sveta [8].

3.3 Vlastnosti biosenzorov

3.3.1 Citlivosť

Citlivosť biosenzorov vychádza z najnižšej koncentrácie, ktorú je schopný detekovať [7]. Je to konečná ustálená zmena výstupného signálu biosenzoru v dôsledku zmeny koncentrácie analytu [3]. Dynamické rozmedzie je obvykle definované ako pomer najvyššej a najnižšej koncentrácie, ktorú je konkrétna metóda schopná spoľahlivo zmerať [7].

V ideálnom prípade by citlivosť mala byť konštantná po celú dobu životnosti biosenzoru. V reálnych systémoch sa zmeny citlivosti kompenzujú rekalibráciou [3].

3.3.2 Kalibrácia

Kalibrácia spočíva vo vystavení biosenzoru rôznym štandardným roztokom o známej koncentrácii analytu [3].

3.3.3 Rýchlosť odozvy

Rýchlosť odozvy je určená najmä fyzikálnymi vlastnosťami biosenzorov (veľkosť). Závisí na rýchlosti difúzie analytu z okolitého prostredia k povrchu biosenzoru a ďalej na vnútornej difúzii systému. Uplatňujú sa koncentrácie analytu, veľkosť difúzných koeficientov, dĺžka difúzných dráh (počet vrstiev biosenzorov). Z praktického hľadiska je výhodné, pokiaľ je odozva limitovaná difúziou a nie rýchlosťou bioreakcie [3].

3.3.4 Doba odozvy

Doba odozvy sa obvykle určuje ako čas potrebný k dosiahnutiu určitej veľkosti signálu v konečnom ustálenom stave [3].

Ak biorekogničnú časť tvorí enzým, potom celková rýchlosť reakcie je daná koncentráciou enzýmu a substrátu. Ak je biologickou časťou protilátka alebo bioreceptor, kinetika je podobná veľkosti afinitnej konštanty K_a [7].

3.3.5 Selektivita

Odozva biosenzorov by mala byť vyvolaná iba v prítomnosti stanovovanej látky, ostatné látky by sa nemali prejavovať. Prakticky je často nutné rušivé vplyvy eliminovať (zriedenie, konverzia na nerušivé zlúčeniny, prídanie selektívnej bariéry) alebo ich príspevok na meraný signál paralelne určiť iným senzorom. Pri tomto diferenciálnom usporiadaní sa použijú dva rovnaké prevodníky, avšak biorekogničnou vrstvou je pokrytý iba jeden. Druhý slúži ako referenčný, je ho možné pokryť vhodnou indiferentnou vrstvou pre vyrovnanie difúzných podmienok [3].

3.3.6 Životnosť biosenzorov

Životnosť je obvykle limitovaná najslabšou časťou biosenzoru, čo je biorekogničná časť. Pritom je treba odlišiť stabilitu pre skladovanie od operačnej stability, ktorá môže byť závislá na počte a druhu analyzovaných vzoriek. Pre dlhodobé uloženie biosenzoru je obecné vhodné nižšia teplota a skladovanie v suchom stave. Optimálne podmienky je vždy treba hľadať individuálne [3].

3.4 Využitie biosenzorov v životnom prostredí

Využitie biosenzorov je veľmi široké. V životnom prostredí sa používajú hlavne pre zisťovanie kvality ovzdušia, detekcie škodlivín v odpadových vodách, kvality pitnej vody alebo pôdy [5]. V dôsledku rozvoja priemyslu a činnosti človeka boli a sú do životného prostredia vypúšťané nebezpečné látky zo spaľovacích alebo výrobných procesov. Pesticídy, ťažké kovy či PCB spôsobujú všeobecne známe znečistenie životného prostredia. Z dôvodu potreby detekcie týchto látok boli vyvinuté rôzne typy biotestov a chemických analýz. Okrem

tohto testovania je k rýchlemu stanoveniu obecných kvalitatívnych parametrov ako *BSK* (biochemická spotreba kyslíka) a hodnotenie biologického znečistenia patogénnymi organizmami, v súčasnej dobe možné použiť metódy založené na biosenzoroch [10].

Pre organofosfáty a karbamátové pesticídy sa používajú enzymatické biosenzory, na základe činnosti cholin oxidázy a na inhibícii acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy. U ťažkých kovov to sú celobunkové biosenzory, ktoré sú schopne reagovať na veľmi malé množstvá prítomných jontov kovu pomocou luminiscenčných baktérií [11]. Pomocou biosenzorov môžu byť detekované aj ostatné dobre známe kontaminanty ako PCB a dioxiny, fenoly, povrchovo aktívne látky, polycyklické aromatické uhl'ovodíky [12].

Životné prostredie nie je znečistené iba priemyslovým zařízením, ale veľká časť látok pochádza z činnosti človeka, čo nie je možné regulovať. Sú to látky každodenného života (antikoncepčne hormóny, steroidy, antibiotika, saponáty - povrchovo aktívne látky). Tieto látky sú obzvlášť nebezpečné v dôvodu ich hojného používania a pôsobenia na hormonálny systém. Baktérie sa dokonca môžu stať rezistentné voči niektorým prípravkom, hlavne liečivám [12].

3.5 Rozdelenie biosenzorov podľa fyzikálno-chemického prevodníku

3.5.1 Elektrochemické biosenzory

Elektrochemické systémy sú najstaršie a najviac rozšírené typy prevodníkov pre konštrukciu katalytických biosenzorov. Hlavnými výhodami sú jednoduchá konštrukcia meracieho systému, nízke náklady, výborná citlivosť a relatívna nezávislosť na interferencii [3, 13]. Pre zostavenie elektrochemického meracieho systému sú potrebné dve elektródy, pracovná a referenčná. Konštrukčné usporiadanie elektród môže byť veľmi rôznorodé [3].

Elektrochemické biosenzory sú založené na meraní elektrických parametrov: konduktometria, amperometria a potenciometria [14].

a) Konduktometria

Je to metóda založená na meraní elektrickej vodivosti/odporu v roztoku pri použití elektrického pola. Pri elektrochemickej reakcii sú produkované jonty alebo elektróny a tým pádom sa mení aj celková vodivosť. Má relatívne nízku citlivosť [15].

Touto metódou je možné detekovať ťažké kovy a organofosfáty [10].

b) Amperometria

V tejto metóde je meraným parametrom elektrický prúd. Vysoko citlivý biosenzor dokáže detekovať elektroaktívnu látku vyskytujúcu sa v biologickej vzorke. Látkami môžu byť substráty reakcií (O_2 , NADH), produkty (H_2O_2 , benzochinón) alebo elektrochemické mediátory, ktoré môžu priamo prenášať elektróny z enzýmu na povrch pracovnej elektródy [15].

Touto metódou je možné detekovať ťažké kovy, organofosfáty, fenol a jeho deriváty, halogenidy, kyanidy, genotoxické látky, progesteron, povrchovo aktívne látky a stanoviť ich toxicitu [10].

c) Potenciometria

U tohto typu senzoru je meraný elektrochemický potenciál, oxidácia alebo redukcia. Potenciometrické biosenzory sa skladajú z jonovo-selektívnej alebo plynovej elektródy potiahnutej biologickou vrstvou. Meria sa zmena napätia na elektródach, ktorú vyvoláva elektrochemická reakcia vyvolaná biologickým prvkom [15].

Touto metódou je možné detekovať ťažké kovy, kyanidy, povrchovo aktívne látky, znečisťujúce plyny (CO₂) a stanoviť BSK [10].

3.5.2 Optické biosenzory

Základom je interakcia svetelného žiarenia s chemickými látkami. Pre konštrukciu katalytických biosenzorov sa využívajú optické techniky ako absorbanca, fluorescencia a luminiscencia [3].

Sú to druhé najčastejšie používané prevodníky po elektrochemických. Hlavný optický senzor sa skladá zo svetelného zdroja, optických častí generujúcich svetelný paprsok so špecifickými vlastnosťami, modulačného žiarenia, ktoré svetelným lúč smeruje a nakoniec s fotodetektoru [16].

Najčastejšie sa jedná o zmenu farby, ktorú je možno zaznamenať vizuálne alebo za použitia prístroja, spektrofotometricky. Jedná sa o meranie absorbancie pri určitej vlnovej dĺžke. UV-VIS spektroskopia využíva zmeny, ktoré nastávajú v molekulách pri absorpcii žiarenia v rozmedzí vlnových dĺžkach 200 nm až 800 nm. Pokles absorbancie po prechode meracou kvetou je úmerný koncentrácii stanovovanej látky. Pretože absorbanca závisí taktiež na hrúbke vrstvy, sú rozmery meracieho priestoru limitujúcim faktorom. Rozptyl svetla sa obvykle zanedbáva [3, 17].

Fluorescencia je veľmi často využívaná z dôvodu vysokej citlivosti. Absorpcia ultrafialového žiarenia vedie k excitácii z vibračného stavu na základnej elektrónovej hladine na jednu z mnohá vibračných hladín v elektrónovom stave. Fluorescencia sa prejaví pri prechode na základnú elektrónovú hladinu. Výstupná intenzita fluorescencie závisí na kvantovom výťažku a na koncentrácii fluoreskujúcej látky [3, 17].

Luminiscencia je sekundárne žiarenie, ktoré látka vydáva po absorpcii elektromagnetického žiarenia. Chemiluminiscencia nastáva, keď chemická reakcia produkuje elektrónové excitované látky, ktoré emitujú fotóny aby dosiahli základného stavu. V biologických systémoch hovoríme o bioluminiscencii [17].

Najčastejšie používaný optický biosenzor, pre účely detekcie škodlivých látok v životnom prostredí, je optický prevodníky založený na povrchovej plazmovej rezonancii. Sú vhodné pre priame optické zaznamenanie. Svetlo vstupujúce do prístroja je smerované na snímaný povrch a potom sa odráža späť von. Vychádzajúce svetlo z prístroja je potom sledované a sú zaznamenávané zmeny, ktoré na povrchu nastali [15]. Škodlivými látkami, ktoré je možné týmto biosenzorom zaznamenať sú ťažké kovy, pesticídy, herbicídy (atrazin, fenoly, triazin), EDC (hormóny, bisfenol A, alkylfenoly, antibiotiká) [10].

3.5.3 Kalorimetrické biosenzory

Využívajú zmenu teploty v priebehu enzýmovej reakcie. Pri konštrukcii biosenzorov to je skôr okrajová záležitosť, ale existujú niektoré analyty, pre ktoré môžu byť kalorimetrické prevodníky zvlášť vhodné. Medze detekcie bývajú do 10 μ M, rozlíšenie 0,001°C. Prevodníkom je obvykle termistor, jeho odpor R závisí na absolútnej teplote T [3]. Teplotné zmeny sú obvykle dané možnosťami termistoru [14].

Výhodou je, že nevadia prípadné pevné častice vo vzorke, interferujúce látky alebo sfarbenie. K použitiu kalorimetrických biosenzorov sa pristupuje v prípadoch, keď iné metódy môžu byť ťažkopádne [3]. V životnom prostredí ním detekujeme ťažké kovy [10].

3.5.4 Piezo-elektrické biosenzory

Sú prístroje založené na takých materiáloch ako sú kryštály, ktoré vibrujú pod vplyvom elektrického pola. Frekvencia ich oscilácie závisí na ich hrúbke a priereze. Každý kryštál má vlastnú rezonančnú frekvenciu [12, 14].

Pre každý piezo-elektrický kryštál je zmena vo frekvencii úmerná množstvu absorbovaného materiálu až do zmeny okolo 2%. Táto zmena frekvencie je jednoducho detekovaná relatívne jednoduchými elektrickými obvodmi. Využívajú sa pri detekcii organofosfátov, EDC a patogénnych organizmov [15].

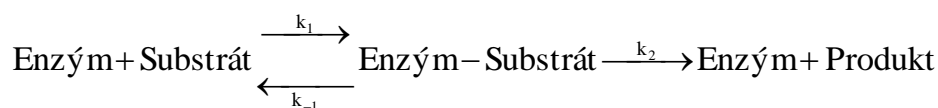
Hlavnou nevýhodou týchto zariadení je interferencia atmosférickej vlhkosti a obtiažnosť ich použitia pre stanovenie analytu vo vzorke. Viac-menej sú lacné, malé a schopné dodávať rýchlu odpoveď [14].

3.6 Rozdelenie biosenzorov podľa biologickej zložky

3.6.1 Enzýmové biosenzory

Biokatalytické senzory majú rekogničný element enzým - bielkovinu schopnú biokatalyticky premeniť určitý špecifický substrát na produkt [3].

Schéma interakcií:



Enzým je často vyberaný ako biorekogničná zložka biosenzorov z veľa dôvodov, hlavne vďaka ich špecifickým väzobným schopnostiam, rovnako ako ich katalytickej aktivite [14]. Používa sa prevažne v purifikovanom stave, avšak je taktiež možné použiť biologický materiál (bunky), obsahujúci v dostatočnom množstve požadovanú enzýmovú aktivitu. Najčastejšie sa používajú iba jeden enzým, niekedy je ale výhodnejšie použiť súčasne dva alebo viacero enzýmov, ktoré navzájom katalyzujú [3].

Analyt u týchto senzorov vystupuje najčastejšie ako substrát imobilizovaného systému. Existuje celá rada rôznych variant fyzikálnych prevodníkov použiteľných pre enzým. Skoro vždy je možné použiť elektródu alebo optický systém [3].

3.6.2 Mikrobiálne a tkanivové elektródy

V týchto biosenzoroch je biochemická zložka v aktívnom živom stave. Jedná sa o mikrobiálne, rastlinné alebo živočíšne bunky, ich bunkové elementy alebo celé tkanivá či orgány. Biokomponent je vo svojom prirodzenom biologickom prostredí, čo je hlavnou výhodou, lebo môže priaznivo ovplyvniť ich aktivitu a stabilitu. Navyše je možné použiť miesto jediného enzýmu celé metabolické reakčné sekvencie, optimalizované prirodzenou cestou. Odpadá taktiež nutnosť izolačných a purifikačných krokov, čo sa priaznivo odrazí na cene. Biosenzory obsahujúce súčasne vedľa mikrobiálnej či tkaninovej zložky ešte izolovaný enzým sa nazývajú hybridnými [3].

Mikrobiálne systémy môžu obsahovať bunky baktérii, siníc či kvasiniek, imobilizované buď na povrchu prevodníku (membránový typ), alebo vo forme predradeného reaktoru [3]. Sú založené na meraní napríklad zmeny pH , ku ktorej môže dôjsť pôsobením škodlivín na metabolizmus mikroorganizmu [7].

Najúspešnejšou aplikáciou biosenzorov z tejto oblasti predstavujú systémy pre rýchle stanovenie biochemickej spotreby kyslíka (*BSK*, angl. *BOD*, biochemical oxygen demand). Oproti klasickému parametru *BSK5* sa môže znečistenie vôd stanoviť omnoho rýchlejšie pomocou biosenzoru tvoreného kyslíkovou elektródou a mikrobiálnou vrstvou. K vhodným mikroorganizmom patria *Trichosporon cutaneum*, *Bacillus subtilis* a *Licheniformis*. Meria sa rýchlosť respirácie po prídavku vzorky, potrebná doba je pritom iba niekoľko minút. Hodnoty stanovené *BOD* biosenzorom sú úmerné parametru *BSK5*, prevodný vzťah sa určí kalibráciu. Štandardnými kalibračnými substrátmi sú obvykle zmes glukózy a kyseliny glutamovej [3].

Ďalšou zaujímavou oblasťou je detekcia toxických látok vo vodných tokoch (azidy, kyanidy, pesticídy, fenoly, ťažké kovy), kde sa využíva inhibície respiračného reťazca alebo fotosyntézy vhodného indikačného mikroorganizmu napríklad *Synecoccus*. Tieto monitorovacie systémy sú vhodné pre nepretržité sledovanie, ale ich nevýhodou je, že nie sú príliš špecifické a majú pomerné nízku citlivosť [3].

Huby a rastliny, ktoré sú veľmi lacným zdrojom môžu byť ďalšou bioregničnou zložkou. Najčastejšie sa využíva šampión ako zdroj tyrosinázy (polyfenol oxidasy) pre stanovenie fenolu. U rastlín je potrebné vždy otestovať, v ktorej časti sa nachádza žiaduca enzýmová aktivita. Používajú sa buď rastúce časti (mladé listy) alebo zásobné časti (plody ovocia a zeleniny) [3].

Rastlinné tkanivo sa používa ako tenký rez prichytený pomocou riedkej sieťky na povrch pracovnej elektródy. Problémom je selektivita odozvy, pretože sú prítomné najrôznejšie enzýmové systémy. Stabilita týchto biosenzorov je radovo týždne až mesiace [3].

Tabuľka č.1: Príklady biosenzorov s rastlinami [3].

Rastlina (použitá časť)	Enzým	Analyt
šampión (plodnica)	tyrosináza	fenoly
zemiak (hľuza)		fenoly
banán (dužina)		dopamín

uhorka (šťava)	askorbát oxidáza	vitamín C, cysteín
chren	peroxidáza	peroxid vodíku
sója	ureáza	močovina
chryzantémy (okvetné listy)		aminokyseliny

Stabilita tkaninových rezov je nižšia ako v rastlinnom systéme. V tabuľke č.2 sú uvedené systémy spojené s NH₃ elektródou [3].

Tabuľka č.2: Príklady biosenzorov s tkanivovými rezmi živočíšneho pôvodu [3].

Použitá časť	Enzým	Analyt
ľadvina (bravčová)	kataláza	glutamín
		glukosamin-6-fosfát
		peroxid vodíku
pečeň (králik)	monoamín OD	katecholamíny
		guanín
sval (králik)		AMP
črevo (myš)		adenozín

Dráždivé bunky ako neuróny a myokardiocyty poskytujú tiež veľmi citlivý zdroj pre monitorovanie určitých analytov. Obzvlášť toxických činiteľov ako sú liečivá a bojové látky s ochromujúcim účinkom na nervovú sústavu. Je ale ťažšie použiť túto techniku v bežnom živote, lebo dráždivé bunky sú dosť nestabilné [7].

Tento typ biosenzorov je obzvlášť užitočný pri stanovení obsahu substancie vo vzorke, ktorá môže byť škodlivá pre bunky, ako k identifikácii špecifických materiálov alebo ich koncentracii [7].

3.6.3 Imunosenzory

Imunochemické afinitné biosenzory používajú ako biorekogničný element protilátku. Využíva sa tu interakcia protilátka - antigén, pričom protilátka je bielkovina schopná špecificky rozpoznať iné molekuly. Antigény bývajú najčastejšie látky z vonkajšieho prostredia [3, 18]. Pre uľahčenie detekcie sa antigény alebo protilátky značia enzýmami, fluorescenčnými zlúčeninami, elektrochemicky aktívnymi substrátmi, rádioaktívnymi nukleotidmi alebo avidin-biotnými komplexmi. Komplex protilátka - antigén je tak možné využiť vo všetkých typoch senzorov. Tieto senzory sa vyznačujú vysokou selektivitou a špecifitou, dokážu stanoviť veľmi malé množstvá látok. Najčastejšími prevodníkmi imunosenzorov sú piezoelektrické a optické systémy [18].

Imunochemické stanovenie má rôzne usporiadanie. Z dôvodu pevných väzieb protilátky s antigénom sú mnohé imunosenzory často iba na jedno použitie. Iné techniky vyžadujú vymývacie kroky k stanoveniu. Medzi tieto metódy patri ELISA (Enzým - Linked Immunoassay), ktorá je najrozšírenejšia a je založená na vzájomnom súťažení voľnej a imobilizovanej protilátky o analyt a umožňuje jeho kvantitatívne stanovenie. Veľmi perspektívna je identifikácia komplexu protilátka - analyt prostredníctvom povrchovej plazmovej rezonancie, ktorá je založená na opticko-elektrickom jave. Tento jav vzniká na rozhraní kov - dielektrikum pri totálnom odraze svetla na tomto rozhraní. Pri určitom uhle svetla dôjde k maximálnemu preneseniu energie svetla na elektróny atómov kovov v povrchovej vrstve takzvané plazmóny, čo sa navonok prejaví poklesom intenzity odrazeného svetla. Dovoľuje vysoko citlivé a rýchle stanovenie prítomnosti analytu [5].

Vývoj najrôznejších typov imunosenzorov má v prvom rade za úlohu zjednodušiť prácu spojenú s imunochemickou analýzou, zmobilizovať systémy a zrýchliť priebeh stanovenia. Klasický ELISA formát imunochemického stanovenia vyžaduje presne dávkovanie vzorkou, inkubáciu, separačné a premývacie kroky. U vlastných imunosenzorov funguje citlivý povrch nie len ako nosič imobilizovaného väzobného partnera, ale priamo slúži pre generovanie a meranie signálu [3].

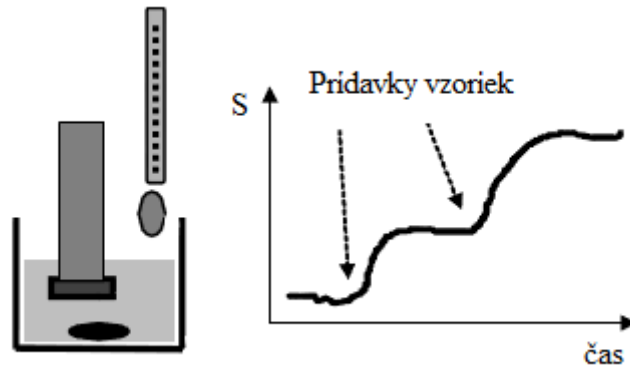
Rozvoj je možný vďaka veľkému rozvoju metód pre produkciu protilátok. Získavanie protilátok priamo z krvného obehu imunizovaných zvierat je nahradzovaný genetickými manipuláciami produkčných baktérií, konjugáciami nádorových buniek s bielymi krvinkami a podobnými postupmi. Aj napriek tomu sú protilátky stále pomerne drahé [5].

Imunoanalýza získala pozornosť v rôznych oblastiach kvôli selektívnemu a senzitivnému stanoveniu rôznych látok. Najčastejšie zahŕňa klinické analýzy, kontrolu životného prostredia a kontrolu kvality potravín [19, 20].

3.7 Podmienky merania s biosenzormi a použitie v praxi

V prípade, že sa biosenzor nachádza priamo v sledovanom prostredí (rieka, tkanivo, krvný obeh, atď.) je potrebné aby jeho činnosť nemala vplyv na okolité prostredie, teda aby sa zabránilo vyčerpaniu analytu v dôsledku merania a ovplyvneniu toku iných látok. Je užitočné meniť polohu biosenzoru kvôli získaniu dostatočnej informácie o distribúcií analytu v prostredí a kvôli odhaleniu prípadných koncentračných gradientov [3].

Ďalší spôsob merania je v uzavretej nádobe. Biosenzor je umiestnený vo vhodnej nádobke s vodným roztokom, kvôli teplote a magnetickým miešadlám. Vyčká sa na ustálenie signálu v prítomnosti pracovných roztokov (pufrov). Pridá sa vzorka a po ustálení sa odčíta signál. Pridávanie vzorky je možné niekoľkokrát opakovať, dokonca je možné niekedy celú nádobu naplniť vzorkou (voda, mlieko, atď.). Toto usporiadanie je veľmi jednoduché a nenáročné na vybavenie, nevýhodou je potreba manuálnej obsluhy[3].



Obr. č. 3: Schéma merania v nádobke a jeho grafické znázornenie prídavku vzorky v závislosti na čase [3]

Posledný spôsobom merania je meranie s biosenzorom umiestnením vo vhodnej prietokovej cele. Sú možné dva spôsoby činnosti. V prvom prípade sa nechajú systémom striedavo pretekať zóna základného roztoku a zóny vzoriek. Meraný signál je teda vyvolaný priamo neriedenou vzorkou. Pri druhom spôsobe neustále systémom preteká pracovný roztok zo vzorkou. Vždy dôjde k definovanému nariadeniu vzorky a signál má charakteristický tvar píku, u ktorých sa vyhodnocuje buď výška alebo plocha. Prietokové usporiadanie umožňuje automatizovať meranie [3].

Aby sa biosenzor uplatnil v praxi mal by spĺňať aspoň niektoré z týchto kritérií:

- dostatočná selektivita a stabilita pre účely danej analýzy,
- opakovateľné použitie (uplatnenie majú aj senzory na jedno použitie),
- reakcia v biosenzoroch by mala prebiehať bez úpravy vzorky, teda nezávislé na fyzikálnych parametroch, ako sú *pH*, teplota, miešanie a podobne,
 - odpoveď senzoru by mala byť správna, presná, reprodukovateľná a lineárna v čo najširšom rozsahu koncentrácií,
 - biosenzor použiteľný v medicíne pre meranie živých orgánov musí byť biokompatibilný (nesmie byť jedovatý, nesmie spôsobovať alergické reakcie a podobne),
 - biosenzor použiteľný v biotechnológiách by mal byť sterilizovateľný,
 - biosenzor by mal byť lacný, pokiaľ možno malý, prenosný a ľahko použiteľný. S jeho použitím by si mala poradiť aj menej odborne zdatná obsluha,
- hotový biosenzor by mal mať uplatnenie na trhu [5].

Veľa biosenzorov však nespĺňa väčšiu časť vyššie uvedených kritérií [5].

Väčšina tržieb v dnešnej dobe pochádza z biosenzorov pre lekárske použitie. Veľa inštrumentácií pre medicínsku diagnostiku by mohli byť upravených pre monitorovanie životného prostredia. Aj keď biosenzory pre životné prostredie nie sú tak ekonomicky výnosné ako v lekárstve, je ich vývoj podporovaný. Je vynaložené veľké úsilie pre aplikáciu biosenzorov na meranie znečisťujúcich látok a ďalších environmentálnych rizík [21].

Biosenzor založený na povrchovej plazmovej rezonancii (*SPR*) je najčastejší komerčne dostupný senzor, ktorý sa využíva na monitorovanie životného prostredia. Prvý biosenzor založený na *SPR* bol *BIAcore* systém, ktorý predstavila firma Pharmacia Biosensor AB, teraz Biacore AB (Uppsala, Švédsko) v roku 1990. Táto spoločnosť ma teraz širokú škálu biosenzorov, ktoré zahŕňujú niekoľko typov pôvodných *BIAcore* systémov (séria 1000, 2000, 3000) ako aj ďalšie konfigurácie systému, ktoré ponúkajú rôzne stupne automatizácie a špecifikácie parametrov. Na monitorovanie biomolekulárnych interakcií postupujúcich v priebehu času bol vyvinutý *BIAcore* 3000, ktorého výhodou je, že nie je potrebné označovať reaktanty [21].

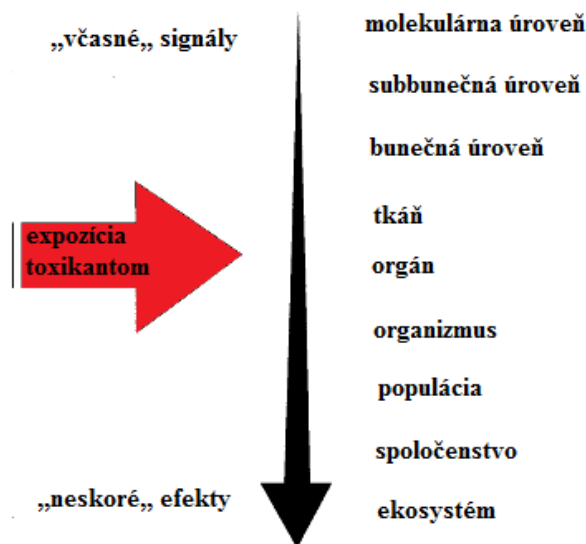
Ďalšími komerčnými biosenzormi, ktoré sa uvádzajú na trh sú *IBIS* systém, systém *CELLIA* (konfigurovaný pre celé bunky alebo makromolekuly) a biosenzor s detektorom *Spreeta* (konfigurovaný pre priemyslové, ekologické a biologické aplikácie) [21].

Firma Affinity Sensors (Franklin, MA) vyrába nástroje *IASys*, ktoré používajú technológiu tlmených vln v kontraste s *REMEDIOS* (celobunečné biosenzory použité pre diagnostiku kontaminovaných oblastí a pôd). Detekujú úroveň toxicity, ktorá ovplyvňuje metabolickú aktivitu organizmu. Za normálnych podmienok biosenzor vyžaruje viditeľné svetlo. Svetelný výkon je priamo úmerný metabolickej aktivite. Bioluminiscencia poklesne priamo úmerne s úrovňou toxicity ak je vzorka (pôda, voda, sediment, kal) toxická. Organizmy pre biosenzory sú vybrané ako zástupcovia bakteriálnych kmeňov vyskytujúcich sa v životnom prostredí, ako aj tie zapojené do procesu bioremediácie (pôsobením baktérií dochádza k premene toxických látok na netoxické) [21].

4 BIOMARKERY

4.1 Definícia biomarkerov

Pojem biomarker alebo biologický marker je možné definovať na základe významu slov „marker„ (z angličtiny) znamená nástroj k označeniu pozície a slovo „bio„ značí súvislosť so životným prostredím [22]. Biologické markery sú významnými indikátormi expozície, ktorá je škodlivá zdraviu a indikátormi vnímavosti na vznik alebo prejav choroby [23]. Existujú najrôznejšie definície tohto pojmu. Pojmom biomarkery označujeme včasné varovné signály (early - warning signals) potenciálneho poškodenia jedinca alebo celej populácie. Sú to akékoľvek merateľné parametre, ktoré odrážajú vzájomné pôsobenie biologického systému a nebezpečného činiteľa, ktorý môže byť chemického, fyzikálneho či biologického charakteru. Na obrázku č. 4 je znázornená zmena biologických odpovedí na rôznej úrovni organizácie, ktorá súvisí s expozíciou alebo negatívnymi účinkami toxikantov v životnom prostredí [24].



Obr. č. 4: Schematické znázornenie zmien úrovni biologických odpovedí vyvolané toxikantom [24].

Účinky na vyšších úrovniach organizácie nie sú bežne považované za biomarkery, lebo sa jedná skôr už o prejavy zmien na úrovniach nižších. Poskytujú však dôležité informácie o vyvolaných zmenách. Ekotoxikológovia tento pojem ďalej vysvetľujú detekciou molekulárnych, biochemických, fyziologických a bunecných zmien v živých organizmoch [24, 25].

Biomarkery sú často označované ako ekologické indikátory alebo bioindikátory. Je potreba rozlíšiť tieto termíny. Biomarker je potom definovaný ako biologická odpoveď na chemickú látku z prostredia, ktorá je zaznamenaná vo vnútri organizmu alebo v jeho produkte, a to na úrovni subindividuálnej. Vykazuje odchýlky od normálneho stavu, ktoré nemôžu byť detekované u jedinca ako celku. Avšak ekologické indikátory sú parametre ekosystému popisujúce jeho štruktúru a funkcie a bioindikátory sú definované ako organizmus, ktorý svojou ne/prítomnosťou alebo chovaním poskytuje informácie o vlastnom životnom prostredí [26]. Ešte je potrebné odlíšiť biomarkery od bioakumulačných markerov. Tie sú definované ako analyticko-chemické indikátory (množstvo latky v tele, v orgáne a podobne) [24].

4.2 História biomarkerov

Prvá oblasť, v ktorej boli biomarkery zaznamenané bolo lekárstvo a to slávnym lekárom Hippokratom, ktorý diagnostikoval ochorenie pacienta podľa jeho farby moču. Preto práve v lekárstve došlo k prvému rozvoju biomarkerov, ktoré slúžili k identifikácii chorôb a ich rozšírenia sa v tele [22].

Prvý publikovaný článok spojený s biomarkermi bol vydaný v roku 1965 v databáze PubMed. Autorom tohto článku, ktorý vyšiel v zborníku Royal Society of Medicine pod názvom "The Environment and Disease: Association or Causation?" bol Sir Austin Bradford Hill. V rozmedzí rokov 1980-1990 bol veľký nárast používania tohto pojmu. Sir Austin presne a výrečne popisuje deväť faktorov, ktoré cítil že musí brať v úvahu pri posudzovaní vzťahu medzi prírodnými faktormi a chorobami. Tieto faktory boli: pevnosť, konzistencia, špecifickosť, biologické sklony, dočasnosť, súdržnosť, experiment, analógia a biologický gradient [27].

Ľudia rozvíjali priemysel a tým začali do svojho prostredia uvoľňovať rôzne chemické látky, ktoré mali na nich škodlivý vplyv. To malo za následok vznik nových vedných oborov toxikológie a neskôr ekotoxikológie. Tie začali spolupracovať predovšetkým s biochémiou a molekulárnou biológiou, čo sa prejavilo na výraznom rozvoji použitia biomarkerov [28].

V dnešnej dobe je výskum zameraný na biomarkery, ktoré zvýšia schopnosť identifikovať rizika spojené s dlhodobou expozíciou toxikantov (napr. rakovina) a skoré toxicity v oblastiach ekotoxikológie a životného prostredia [28]. Cieľom je možnosť predpovedať dlhodobé efekty na nízkej biologickej úrovni, odhadovať stav životného prostredia a identifikovať možné problémy čo najskôr aby sa dalo zabrániť ich negatívnym účinkom na populáciu a následné na celý ekosystém. Veľké snahy sa kladú na zvýšenie citlivosti, presnosti a reprodukovateľnosti, ďalej je potrebné nájsť nedeštruktívne a neinvazívne biomarkery s nízkou cenou a veľkou časovou efektívnosťou [22, 24].

4.3 Vlastnosti a výhody použitia biomarkerov

Parametre a kritéria, ktoré by mal biomarker dosahovať sú nasledovné:

- dostatočná citlivosť odpovedí biomarkerov (včasný varovný signál) na expozíciu alebo účinky toxikantov,
- nízka cena a ľahké prevedenie testu,
- poznať faktory ovplyvňujúce odpovede biomarkeru,
- poznať základné údaje o biomarkeroch (rozlíšenie medzi prirodzeným rozptylom hodnôt (šum) a signálom vyvolaným toxikantom),
- poznať základný mechanizmus vzťahu medzi odpoveď - expozícia (dávka, čas),
- zreteľná interpretácia jeho výsledkov a použiteľnosť na vyššej úrovni,
- poznať základné informácie o testovacích organizmoch (biológia a fyziológia),
- hlavne nedeštruktívne a neinvazívne biomarkery, aby chránili ohrozené druhy a poukazovali na negatívne vplyvy v prostredí [24]

Hlavnou výhodou dobrého biomarkeru oproti iným metódam stanovenia vplyvu látok na organizmy je schopnosť poskytnúť rýchlu biologickú odpoveď a zároveň poukázať na biodostupnosť toxikantov. Ďalšou jeho vlastnosťou oproti iným metódam je jeho schopnosť vykazovať údaje o komplexnom pôsobení toxikantov vrátane vzájomných interakcií s rôznymi zložkami prostredia. Biomarkery môžu okrem toho poskytnúť pohľad do mechanizmu pôsobenia toxikantov a vzťahy príčina - účinok a dávka - účinok. Jedná sa o štúdium subletálnych účinkov na úrovni nižšej ako je jedinec. Tieto dlhodobé účinky sa viažu na celé populácie a spoločnosti [29].

Vhodnosť využitia daného biomarkeru a interpretácia jeho odpovedi je veľmi dôležitá, lebo ich nesprávne využitie môže viesť k zlým výsledkom a záverom. To čo platí pre jeden druh pre druhý platiť nemusí. Stresová situácia zapríčinená toxikantom vyvolá celú škálu biologických odpovedí, pričom každá z nich môže byť použitá ako biomarker. Je potrebné si dávať pozor aj pri extrapolácii laboratórných výsledkov do prostredia [24].

4.4 Rozdelenie biomarkerov

Potencionálny biomarker je akákoľvek zmena objavujúca sa ako reakcia na stresor (xenobiotiká, ochorenie, zmeny vo fyzikálnych podmienkach životného prostredia, ako teplota alebo slanosť) a posúva reakcie organizmu za hranice normálneho stavu [22, 24]. Potom teda platí, že každý marker je natoľko premenlivý ako stresor, ktorý ho vyvoláva. Na jeden typ stresoru môže reagovať niekoľko biomarkerov. Takéto množstvo biomarkerov sa môže ďalej deliť podľa stresoru, ktorý reakciu vyvolá. Avšak toto delenie sa nepoužíva lebo je nepraktické a nikdy nie je známa príčina reakcie. Ďalej je to podľa toho, kde sa skúmaná zmena objaví (delenie podľa biologickej úrovni) alebo posledným člením, ktoré je všeobecne uznávané je delenie biomarkerov podľa účelu ich použitia [28].

Množstvo potencionálnych biomarkerov sa zvyšuje s rastúcou komplexnosťou biologického systému, čo má za príčinu klesanie citlivosti a zvyšovanie variability. Potom je teda ťažšie priradiť pozorovanú biologickú zmenu ku konkrétnemu toxickému účinku na primárny cieľ (na konkrétnu molekulu). Klesá šanca zabrániť nenávratnému poškodeniu jedincov alebo celej populácie, lebo sa znižuje možnosť účinného zásahu proti toxickému účinku. V praxi je preto výhodnejšie použiť pri analýze rizík v životnom prostredí biomarkery stanoviteľne na nižších biologických úrovniach. Tu sú odpovede rýchlejšie, citlivejšie a ľahšie interpretovateľné [25].

Biochemické markery sú také typy markerov, u ktorých dochádza po vstupe cudzorodých látok do organizmu alebo bunky k ich väzbe na bunkové receptory, ktoré kontrolujú kľúčové pochody v bunke. Ďalej v nich vznikajú reaktívne intermediátory a dochádza k inhibícii určitých enzýmových aktivít a ďalších procesov, ktoré predchádzajú toxickým a iným negatívnym účinkom na úrovni bunky, orgánov, organizmov a populácií.

Toxické látky v subletálnych koncentráciách spôsobujú zmeny hematologických a biochemických hodnôt, ukazovateľov nešpecifickej imunity a vyvolávajú histologicko-patologické zmeny tkanív. Tieto všetky zmeny sa dajú využiť ako biochemické markery.

Biochemické markery toxicity sú vybrané parametre, ktorých merateľné zmeny sú prvými včasnými odpoveďami na expozíciu cudzorodých látok. Indikujú mechanizmus toxicity pre určitú cudzorodú látku. Niektoré biochemické parametre môžu špecificky odrážať

expozíciu niektorej skupine kontaminantov alebo látok. Biologickými modelmi pre biochemické parametre sú najčastejšie pečenevé tkanivo, primárne hematocyty alebo permanentné línie odvodené z hepatocytov, prípadné odobratá krv alebo iné telesné tekutiny. Vhodne vybrané biomarkery sú významnými indikátormi zdravotného stavu organizmov v monitorovanom ekosystéme. Prednosťou biochemických markerov je schopnosť detekovať toxické účinky látok ešte pred manifestáciou ich účinku, to je pred narušením fyziologických funkcií, akými sú napríklad rast, vývin, reprodukcia [2].

Biochemické markery sa využívajú ako skriningové metódy s vysokou predikčnou schopnosťou, ktoré sú alternatívou pre existujúce metódy. Používajú sa v základnom toxikologickom, ekotoxikologickom a farmakologickom výskume. Niektoré sú všeobecne akceptované. Ako potenciálne biochemické markery môžu byť testované mnohé parametre. Dajú sa potenciálne využiť ako alternatívne metódy pre mnohé toxikologické hodnotenie nových xenobiotík.

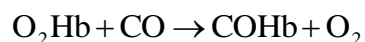
Výhodou biologických a biochemických indikátorov kontaminácie je ich schopnosť predpovedať vplyvy znečistenia v celom jeho komplexe, so všetkými synergickými a antagonistickými vplyvmi medzi jednotlivými znečisťujúcimi komponentmi [2, 30].

Všeobecné uznávané delenie biomarkerov bolo vytvorené vedeckou organizáciou US National Academy of Science Committee on Biological Markers v priebehu National Research Council v roku 1987. Toto delenie je založené na tom čo daný biomarker indikuje [24].

Rozlišujeme tri typy biomarkerov: biomarker expozície, účinku a vnímavosti [22].

4.4.1 Biomarkery expozície

Biomarkery expozície pozostávajú z merania xenobiotickej látky a metabolitu xenobiotika alebo pesticidu, alebo z detekcie priameho účinku týchto látok na organizmus. V lekárstve je príkladom týchto biomarkerov expozícia anilínu na človeka, tento môže byť detekovaný priamo pomocou anilínu alebo jeho metabolitu p-aminofenolu v krvi alebo moči. Pesticidy alebo ich metabolity môžu byť priamo detekované v tkanivách získaných biopsiou zo živých organizmov alebo pitvou mŕtvych organizmov. Moč, krv, vydychovanom vzduchu, výkaly a materské mlieko môžu tiež slúžiť ako vzorky a sú vhodné na opakované meranie expozície po určitú dobu. Užitočný druh biomarkeru, čoraz viac používaným v posledných rokoch, je zložený z aduktov xenobiotík alebo ich metabolitov v biomolekulách. Priamym príkladom takéhoto aduktu meraného po mnoho rokov ako dôkaz expozície je karboxy - hemoglobín (COHb). Je produkovaný vdychovaným oxidom uhoľnatým, ktorý prejde do krvného obehu a naviaže sa na hemoglobín (Hb). Rovnica priebehu reakcie:



Karboxy - hemoglobín má zreteľne odlišnú farbu na rozdiel od jeho okysličenej formy. Preto je ho možné merať spektrofotometricky. Rakovintvorné zlúčeniny a karcinogénne metabolity sú všeobecne elektrofilné druhy, ktoré spôsobujú biochemické zmeny. Tieto zmeny vedú k rakovine tým, že pripájajú nukleofilné skupiny (bohaté na elektróny, viažu atómy kyslíku a dusíku) v biomolekulách, najmä v DNA. Tieto prídavky slúžia ako biomarkery expozície [31].

Z environmentálneho hľadiska biomarkery expozície identifikujú v systéme látku a interaktívny produkt medzi xenobiotikom a endogénnou zložkou, alebo iné skutočnosti v biologickom systéme vyvolané expozíciou. Charakterizujú množstvo toxikantu, ktoré preniklo do organizmu. Neposkytujú veľa informácií o následkoch expozície a sú rôzne špecifické [2].

K biomarkerom expozície patria:

- **stresové proteíny** (proteíny tepelného šoku) - nešpecifické, indukované rastlinami aj živočíchmi,

- **inhibícia acetylcholinesterázy** - enzým nervového systému živočíchov,

- špecifická odpoveď, ktorá sa objavuje po expozícii organofosfátovým pesticídom a karbamátom,

- acetylcholinesteráza (AChE) sa nachádza hlavne v mozgu, červených krvinkách a v plazme niektorých stavovcov a je zodpovedná za hydrolýzu acetylcholínu, ktorý je hlavným prenášačom neurónov. Inhibícia tohto enzýmu silno ovplyvňuje prenos nervových signálov,

- **metalotioneíny** - cytoplazmatické bielkoviny viažuce kovy, ktoré sa vyskytujú u mnohých eukaryontov, ich indukcia nastáva po expozícii kovom,

- metalotioneíny sú biomarkermi vplyvu toxických kovov,

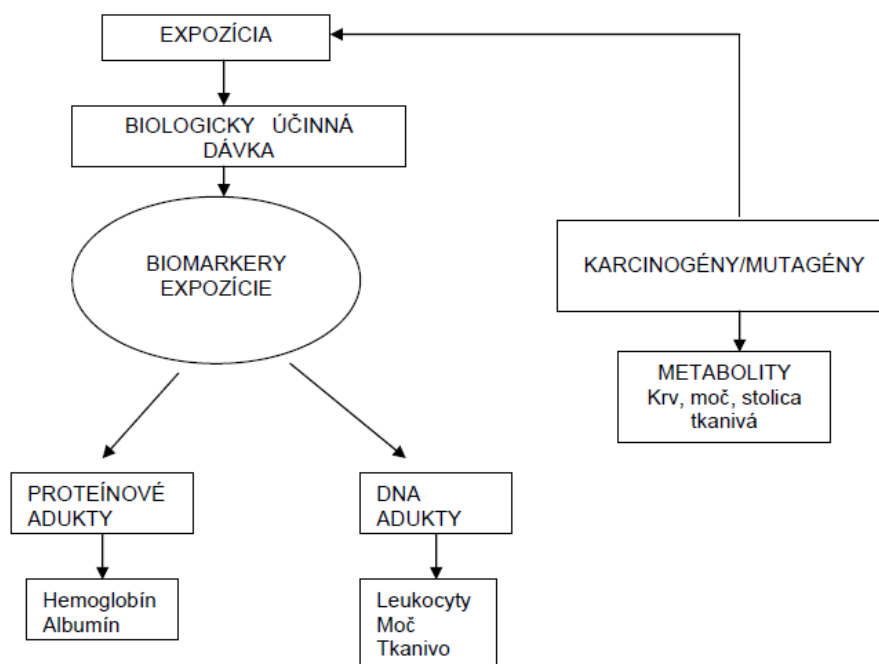
- sú skupinou proteínov s nízkou molekulovou hmotnosťou, vysokým obsahom aminokyselín obsahujúcich sulfhydrylové skupiny (hlavne cysteín) a schopnosťou viazať ťažké kovy,

- ich zvýšená syntéza nastáva pri zvýšenej koncentrácii iónov ako esenciálnych tak aj toxických kovov,

- **indukcia detoxikačných enzýmov** u rastlín aj živočíchov

- enzým I. fázy biotransformácie (monooxygenáza so zmiešanou funkciou, enzým cytochrómu P 450). Cytochróm P 450 1A je biomarkerom expozície dôležitých skupín organických látok a jeho hladina indukovaná 2,3,7,8-tetrachlórodibenzo-*p*-dioxínom a príbuznými látkami, PCB a PAH. Cytochrómy P 450 (CYP) sú hemoproteíny schopné viazať molekulárny kyslík a vnášať jeho jeden atóm do molekuly substrátu, ktorým môžu byť cudzorodé látky. Cudzorodé látky môžu byť jedným alebo viacerými cytochrómami premieňané tak, aby mohli byť z organizmu vylúčené,

- enzýmu II. fázy biotransformácie - glutation S-transferáza (GST), uridindifosfoglukuronosyl transferáza, sulfotransferáza [2].



Obr. č. 5: Schéma fungovania biomarkerov expozície [32]

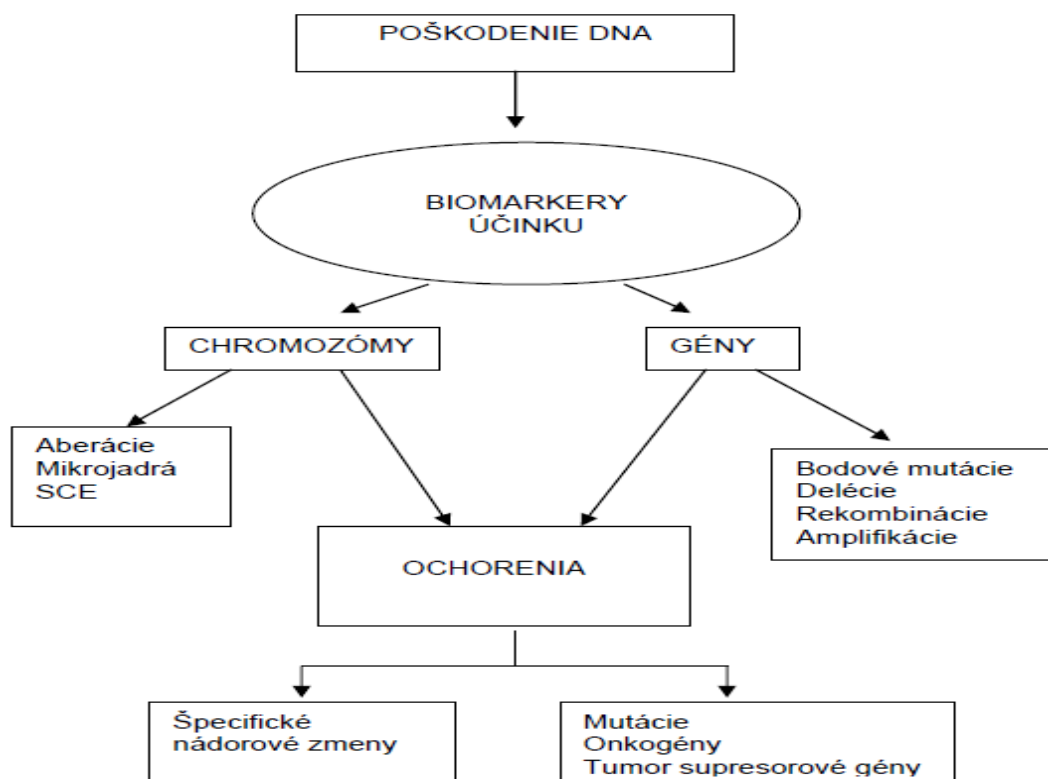
4.4.2 Biomarkery účinku

Biomarkerov účinku sú zmeny fyziológie, biochémie alebo správania spôsobené expozíciou xenobiotických látok [30]. Indikujú biochemické zmeny, ktoré sa objavia ako výsledok negatívnej interakcie toxikanta a biologického systému a ktoré môžu vyústiť do patologického poškodenia organizmu [2].

K biomarkerom účinku patria:

- **parametre oxidatívneho stresu** - sú biomarkermi organo-chlórovaných pesticídov, PCB, pesticídov typu paraquat a podobne,
 - produkcia kyslíkových radikálov (superoxid, H_2O_2 , hydroxylový radikál),
 - aktivita antioxidantných enzýmov (glutatión peroxidáza, glutatión reductáza, superoxidáza, kataláza),
 - koncentrácie neenzýmových antioxidantov,
 - oxidatívne poškodenie makromolekúl (peroxidácia lipidov, oxidatívne adukty DNA, produkty oxidácie proteínov,)
- **parametre energetickej bilancie organizmu** - obsah lipidov, proteínov, uhl'ovodíkov a aktivita elektrónového transportu,
- **indikátory narušenia metabolizmu** - metabolické enzýmy pyruvátkináza, laktátdehydrogenáza, izocitrátdehydrogenáza,
- **biomarkery zaťaženia endokrinného systému** - vitelogenín, hormóny T3 a T4, enzýmy metabolizmu steroidných hormónov,
- **genotoxické biomarkery** - narušenie integrity DNA (zlomy v DNA, mikrojadierka),
- **histologicko-patologické zmeny niektorých orgánov** [2].

Biomarkery účinku na endokrinný systém (stanovenie produkcie vitelogenínu) - vitelogenín (VTG) je bielkovina, ktorú produkujú pečeňové bunky rýb, obojživelníkov, plazov a vtákov. Jej produkcia je indukovaná väzbou estrogénu na pečeňové receptory. U samíc je vitelogenín transportovaný do vaječníc, kde tvorí súčasť žltkových proteínov. U samcov je hladina endogenných estrogénov prirodzene veľmi nízka a preto je aj produkcia vitelogenínu minimálna. Ak sa VTG stanoví v sére rybných samcov, dá sa použiť ako biomarker expozície estrogénnym látkou. Po pôsobení endokrinných disruptorov s xenoestrogénnym účinkom (napr. chlordan, toxafen, dieldrin, 4-nonylfenol) dochádza u oboch pohlaví ku stimulácii tvorby endogenných estrogénov a ku zvýšeniu hladiny vitelogenínu. Naopak pôsobením antiestrogénnych disruptorov (napr. metoxychlór) sa produkcia vitelogenínu minimalizuje pod merateľnú úroveň. Produkcia vitelogenínu sa sleduje predovšetkým u rýb a obojživelníkov [2].



Obr. č. 6: Schéma fungovania biomarkerov účinku [32]

4.4.3 Biomarkery citlivosti

Vlastná alebo získaná schopnosť organizmu reagovať na expozíciu špecifických xenobiotických látok, vrátane genetických faktorov a zmien receptorov, ktoré menia citlivosť organizmu na túto expozíciu [22]. Pomáhajú objasniť rozdiel v stupni odpovedí na expozíciu toxikantom medzi jednotlivými jedincami [30].

Premenlivosť v reakciách jedincov môže byť spôsobená genetickou výbavou jedinca, premenlivými parametrami (metabolizmus, choroba) aj vplyvmi vonkajšieho prostredia (strava, expozícia xenobiotiky v minulosti jedinca). Najdôležitejším zdrojom variability v organizme je metabolizmus látok [33].

Takto sú rozdiely v odpovediach jedincov spôsobené predovšetkým individuálnymi modifikáciami metabolických dráh a to geneticky podmienenými aj získanými [2].

4.5 Podmienky merania s biomarkermi a použitie v praxi

Pri príprave testov využívajúcich biomarkery je potrebné používať dobre charakterizovaný materiál tvorený homogénnou populáciou jedincov. Faktormi, ktoré ovplyvňujú biomarkery, sú druh organizmu, jeho pohlavie, vek, vývinové štádium a výživa environmentálne faktory (napr. teplota). Pri testoch je dôležité otestovať a nakalibrovať, v závislosti od množstva sledovaných parametrov, limitu detekcie a spotreby biologického materiálu pre jednotlivé metodiky, potrebné množstvo vzorky, na ktorej sa bude účinnosť testovať. Pri malých jedincoch sa môžu v testoch používať aj zmesné vzorky z viacerých jedincov [2].

Možné využitie biomarkerov zahŕňajú rutinné dlhodobé sledovacie programy, posudzovanie rizík v určitých miestach vypúšťania (toxických látok), presadzovanie dodržiavania právnych noriem pre životné prostredie a monitorovanie účinnosti nápravných opatrení. Biomarkery by nemali byť aplikované samostatne, alebo v izolácii od ostatných typov meraní, ale ako súčasť dobre navrhnutého monitorovacieho programu, vrátane chemickej analýzy kontaminantov telesnej záťaže, všeobecné biomarkery zdravia zvierat, napríklad mieru rast (miera dostupnej energie pre rast) u mäkkýšov, alebo hormonálne zmeny v rybách (špecifické biomarkery znečistenia, vrátane patologických zmien) [34].

Menej komplikované a komplexné programy s menším počtom biomarkerov možno použiť na bežné monitorovanie, po zistení problému v životnom prostredí sa počet použitých biomarkerov môže zväčšiť ak je potrebné podrobnejšie posúdenie situácie. Program môže využívať tzv. indikačné druhy organizmov, pomocou zdravia týchto organizmov možno usudzovať na zdravie životného prostredia (kvalitu vody). Medzi požadované vlastnosti indikačných živočíchov patria, široká geografická distribúcia, ich ľahké zhromažďovanie, nemenný životný štýl alebo obmedzené teritória na ktorých sa tieto živočíchy vyskytujú. Taktiež je potrebné dobré porozumenie biologických procesov u týchto organizmov, preto sú takými indikačnými organizmami vo vodnom prostredí mušle a iné bezstavovce, ryba a morské vtáky. Bežne uvádzaný a často diskutovaný cieľ štúdií biologickej odozvy je predpovedanie zmien v populácii organizmov na základe zmien molekulárnych, bunčných alebo fyziologických biomarkerov [35].

4.6 Obmedzenie použitia biomarkerov pri monitorovaní znečistenia

Piatimi oblasťami záujmu pri použití biomarkerov sú zmeny v prirodzených premenných, špecificita, odozva na dávku, mechanického porozumenie, technické znalosti a vybavenie potrebné na vykonávanie a interpretáciu meraní. Špecifické aj všeobecné biomarkery sa môžu meniť v závislosti od ročného obdobia (reprodukčného obdobia) alebo v závislosti na iných ukazovateľoch spätých so životným prostredím (teplota, slanosť). Rozsah vplyvu týchto ukazovateľov je potrebné stanoviť. Špecifickosť je v súčasnosti obmedzená na hlavné skupiny kontaminantov, niektoré organické zlúčeniny a kovy, v menšej miere organofosfáty. Odozva na dávku sa pozoruje alebo v laboratóriu alebo priamo v teréne. Táto je predmetom záujmu iba v prípade, ak je kladený dôraz na použitie biomarkerov ako biologickej miery stavu znečistenia.

Dôkladné mechanické porozumenie je nevyhnutné pre výklad a uplatňovanie biomarkerov. Toto existuje u niektorých biomarkerov pre stavovce, ako sú ryby, ale oveľa menej pre bezstavovce a niektorých iné biomarkery. Odborné znalosti potrebné na vykonanie meraní sú vysoké u niektorých biomarkerov, ale menej pre ostatné. Všetky si vyžadujú určitú mieru skúsenosti v interpretácii, ale väčšina z nich sa dá zjednodušiť alebo automatizovať [35].

5 ZÁVER

V tejto bakalárskej práci som sa v prvej časti venoval biosenzorom, ich vlastnostiam, rozdeleniu a schopnostiam posudzovať kontamináciu životného prostredia. Biosenzory sú analytické zariadenia obsahujúce citlivé biologické prvky, ktoré sú súčasťou fyzikálno-chemického prevodníka alebo sú v jeho tesnom kontakte. Prevádzajú určitý fyzikálny alebo chemický signál na iný signál lepšie merateľný s prístrojmi. Biosenzory nachádzajú uplatnenie všade tam, kde ich použitie je výhodnejšie oproti klasickým nebiologickým senzorom. Ich najväčšou výhodou je veľká selektivita odozvy. Väčšina enzýmov používaných v biosenzoroch katalyzuje premenu iba jednej chemickej látky. U mikrobiálnych buniek môže byť selektivita veľmi široká, čo umožňuje jedným typom biosenzoru sledovať znečistenie životného prostredia množstvom príbuzných látok. Medzi ďalšie prednosti patrí vysoká rýchlosť odozvy, teda biosenzor dokáže reagovať na podnet okamžite. Pri ochrane životného prostredia sú biosenzory využívané k detekcii znečistenia. V tomto smere sú výhodne najmä celobunecné biosenzory, ktoré citlivo reagujú na určité skupiny látok. Okrem detekcie znečistenia sú používané pri stanovení tzv. biologickej spotreby kyslíka a k monitorovaniu pôdnej mikroflóry a metabolickej aktivity pôdných organizmov. Najčastejšie sa biosenzory využívajú pri sledovaní kvality vody, ale pomaly začínajú prenikať do oblasti sledovania kvality ovzdušia a pôdy.

Druhá časť bola zameraná na biomarkery. Biomarkery sú merania na molekulárnej, biochemickej alebo bunkovej úrovni buď voľne žijúcich populácií v kontaminovaných lokalitách alebo v organizmoch experimentálne vystavených znečisťujúcim látkam. Biologické markery namerané u voľne žijúcich zvierat môžu priamo prispieť k odhaľovaniu, kvantifikácii a pochopeniu významu expozície chemických látok v životnom prostredí. Tieto merania v oblasti životného prostredia jednotlivých druhov organizmov, môžu tiež pomôcť posúdiť potenciál ohrozenia človeka látkami, znečisťujúcimi životné prostredie, a pre predpovedanie zdravotných rizík. Dôraz je kladený na identifikáciu a hodnotenie expozície životného prostredia a vplyvov prostredia na zdravie rôznych druhov organizmov a neporušenosť ich ekosystému.

6. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] TURNER A. P. F., KARUBE I., WILSON G. S. *Biosensors. Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford 1987.
- [2] FARKAŠOVÁ A. *Ekotoxikologické biotesty*. Bratislava, 515, (2009), 217-221, ISBN 978-80-8046-422-6.
- [3] SKLÁDAL P. *Biosenzory*, Masaryková univerzita. Brno 2002
- [4] VO-DINH T., CULLUM B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J Anal. Chem.*, 366, (2009), 540-551.
- [5] http://www.odbornecasopisy.cz/index.php?id_document=31055 (z dňa 13.2.2012.)
- [6] HUBÁLEK J., ADÁMEK M. *Mikrosenzory a mikromechanické systémy*. Skripta, FEKT VUT, Brno.
- [7] WNEK G.E., BOWLIN G.L. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering. Schultz J.S., *Biosensors*. Marcel Dekker, New York, 2004, ISBN 0-8247-5498-0.
- [8] TURNER P.F.A. *Biosensors – Sense and Sensitivity*. Science, Vol 290,(2000), 1315-1317.
- [9] <http://www.mixxer.sk/falcon/eshop/58-1-Glukomery/0/5/589-On-Call-Plus> (z dňa 13.2.2012).
- [10] RODRIGUEZ-MOZAZ S., de ALDA M.J.L., MARCO M.P., BARCELO D. *Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: A review article*. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY 378, (2003), 588–598.
- [11] IAVICOLI I., FONTANA L., BERGAMASCHI A. The Effects of Metals as Endocrine Disruptors. *Journal of toxicology and environmental health* 12, (2009) 206-223.
- [12] RODRIGUEZ-MOZAZ S., de ALDA M.J.L., MARCO M.P., BARCELO D. *Biosensors for environmental monitoring: A global perspective*. TALANTA 65, (2005), 291-297.
- [13] CONROY P.J., HEARTY S., LEONARD P., O'KENNEDY R.J. *Antibody production, design and use form biosensor-based applications*. 20, (2009), 10-26.
- [14] <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/biosensors.html> (z dňa 14.2.2012).
- [15] BIDMANOVÁ, Š. *Development and Construction of Biosensors for Detection of Halogenated Compounds in the Environment*. (2007), Masarykova univerzita, Brno.
- [16] JINAG X., LI D., XU X., YING Y., LI Y., YE Z., WANG J. *Immunosensors for detection of pesticide residues*. Biosens. Bioelectr., 23, (2008), 1577-1587.
- [17] KLOUDA P. *Moderní analytické metody*, nakl. Klouda, Ostrava 2003, ISBN 80-86369-07-2.

- [18] <http://www.peta.unas.cz/biosenzory/index.htm> (z dňa 12.3.2012).
- [19] TANG D., YUAN R., CHAI Y. *Ultrasensitive electrochemical immunosensor for clinical immunoassay using thionine-doped magnetic gold nanospheres as labels and horseradish peroxidase as enhancer*. *Anal.Chem.*, 80, (2008), 1582-1588.
- [20] TANG D., YUAN R., CHAI Y. *Direct electrochemical immunoassay based on immobilization of protein-magnetic nanoparticle composites on to magnetic electrode surfaces by sterically enhanced magnetic field force*. *Biotechnology Letters*, 28,(2006), 559-565.
- [21] RODRIGUEZ-MOZAZ S., de ALDA M.J.L., MARCO M.P., BARCELO D. *Biosensors for environmental applications: Future development trends*. *PURE AND APPLIED CHEMISTRY* 76, (2004), 723-752.
- [22] WATERFIELD C. J., & TIMBRELL J. A. Biomarkers-An Overview. In B. Ballantyne, T. C. Marrs, & T. Syversen (Eds.), *General and Applied Toxicology*. 2nd ed., (1999), Vol. 4, 1841-1854.
- [23] LANDER E.S., LINTON L.M., BIRREN B., NUSBAUM C., ZODY M.C., BALDWIN J, DEWAR K., DOYLE M., FITZHUGH W. *Initial sequencing and anylysis of the human genome*. *Nature*, (2001), 409 (6822): 860-921.
- [24] van der OOST R. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assesment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13. (2003), 57-149.
- [25] KAMMENGA J. E., DALLINGER R., DONKER M. H., KIHLEH H. R., SIMONSEN V., TRIEBSKORN R., WEEKS J. M. Biomarkers in Terrestrial Invertebrates For Ecotoxicological Soil Risk Assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 164, (2000), 93-147.
- [26] van GESTEL C.A.M., van BRUMMELEN T.C. *Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms*. *Ecotoxicology* 5, (1996), 217-225.
- [27] http://www.totalscientific.com/biomarkerblog/?p=55#_edn2 (z dňa 30.3.2012).
- [28] WEEKS J. M. Effects of Pollutants on Soil Invertebrates: Links between levels. In G. Schöörmann, & B. Markert (Eds.). *Ecotoxicology* (pp.). John Wiley & Sons, Inc. and Spectrum Akademischer Verlag, (1998), ISBN 0-471-17644-3.
- [29] SHUGART L.R., McCARTHY J.F., Halbrook R.S. *Biological Markers of Environmental and Ecological Contamination - an Overview*. *Risk Analysis* 12, (1992), 353-359.
- [30] SUTER G.W., II, 1990. *Use of biomarkers in ecological risk assessment*. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 419-428.

[31] ANWAR W. A. (1997). Biomarkers of Human Exposure to Pesticides. *Environmental Health Perspectives* 105(4): 801-806.

[32] MUŠÁK L. *Chromozómové aberácie a polymorfizmus vybraných génov u zdravotníckych pracovník profesionálne exponovaných genotoxickým látkam*. Habilitačná práca, Jesseniova lekárska fakulta, Martin, (2009).

[33] DeCAPRIO A. P. (1999): Biomarkers of Exposure and Susceptibility. In B. Ballantyne, T. C. Marrs, & T. Syversen (Eds.), *General and Applied Toxicology*, vol. 4, 1875-1898. New York: Groves Dictionaries INC. ISBN 1-56159-242-0, London: Macmillian Reference LTD. ISBN 0-333-698681.

[34] THOMAS, P., Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. In *Biological Indicators in Fish*,. S. M. Adams. *Amer. Fish. SOC. Symp.*, 8, (1990) 9-28.

[35] LIVINGSTONE D.R. Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57, (1993), 195-211.

7. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK, SYMBOLOV, KONŠTÁNT

K_a	<i>Konštanta afinity</i>
<i>BSK</i>	<i>Biochemická spotreba kyslíka</i>
<i>SPR</i>	<i>Povrchová plazmová rezonancia</i>
<i>pH</i>	<i>Potenciál vodíku</i>
<i>UV-VIS</i>	<i>Spektrofotometria vo viditeľnej a UV oblasti spektra</i>
<i>R</i>	<i>Elektrický odpor</i>
<i>T</i>	<i>Termodynamická teplota</i>

8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK CHEMICKÝCH NÁZVOV

H ₂ O ₂	peroxid vodíka
O ₂	kyslík
PCB	polychlórované bifenyly
NADH	redukovaná forma nikotínamid adenín dinukleotidu
CO ₂	oxid uhličitý
NH ₃	amoniak
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid
AMP	adenozín monofosfát
Hb	hemoglobín
COHb	karboxy-hemoglobín
O ₂ Hb	oxy-hemoglobín
DNA	deoxyribonukleová kyselina
AchE	acetylchorínesteráza
PAH	polyaromatické uhľovodíky
GST	glutation S-transferáza
VTG	vitelogenín