



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

Πρόταση ανάπτυξης βιοαισθητήρα μέτρησης συγκέντρωσης γλυκόζης βασισμένο στη φασματοσκοπία φθορισμού

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΜΟΥΤΟΥΣΗ Ν. ΜΑΡΙΑΣ

Επιβλέποντες: Ευάγγελος Χριστοφόρου, Καθηγητής Ε.Μ.Π.
Ελένη Αλεξανδράτου, Ε.ΔΙ.Π Α'

Αθήνα, 2022



**Πρόταση ανάπτυξης βιοαισθητήρα μέτρησης
συγκέντρωσης γλυκόζης βασισμένο στη
φασματοσκοπία φθορισμού**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΜΟΥΤΟΥΣΗ Ν. ΜΑΡΙΑΣ

Επιβλέποντες: Ευάγγελος Χριστοφόρου, Καθηγητής Ε.Μ.Π.
Ελένη Αλεξανδράτου, Ε.ΔΙ.Π Α'

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 8η Νοεμβρίου 2022.

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

.....
Ευάγγελος Χριστοφόρου
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.....
Γεώργιος Ματσόπουλος
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.....
Ιωάννης Γκόνος
Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

Copyright © Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. – All rights reserved.

Μαρία Μουτούση, 2022.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

(Υπογραφή)

.....

Μαρία Μουτούση,

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών ΕΜΠ

8η Νοεμβρίου 2022

Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια μεταβολική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Είναι καθοριστικής σημασίας επομένως ο τακτικός έλεγχος και η συχνή παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης για την αποφυγή των σοβαρών επιπλοκών που ενέχει ο διαβήτης. Οι τρέχουσες εμπορικά διαθέσιμες μέθοδοι παρακολούθησης της γλυκόζης είναι κυρίως ηλεκτροχημικές και τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι ότι είναι επεμβατικές, επώδυνες, πολλές φορές χρονοβόρες και υψηλού κόστους. Για τους λόγους αυτούς που επιβαρύνουν ψυχολογικά και οικονομικά τα άτομα με διαβήτη, έχει καταστεί αναγκαία η στροφή του ερευνητικού ενδιαφέροντος σε μεθόδους ελάχιστα έως και καθόλου επεμβατικές για την παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης, που θα είναι το ίδιο αξιόπιστες και ακριβείς με τις ηλεκτροχημικές, αλλά θα είναι πιο φιλικές προς τον χρήστη. Στον κλάδο της μη επεμβατικής παρακολούθησης, οι οπτικές μέθοδοι παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ερευνητική αξία και προοπτική μέχρι στιγμής.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζεται αρχικά ένα θεμελιώδες θεωρητικό υπόβαθρο, που αναλύει την ασθένεια του διαβήτη και έννοιες σχετικές με αυτήν, τις μεθόδους παρακολούθησης της γλυκόζης και τη φασματοσκοπία φθορισμού από τις οπτικές μεθόδους, στην οποία και εστιάζουμε στη συνέχεια στο πειραματικό μέρος. Πιο συγκεκριμένα, στην πειραματική διαδικασία, μελετάμε τον φθορισμό που μπορεί να προκαλέσει η συγκέντρωση της γλυκόζης σε διαλύματα φυσιολογικού ορού και DMEM και να διαπιστωθεί αν παρατηρείται δόσοεξάρτηση. Τέλος, με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων που συλλέγουμε από τα φάσματα εκπομπής φθορισμού, προτείνουμε τον σχεδιασμό μιας φορητής διάταξης βιοαισθητήρα, που οι μετρήσεις θα λαμβάνουν χώρα *in-vitro* σε δείγμα ούρων, ανεμιγμένο με διάλυμα DMEM, χρησιμοποιώντας ως βάση για την πρότασή μας μια υπάρχουσα διάταξη φασματομέτρου.

Λέξεις Κλειδιά

σακχαρώδης διαβήτης, μέθοδοι παρακολούθησης γλυκόζης, μη-επεμβατικές μέθοδοι, οπτικές μέθοδοι, φασματοσκοπία φθορισμού, δόσοεξάρτηση, διάλυμα DMEM, βιοαισθητήρας, φασματοφωτόμετρο, μετρήσεις *in-vitro*, δείγμα ούρων

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by an increase in the concentration of sugar in the blood (hyperglycemia) and a disturbance of glucose metabolism, either as a result of decreased insulin secretion or due to a decrease in the sensitivity of the body's cells to insulin. Regular control and frequent monitoring of glucose levels are therefore crucial to avoid the serious complications of diabetes. Current commercially available glucose monitoring methods are mainly electrochemical and their main characteristics are that they are invasive, painful, often time-consuming and high-priced. Due to these reasons, that weigh people with diabetes down psychologically and financially, it has become a prerequisite to shift research interest to minimally or even non-invasive methods for monitoring glucose levels, which will be as reliable and accurate as the electrochemical ones, but will be more user-friendly. In the field of non-invasive monitoring, optical methods show the greatest research value and potential so far.

In this thesis, a fundamental theoretical background is presented in the first place, which elaborates on the disease of diabetes and concepts related to it, glucose monitoring methods and especially fluorescence spectroscopy from the optical methods, on which we focus in the experimental part. More specifically, during the experimental process, we study the fluorescence that can be evoked by the concentration of glucose in saline and DMEM solutions and to ascertain if a dose dependence could be observed. Last but not least, based on the experimental results of the measurements we collect from the fluorescence emission spectra, we propose the design of a portable biosensor setup, that the measurements will take place in-vitro on a urine sample mixed with DMEM solution, using an existing spectrometer setup as the touchstone of our proposal.

Keywords

diabetes mellitus, glucose monitoring methods, non-invasive methods, optical methods, fluorescence spectroscopy, dose dependence, DMEM solution, biosensor, spectrometer, in-vitro measurements, urine sample

*στους γονείς μου, Νικόλαο και Χριστίνα
και την αδερφή μου, Λουκία-Δέσποινα*

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Ευάγγελο Χριστοφόρου που με άκουσε από την πρώτη μας συνάντηση και μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ στη παρούσα διπλωματική εργασία με ένα θέμα, το οποίο όχι μόνο με φέρνει πιο κοντά στα ερευνητικά μου ενδιαφέροντα, αλλά μάλιστα με μια διαφορετική προσέγγιση, που ήταν οι οπτικές τεχνικές, που με βοήθησε να τα εμπλουτίσω.

Ένα εγκάρδιο ευχαριστώ στην Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου, μέλος του εργαστηριακού και διδακτικού προσωπικού (Ε.ΔΙ.Π) ΕΜΠ. Την ευχαριστώ για όλη την καθοδήγηση, την βοήθεια που μου προσέφερε σε ένα πολύ απαιτητικό διάστημα που διένυσα και την εξαιρετική επικοινωνία μας από την πρώτη μέχρι και την τελευταία στιγμή στη διεξαγωγή της εργασίας αυτής. Η συνεισφορά της σε αυτή την εργασία είναι ανεκτίμητη και της οφείλω πολύ μεγάλη ευγνωμοσύνη και σεβασμό.

Την παράγραφο αυτή την αφιερώνω στους δικούς μου ανθρώπους. Θα ήθελα να ξεκινήσω με την οικογένειά μου, που πίστευε πάντα σε μένα και πολλές φορές με εμπιστευόταν περισσότερο απ' ό,τι εγώ η ίδια τον εαυτό μου. Στους γονείς μου, που σε αυτό το ταξίδι των φοιτητικών μου χρόνων θα ήθελα να τους έλεγα συχνότερα το πόσο τους αγαπώ και τους ευχαριστώ. Είμαι στο σημείο αυτό της ζωής μου, στο οποίο δε θα βρισκόμουν αν δεν είχα την συμπαράσταση και τη στήριξη σε όλους τους τομείς από την αρχή μέχρι το τέλος. Στην αδερφή μου, που είναι η καλύτερη μου φίλη, η καλύτερη μου ακροάτρια, η καλύτερη εμπυχωτρία και είμαι πολύ ευγνώμων που έχω έναν "φωτεινό" άνθρωπο στο πλάι μου. Δικαίως, της έχει δοθεί αυτό το όνομα. Ένα τεράστιο ευχαριστώ στην κυρία Κατερίνα, που ήταν στο πλευρό μου επίσης να μου δείχνει το φως όταν δεν μπορούσα να το δω εγώ. Συνεχίζω με τους φίλους μου από τη σχολή με τους οποίους έχω τόσες πολλές εικόνες, αναμνήσεις και εμπειρίες, οι οποίες είναι ανεξίτηλες και διαμορφώνουν το ποια είναι η Μαρία μέχρι και σήμερα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να αναφερθώ στον Δημήτρη, τον Χρήστο και τη Ναυσικά, που μ' έκαναν να πιστέψω στην έννοια της φιλίας. Ναύσι, ήσουν πάντα πρόθυμη να βοηθήσεις και να ακούσεις οτιδήποτε οποτεδήποτε. Χρήστο, είσαι ένας από τους ανθρώπους που φέρνουν μέρα με τη μέρα την Μαρία που νιώθω όλο και πιο πολύ στην επιφάνεια. Δημήτρη, σ' ευχαριστώ που πίστεψες σ' εμένα γιατί αυτό μου έδωσε πολλή δύναμη και για το ότι η προσφορά σου και η βοήθεια σου ήταν ανέκαθεν ανιδιοτελής. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις φίλες μου από το σχολείο, Εύη, Εμμανουή και Δέσποινα, που έχουμε κάνει τόσο όμορφες συζητήσεις και έχουμε μοιραστεί τόσα όνειρα. Θα ήθελα να σας ευχαριστήσω όλους τους παραπάνω που μείνατε μαζί μου, και στα καλά και στα άσχημα, και εύχομαι, ακόμα και αν αλλάξουν οι ζωές μας, οι χώρες μας, οι κύκλοι μας, να παραμείνουν τα ίδια συναισθήματα και η επικοινωνία μας να είναι "σαν να μην πέρασε μια μέρα". Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω και τους ανθρώπους που όντως δεν είναι σε τομή οι ζωές μας πια, γιατί και εκείνοι με τον τρόπο τους μου προσέφεραν πολύτιμα

συναισθήματα, μαθήματα και παθήματα, τα οποία μόνο σε καλύτερη εκδοχή του εαυτού μου με οδήγησαν. Αυτή η παράγραφος, όπως και να χαρακτηριστεί, ό,τι και να αλλάξει από εδώ και στο εξής, αποτυπώνει το παρόν μου και την πραγματικότητά μου. Το ταξίδι μου στη σχολή αυτά τα χρόνια μου έμαθε πόσο σημαντικό και τυχερό είναι να μην προχωράς μόνος σου, αλλά να έχεις τους ανθρώπους σου, στην καρδιά και στο μυαλό σου, γιατί τότε η ζωή είναι μαγική και έχει αξία. Οι άνθρωποί μας είναι η δύναμή μας.

Αθήνα, 2022

Μαρία Μουτούση

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Abstract	3
Ευχαριστίες	7
1 Θεωρητικό υπόβαθρο	17
1.1 Εισαγωγή	17
1.1.1 Ορισμός Διαβήτη	17
1.1.2 Κατηγοριοποίηση Τύπων Διαβήτη	17
1.1.3 Στατιστικά Στοιχεία	18
1.1.4 Επιπλοκές	18
1.1.5 Ρόλος Ινσουλίνης	18
1.1.6 Ρόλος Γλυκόζης	18
1.1.7 Δομή Ανθρώπινου Δέρματος	19
1.1.8 Επίδραση Φωτός στους Ιστούς	20
1.2 Μέθοδοι Παρακολούθησης Συγκέντρωσης Γλυκόζης Αίματος	21
1.2.1 Επεμβατικές Μέθοδοι Παρακολούθησης Γλυκόζης	21
1.2.2 Ελάχιστα Επεμβατικές και Μη επεμβατικές Τεχνολογίες	26
1.3 Κατανόηση του φαινομένου του φθορισμού	38
1.3.1 Απορρόφηση Ενέργειας	38
1.3.2 Ενεργειακές Καταστάσεις	38
1.3.3 Ενεργειακές Μεταβάσεις	38
1.3.4 Διάγραμμα Jablonski	40
2 Πειραματική Μελέτη	43
2.1 Σκοπός της πειραματικής μελέτης	43
2.2 Πειραματικός Εξοπλισμός	44
2.2.1 Φασματοσκοπική διάταξη φθορισμού	44
2.3 Ουσίες και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν	47
2.3.1 Διάλυμα DMEM	47
2.4 Στάδια Πειραματικής Διαδικασίας	48
2.4.1 Παρασκευή πειραματικών διαλυμάτων	48
2.4.2 Αρχική Προσέγγιση	48
2.4.3 Ακόλουθη Προσέγγιση	49
2.5 Επεξεργασία και Ανάλυση Μετρήσεων	53

2.5.1 Συμπεράσματα και παρατηρήσεις ως προς τις διεγέρσεις	54
2.5.2 Συμπεράσματα και παρατηρήσεις ως προς τη δόσοεξάρτηση	55
3 Περιγραφή και σχεδιασμός προτεινόμενου βιοαισθητήρα μέτρησης συγκέντρωσης γλυκόζης	57
3.1 Χαρακτηριστικά και σκοπός βιοαισθητήρα	57
3.2 Διάταξη Αναφοράς	58
3.3 Προσαρμογή της διάταξης αναφοράς για το σχεδιασμό του προτεινόμενου βιοαισθητήρα	60
4 Σύνοψη και Γενικά Συμπεράσματα	63
4.1 Εκπομπή φθορισμού σε διάφορες συγκεντρώσεις και διεγέρσεις	63
4.2 Σχεδιασμός βιοαισθητήρα μέτρησης συγκέντρωσης γλυκόζης	63
4.3 Μελλοντικές Προεκτάσεις και Προτάσεις Περαιτέρω Έρευνας	64
Βιβλιογραφία	70

Κατάλογος Σχημάτων

1.1	Διάγραμμα ηλεκτρονικών καταστάσεων Jablonski	40
2.1	Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM για κάθε μία τιμή διέγερσης	50
2.2	Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 60 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης	50
2.3	Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 80 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης	50
2.4	Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 100 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης	51
2.5	Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 120 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης	51
2.6	Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 140 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης	51
2.7	Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 160 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης	52
2.8	Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 180 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης	52
2.9	Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 200 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης	52
2.10	Διάγραμμα με συγκεντρωμένα όλα τα φάσματα φθορισμού για όλες τις συγκεντρώσεις γλυκόζης στο διάλυμα DMEM για την τιμή διέγερσης 360 nm	53
2.11	Διάγραμμα με συγκεντρωμένα όλα τα φάσματα φθορισμού για όλες τις συγκεντρώσεις γλυκόζης στο διάλυμα DMEM για την τιμή διέγερσης 410 nm	53
2.12	Διάγραμμα με συγκεντρωμένα όλα τα φάσματα φθορισμού για όλες τις συγκεντρώσεις γλυκόζης στο διάλυμα DMEM για την τιμή διέγερσης 485 nm	54

2.13	Διάγραμμα έντασης φθορισμού στα 442 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης γλυκόζης στο διάλυμα DMEM	55
2.14	Διάγραμμα λόγου έντασης φθορισμού στα 442 nm προς την ένταση φθορισμού στα 592 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης γλυκόζης στο διάλυμα DMEM . . .	55

Κατάλογος Εικόνων

1.1	Ανατομία Δέρματος	20
1.2	Τύποι Αλληλεπίδρασης φωτός και ιστού	20
1.3	Κατηγοριοποίηση ευρέως χρησιμοποιούμενων μεθόδων παρακολούθησης των επιπέδων γλυκόζης	21
1.4	Ενζυματική - Αμπερομετρική Μέθοδος για την in-vitro μέτρηση της συγκέντρωσης γλυκόζης	22
1.5	Μέθοδος Εξοκινάσης για τη μέτρηση in-vitro συγκέντρωσης της γλυκόζης	23
1.6	Διάταξη της συσκευής για τη μέτρηση γλυκόζης με τη μέθοδο τρυπήματος του δαχτύλου	25
1.7	Αναπτυσσόμενες Τεχνολογίες για την ελάχιστη επεμβατική και μη-επεμβατική μέτρηση της γλυκόζης	27
1.8	Πολωμένο στο επίπεδο φως	29
1.9	Στροφή κατά γωνία α του πολωμένου φωτός	29
1.10	Η Αρχή της οπτικής πολωσιμετρίας στον οφθαλμό για την παρακολούθηση γλυκόζης	30
1.11	Η αρχή της σάρωσης OCT για την παρακολούθηση γλυκόζης	31
1.12	Σχηματική αναπαράσταση των τριών λειτουργιών της NIR φασματοσκοπίας (α)λειτουργία μετάδοσης (β)λειτουργία ανάκλασης (γ)λειτουργία αλληλεπίδρασης	32
1.13	Σχηματική αναπαράσταση του οργάνου φασματοσκοπίας Raman	34
1.14	Βασική οπτική διάταξη για την μη επεμβατική φωτοακουστική μέτρηση της γλυκόζης	35
1.15	Η έννοια της μέτρησης συγκέντρωσης γλυκόζης στον λοβό του αυτιού χρησιμοποιώντας ηλεκτρομαγνητική μέθοδο	36
1.16	Η αρχή της αντίστροφης ιοντοφόρησης για την παρακολούθηση της γλυκόζης	37
1.17	Τα φάσματα εκπομπής και διέγερσης για ένα δεδομένο φθοροφόρο (μόριο που φθορίζει) είναι κατοπτρικές εικόνες το ένα του άλλου	41
1.18	Η διέγερση του χρωμοφόρου με τρία διαφορετικά μήκη κύματος (ΕΞ 1, ΕΞ 2, ΕΞ 3) δεν μεταβάλλει το σχήμα του φάσματος εκπομπής αλλά προκαλεί διακυμάνσεις στην ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού (ΕΜ 1, ΕΜ 2, ΕΜ 3) το οποίο αντιστοιχεί στο μέγεθος του φάσματος διέγερσης	42
2.1	Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer	45
2.2	Υποδοχή κυβέτας	45

2.3	Οπτικό διάγραμμα του φασματοφωτόμετρου φθορισμού	46
3.1	Η διάταξη αναφοράς	58
3.2	Υποδοχή κυβέτας	59
3.3	Διάταξη αναφοράς	60

Κατάλογος Πινάκων

2.1	Συνοπτικός πίνακας με διεγέρσεις και τα φάσματα ανίχνευσης φθορισμού . . .	49
2.2	Συνοπτικός πίνακας με διεγέρσεις και κορυφές φθορισμού	49

Κεφάλαιο **1**

Θεωρητικό υπόβαθρο

1.1 Εισαγωγή

1.1.1 Ορισμός Διαβήτη

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) είναι μια χρόνια νόσος που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία, διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών και οφείλεται σε μειονεκτική έκκριση ή σε μειονεκτική δράση της ινσουλίνης ή σε συνδυασμό των δύο, με αποτέλεσμα την απόλυτη ή σχετική έλλειψη ινσουλίνης[1]. Όταν η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα είναι υψηλότερη από 230 mg/dl, ονομάζεται υπεργλυκαιμία. Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλότερη από 65 mg/dl, η οποία ονομάζεται υπογλυκαιμία.[2]

1.1.2 Κατηγοριοποίηση Τύπων Διαβήτη

Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι διαβήτη: διαβήτη τύπου 1, διαβήτη τύπου 2 και διαβήτη κύησης.

Για τον διαβήτη τύπου 1, λόγω της δικής τους ανοσολογικής απόκρισης, τα β-κύτταρα στο πάγκρεας καταστρέφονται, γεγονός που επηρεάζει τη φυσιολογική λειτουργία της ινσουλίνης και τελικά οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα. Επομένως, οι ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 πρέπει να ελέγχουν την έγχυση ινσουλίνης, προκειμένου να διατηρούν σταθερά τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα.[3]

Η ινσουλίνη σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 δεν μπορεί να απορροφήσει και να διασπάσει τα σάκχαρα που προσλαμβάνονται από τον οργανισμό κανονικά, καταλήγοντας σε μη φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα των ασθενών. Οι υποδοχείς ινσουλίνης που επιτρέπουν στη γλυκόζη να εισέλθει στα κύτταρα μπορεί να καταστραφούν ή να απευαισθητοποιηθούν στην ινσουλίνη. Οι ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 μπορεί να έχουν φυσιολογικά ή αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης, παρόλα αυτά, αυτό δεν επαρκεί για να αντισταθμίσει την αντίσταση του οργανισμού στην ινσουλίνη. Οι ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 χρειάζεται να βελτιώσουν την ευαισθησία του οργανισμού τους στην ινσουλίνη, η οποία μπορεί να επιτευχθεί μέσω της άσκησης, διατροφής, της ινσουλινοθεραπείας και της απώλειας βάρους.[4]

Ενδείξεις του μη φυσιολογικού μεταβολισμού της γλυκόζης στις γυναίκες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, που οδηγούν σε μη φυσιολογικά κατ' επέκταση επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, συγκλίνουν στο διαβήτη κύησης. Ο διαβήτη κύησης μπορεί να αντιμετωπιστεί με

κατάλληλη διαίτα, άσκηση ή να βελτιωθεί με χορήγηση ινσουλίνης. Οι περισσότερες έγκυες γυναίκες μπορούν να ελέγξουν το σάκχαρο στο αίμα τους μέσω διατροφής και τακτικής άσκησης .[5]

1.1.3 Στατιστικά Στοιχεία

Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία, τις τελευταίες δεκαετίες, ο αριθμός των διαβητικών ασθενών παγκοσμίως αυξάνεται συνεχώς. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) εκτιμά ότι μέχρι το 2045, θα υπάρχουν 693 εκατομμύρια διαβητικοί ασθενείς (ηλικίας 18-99 ετών) στον κόσμο και η Κίνα είναι η χώρα με τον μεγαλύτερο αριθμό διαβητικών ασθενών στον κόσμο. Ειδικότερα, καθώς ο αριθμός των ατόμων με διαβήτη συνεχίζει να αυξάνεται, το κόστος της ιατρικής και μη ιατρικής οικονομικής κατανάλωσης αυξάνεται επίσης. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες αναμένεται να ανέλθει από 407,6 δισεκατομμύρια δολάρια το 2015 σε 622,3 δισεκατομμύρια δολάρια μέχρι το 2030 .[3]

1.1.4 Επιπλοκές

Μακροπρόθεσμα, ο διαβήτης μπορεί να οδηγήσει σε χρόνιες επιπλοκές, όπως καρδιακές παθήσεις, νεφρικές παθήσεις, εγκεφαλικό επεισόδιο, απώλεια όρασης και βλάβη του νευρικού συστήματος. [4]

1.1.5 Ρόλος Ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη που εκκρίνεται από το πάγκρεας στο ανθρώπινο σώμα και μπορεί να ρυθμίζει τα επίπεδα γλυκόζης. Αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς ινσουλίνης για να επιτρέψει στα κύτταρα να απορροφήσουν τη γλυκόζη ως πηγή ενέργειας, διατηρώντας έτσι τη γλυκόζη στο αίμα σε φυσιολογικά επίπεδα. Για τους διαβητικούς ασθενείς, επειδή τα αντίστοιχα κύτταρα του σώματος δεν μπορούν να εκκρίνουν ινσουλίνη κανονικά, η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα του οργανισμού βρίσκεται σε ένα μη φυσιολογικό υψηλό επίπεδο (παρατηρείται υπεργλυκαιμία). [3]

1.1.6 Ρόλος Γλυκόζης

Ο συνολικός όγκος αίματος του ανθρώπινου σώματος αποτελείται περίπου το 60% του από πλάσμα, το 40% από ερυθρά αιμοσφαίρια και λιγότερο από το 1% λευκοπλάκια (λευκά αιμοσφαίρια/λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια/αιμοπετάλια). Με τη σειρά του, το πλάσμα αποτελείται κυρίως από ~ 90% νερό, ~ 7% πρωτεΐνη, ~ 0,5% ανόργανα άλατα, ~ 0,4-0,7% λιπίδια, ~ 0,07-0,1% γλυκόζη, ~ 0,07% γαλακτικό οξύ, ουρία και αμινοξέα. Η γλυκόζη στο πλάσμα μεταφέρεται στις αρτηρίες και μέσω αυτών και εν γένει του κυκλοφορικού συστήματος φτάνει στα τριχοειδή αγγεία. Έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα γλυκόζης στις αρτηρίες και τα τριχοειδή αγγεία ήταν σχεδόν τα ίδια. Αφού η γλυκόζη εισέλθει στα τριχοειδή αγγεία, διαχέεται στο υγρό των ιστών γύρω από τα κύτταρα των ιστών. Από τη μία, μετατρέπεται σε ενέργεια. Από την άλλη πλευρά, αποθηκεύεται για μελλοντική χρήση.

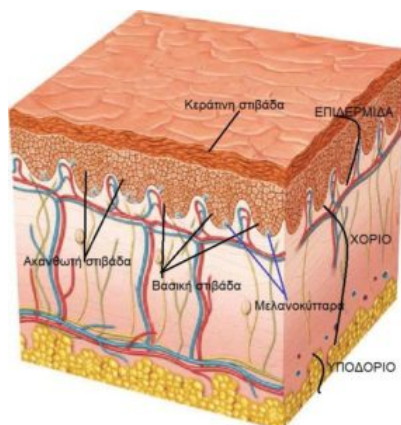
Η ινσουλίνη είναι μια ζωτική ορμόνη στο ανθρώπινο σώμα και η κύρια λειτουργία της είναι

η διατήρηση της γλυκόζης του αίματος του σώματος σε φυσιολογικά επίπεδα. Για τον άνθρωπο, η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας του σώματος και η ινσουλίνη μπορεί να βοηθήσει τα κύτταρα να απορροφήσουν τη γλυκόζη ως πηγή ενέργειας. Ο ρόλος της ινσουλίνης είναι να καταναλώσει την περιεκτικότητα του σώματος σε γλυκόζη στο αίμα. Αντίθετα, όταν το σώμα έχει επαρκή ενέργεια, διεγείρει το συκώτι να αποθηκεύσει γλυκόζη στη μορφή του γλυκογόνου. Προς το παρόν, η αιτία των υπαρχόντων ασθενών με διαβήτη είναι στενά συνδεδεμένη με την ινσουλίνη. Λόγω της αύξησης του αριθμού των διαβητικών ασθενών, πολλά πανεπιστήμια και ερευνητικά ιδρύματα αναπτύσσουν ενεργά εξοπλισμό παρακολούθησης της γλυκόζης αίματος υψηλής απόδοσης, παρέχοντας τη δυνατότητα στους ασθενείς να ανιχνεύσουν έγκαιρα τη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα τους στο σπίτι, ώστε να μπορούν να λαμβάνουν εγκαίρως τα κατάλληλα μέτρα για τον αποτελεσματικό έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα .[6]

1.1.7 Δομή Ανθρώπινου Δέρματος

Εκτός από το διάμεσο υγρό¹, που είναι το πιο άφθονο συστατικό στοιχείο στον ιστό του ανθρώπινου δέρματος, περιλαμβάνονται επίσης αρτηρίες, φλέβες και τριχοειδή αγγεία. Όπως φαίνεται στην παρακάτω **Εικόνα 1.1** [7], τα στρώματα ιστού δέρματος περιλαμβάνουν την κεράτινη στιβάδα με πάχος 10-20 μm, την επιδερμίδα με πάχος 30-100 μm, το χόριο με πάχος 900-1500 μm και τον υποδόριο ιστό με πάχος 1000-5000 μm. Η επιδερμίδα περιέχει περίπου το 15-35% του διαμέσου υγρού χωρίς τα τριχοειδή αγγεία. Το χόριο περιέχει αρτηρίδια, φλεβίδια, τριχοειδή αγγεία και περίπου το 40% του διαμέσου υγρού. Ο υποδόριος ιστός έχει απόθεμα λίπους, υγρό ιστού και αιμοφόρα αγγεία που συνδέουν το χόριο με την κυκλοφορία του αίματος στο σώμα. Επιπλέον, το δέρμα του καθενός έχει τις δικές του οπτικές και διηλεκτρικές ιδιότητες. Σαν αποτέλεσμα της διαφοράς στο σχήμα και το πάχος της στιβάδας του δέρματος και της συγκέντρωσης των συστατικών του υγρού ιστού, οι οπτικές και οι διηλεκτρικές ιδιότητες μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ατόμων. Η πιο άφθονη ουσία στο αίμα είναι ερυθρά αιμοσφαίρια, τα οποία έχουν σημαντική επίδραση στην διηλεκτρικές ιδιότητες των ιστών. Στην in-vivo πειραματική μέτρηση συγκέντρωσης γλυκόζης του αίματος, η διηλεκτρική σταθερά των ερυθρών αιμοσφαιρίων αυξάνεται καθώς μειώνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης [8] .

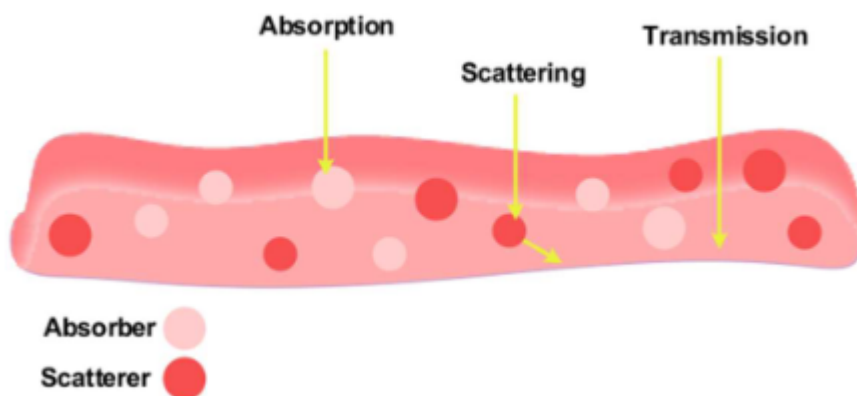
¹Μεσοκυττάριο υγρό, ή διάμεσο υγρό, (intercellular fluid, ή interstitial fluid(ISF)), ονομάζεται το υδατικό περιβάλλον μέσα στο οποίο επιβιώνουν τα κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού. Τα κύτταρα προσλαμβάνουν από το μεσοκυττάριο υγρό όλα τα απαραίτητα συστατικά για την επιβίωσή τους ενώ αντίθετα αποβάλλουν σ' αυτό τα παράγωγα του μεταβολισμού τους. Στους ανώτερους ζωϊκούς οργανισμούς το μεσοκυττάριο υγρό αποτελεί τον συνδετικό κρίκο μεταξύ αίματος και κυττάρων.



Εικόνα 1.1: Ανατομία Δέρματος

1.1.8 Επίδραση Φωτός στους Ιστούς

Λαμβάνοντας υπόψη την ότι η παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα θα πρέπει σαν διαδικασία να είναι εύκολη και αποτελεσματική, οι θέσεις μέτρησης πρέπει να επιλέγονται για εύκολη μέτρηση και να έχουν πρόσβαση σε πολλά τριχοειδή αγγεία, όπως δάχτυλα, αυτιά, χείλη, αντιβράχια, τον πρόσθιο θάλαμο των ματιών και της γλώσσας. Όταν το προσπίπτον φως εισέρχεται στο ανθρώπινο σώμα, αλληλεπιδρά με τις ουσίες στον ιστό και θα απορροφηθεί, θα ανακλαστεί, θα διασκορπιστεί ή θα διαπεράσει, όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα [3].



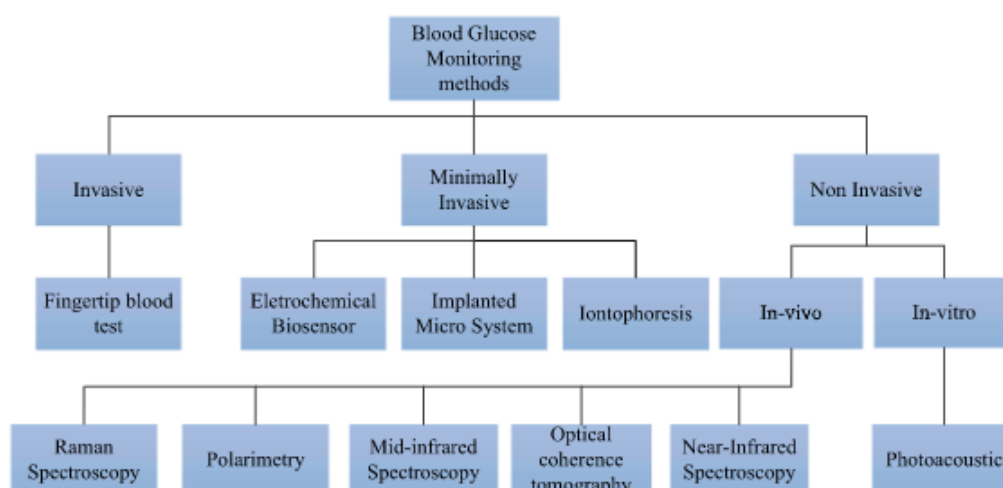
Εικόνα 1.2: Τύποι Αλληλεπίδρασης φωτός και ιστού

Ορισμένα ερευνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι οι παράγοντες που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του φωτός και του αίματος μπορούν να χωριστούν στους ακόλουθους: (1) το μήκος κύματος του φωτός (2) ο βιολογικός ιστός του εξεταζόμενου μέρους. (3) οι οπτικές ιδιότητες ιστού (όπως σχετικός δείκτης διάθλασης, συντελεστής απορρόφησης και συντελεστής σκέδασης)[3].

1.2 Μέθοδοι Παρακολούθησης Συγκέντρωσης Γλυκόζης Αίματος

Μέχρι σήμερα, η παρακολούθηση της γλυκόζης αίματος μπορεί να χωριστεί σε τρεις κατηγορίες: επεμβατική, ελάχιστα επεμβατική καθώς και μη επεμβατική. Μπορεί να φανεί από την *Εικόνα 1.1* η μέθοδος μέτρησης της γλυκόζης στο αίμα έχει εξελιχθεί από την επεμβατική στην ελάχιστα επεμβατική και τελικώς στη μη επεμβατική παρακολούθηση. Αποσκοπείται η μέτρηση της γλυκόζης του αίματος να καταστεί μια ανώδυνη, γρήγορη και μη επεμβατική διαδικασία. Και αυτό γιατί, έως τώρα, η επεμβατική μέθοδος επιφέρει ψυχολογική πίεση στους ασθενείς, και η πληγή από το τρύπημα είναι επιρρεπής στον κίνδυνο ιογενούς μόλυνσης.

Με την ραγδαία ανάπτυξη της τεχνολογίας των υπολογιστών και της χημειομετρίας, οι μη επεμβατικές μέθοδοι παρακολούθησης έχουν αποτελέσει το επίκεντρο της έρευνας στον τομέα της παρακολούθησης της γλυκόζης του αίματος. Όσον αφορά τα μη επεμβατική παρακολούθηση της γλυκόζης αίματος χωρίζεται κυρίως σε *in-vivo* και *in-vitro* μέτρηση. Η μέθοδος μέτρησης *in-vitro* είναι η εξαγωγή υγρού ιστού για την παρακολούθηση της συγκέντρωσης γλυκόζης και η χρήση της συγκέντρωσης αυτής για την έμμεση εκτίμηση της η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα. Αντίθετα, η μέθοδος μέτρησης *in-vivo* είναι η απευθείας χρήση της συσκευής για τη μέτρηση του σακχάρου στο αίμα και η πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδος είναι η οπτική.[3]



Εικόνα 1.3: Κατηγοριοποίηση ευρέως χρησιμοποιούμενων μεθόδων παρακολούθησης των επιπέδων γλυκόζης

1.2.1 Επεμβατικές Μέθοδοι Παρακολούθησης Γλυκόζης

Η συγκέντρωση της γλυκόζης μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας δείγματα πλήρους αίματος, πλάσματος ή ορού αίματος, αν και προτιμώνται τα δύο τελευταία γιατί οι μετρήσεις από πλήρες αίμα είναι συνήθως 15% χαμηλότερες λόγω της πρόσθετης περιεκτικότητας σε

νερό στα αιμοσφαίρια. Ως εκ τούτου, οι τυπικές μέθοδοι απαιτούν μια ορισμένη ποσότητα αίματος, που σημαίνει ότι είναι επεμβατικές.

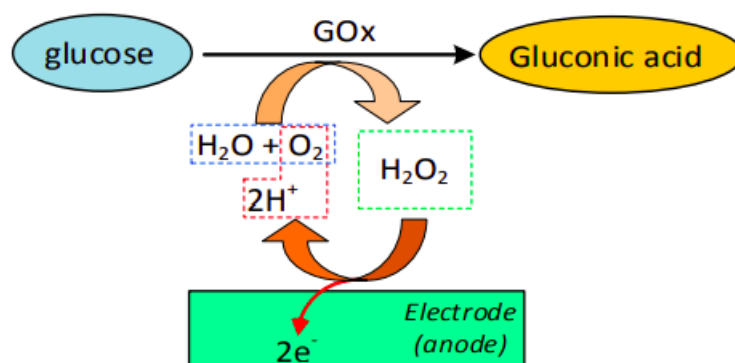
Οι παρούσες τεχνικές μέτρησης της γλυκόζης βασίζονται σε ενζυμικές μεθόδους και μεθόδους εξοκινάσης. Και οι δύο παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ακρίβειας και ειδικότητα. Ενώ τα εργαστήρια χρησιμοποιούν και τις δύο, στην πρωτοβάθμια περίθαλψη (point-of-care) και την οικιακή παρακολούθηση προτιμάται η ενζυματική μέθοδος λόγω της απλότητας και της σχετικής προσιτότητας της. [9]

Εργαστηριακές Τεχνικές

Η ενζυματική-αμπερομετρική και η εξοκινάση είναι οι μέθοδοι που προτιμώνται για τη μέτρηση της γλυκόζης στο αίμα στα εργαστήρια. Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιείται διαθέτει υψηλό επίπεδο ειδικότητας, ευαισθησίας και μπορεί να ανιχνεύσει ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων γλυκόζης, συμπεριλαμβανομένων των υπογλυκαιμικών και υπεργλυκαιμικών επεισοδίων. Τέτοια χαρακτηριστικά σημαίνει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο αναφοράς για τη μέτρηση της απόδοσης των λιγότερο ακριβών οργάνων, π.χ. SMBG (self monitoring blood glucose), CGM (continuous glucose monitoring) και μελλοντικών μη επεμβατικών και ελάχιστα επεμβατικών συσκευών. Άλλωστε, είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος του εργαστηριακού εξοπλισμού μπορεί να ανιχνεύσει και να μετρήσει άλλα σάκχαρα, και χημικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένης της λακτόζης, της μεθανόλης και του υπεροξειδίου του υδρογόνου με τη χρήση άλλων αντιδραστηρίων ή συνδυασμένων μεθόδων.

Ενζυματική - Αμπερομετρική Μέθοδος

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης (GOx) είναι ειδικό για τη γλυκόζη, σε αυτή τη μέθοδο, η οξείδωση της γλυκόζης λαμβάνει χώρα παρουσία του (GOx), οξυγόνου (O_2) και νερού (H_2O) για να σχηματιστεί το γλυκονικό οξύ και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου στη συνέχεια οξειδώνεται ηλεκτροχημικά στην άνοδο ενός ηλεκτροχημικού καθετήρα, παράγοντας ένα αμπερομετρικό σήμα (ρεύμα) ανάλογο της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα.



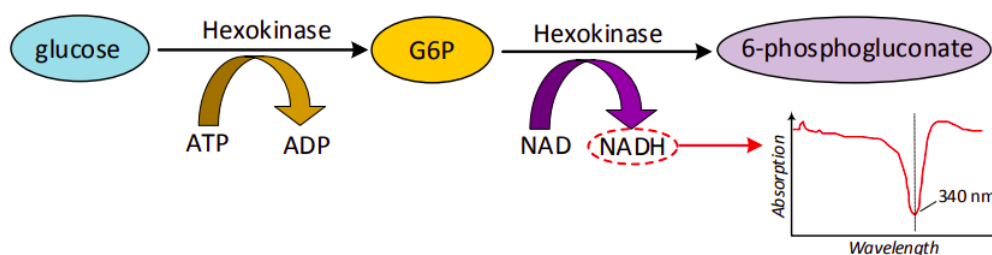
Εικόνα 1.4: Ενζυματική - Αμπερομετρική Μέθοδος για την *in-vitro* μέτρηση της συγκέντρωσης γλυκόζης

Ένας δημοφιλής αναλυτής γλυκόζης που χρησιμοποιεί τέτοια τεχνολογία είναι ο αναλυτής αερίων αίματος, ο οποίος περιέχει διάλυμα GOx μεταξύ της διαπερατής από αέρια μεμβράνης ενός ηλεκτροδίου pO_2 και μιας εξωτερικής ημιπερατής μεμβράνης. Μέσω της διάχυσης, η γλυκόζη διασχίζει την ημιπερατή μεμβράνη και αντιδρά με το GOx.

Μόλις το υπεροξείδιο του υδρογόνου οξειδωθεί, η αντίδραση καταναλώνει το οξυγόνο κοντά στην επιφάνεια του pO_2 ηλεκτροδίου και τότε υπολογίζεται ο ρυθμός κατανάλωσης. Η απώλεια ηλεκτρονίων και ο ρυθμός μείωσης του pO_2 είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο δείγμα.

Μέθοδος Εξοκινάσης

Η μέθοδος εξοκινάσης, γνωστή και ως φωτομετρική μέθοδος, αποτελείται από μια σειρά χημικών αντιδράσεων, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.3**. Στο πρώτο στάδιο, η γλυκόζη αντιδρά με το ένζυμο εξοκινάση, παρουσία τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και ιόντων μαγνησίου, για την παραγωγή 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6P) και διφωσφορική αδενοσίνη (ADP). Στο δεύτερο στάδιο, G6P και (NAD) οξειδώνονται με αφυδρογονάση 6-φωσφορικής γλυκόζης μέχρι να μειωθεί σε 6-φωσφογλυκονικό και (NADH), αντίστοιχα.[10] Η ποσότητα του NADH είναι



Εικόνα 1.5: Μέθοδος Εξοκινάσης για τη μέτρηση in-vitro συγκέντρωσης της γλυκόζης

ανάλογη με την ποσότητα της γλυκόζης στο δείγμα και έχει την ιδιότητα απορρόφησης φωτός στα 340 nm. Η ποσότητα της απορρόφησης είναι ανάλογη με την ποσότητα του NADH, που σημαίνει ότι η γλυκόζη μπορεί να μετρηθεί χρησιμοποιώντας τυπικές φασματοφωτομετρικές τεχνικές.

Κλινική Αξία

Και οι δύο μέθοδοι είναι πολύ συγκεκριμένες, ακριβείς και ευαίσθητες. Ως εκ τούτου, και ανάλογα με τη συγκεκριμένη τεχνολογία που αναπτύχθηκε από κάθε κατασκευαστή, ορισμένα μοντέλα χρησιμοποιούνται ως θεμελιώδη πρότυπα αναφοράς βαθμονόμησης άλλων μετρητών γλυκόζης και σε κεντρικά εργαστήρια. Επίσης, δεδομένου του μικρού μεγέθους ορισμένων μοντέλων, διευκολύνεται το ιατρικό προσωπικό στο να λάβει γρήγορες αναλύσεις άρρωστων ασθενών, που απαιτείται ιδιαίτερα σε μονάδες επειγόντων περιστατικών και εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ).

Τα κύρια μειονεκτήματα που συνδέονται με τις εργαστηριακές μεθόδους είναι η εγγενής επεμβατικότητα αφού όλες αυτές οι μέθοδοι πρέπει να γίνονται in-vitro, δηλαδή με δείγματα αίματος που λαμβάνονται από ασθενείς, η ανάγκη κατάρτισης εργαστηριακού προσωπικού,

που οδηγεί σε πρόσθετο κόστος και οι παρατεταμένες χρονικές περίοδοι αναμονής μέχρι την εξαγωγή εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Εξάλλου, δεν είναι όλος ο εργαστηριακός εξοπλισμός υψηλής ακρίβειας, όπως αποκαλύπτεται από πρόσφατη μελέτη των Liang et al., που δείχνει ότι ορισμένοι αναλυτές αερίων αίματος δεν συμμορφώνονται με τις νέες απαιτήσεις που έχουν τεθεί από το προσχέδιο του Οργανισμού Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α (FDA) 2014 και τον τελικό κανονισμό του 2016 [11], ή μη παροχή ακριβών μετρήσεων στην υπογλυκαιμία περιπτώσεις, ιδιαίτερα σε ασθενείς με ασταθή αιμοδυναμική .

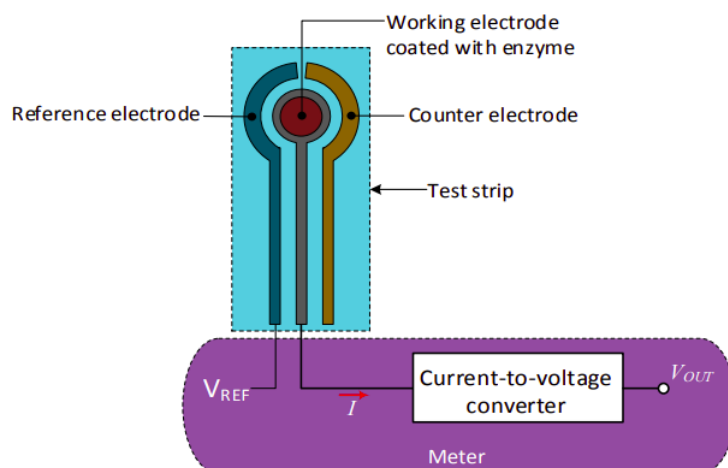
Τεχνικές Οικιακής Παρακολούθησης

Υπάρχουν δύο τύποι συσκευών που προορίζονται για προσωπική χρήση: Μη συνεχούς παρακολούθησης (NCGM) και συνεχούς παρακολούθησης γλυκόζης (CGM). Όπως υποδηλώνει το όνομα, οι συσκευές NCGM (κοινώς γνωστές ως συσκευές αυτοελέγχου της γλυκόζης αίματος SMBG) χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης μόνο σε συγκεκριμένα σημεία της ημέρας, με συχνότητα που εξαρτάται από τον τύπο του διαβήτη, τη διατροφή, τη δοσολογία φαρμακευτικής αγωγής και της κλινικής κατάστασης του ατόμου. Από την άλλη πλευρά, οι συσκευές CGM μπορούν να παρακολουθούν τα επίπεδα γλυκόζης κάθε λίγα λεπτά αυτόματα, καθιστώντας έτσι δυνατή την παρακολούθηση των γρήγορων αλλαγών και της τάσης μείωσης ή αύξησης που χάνονται με τον έλεγχο των συσκευών SMBG. Όμως, η ακρίβεια και η αξιοπιστία που παρουσιάζουν και τα δύο συστήματα τα καθιστούν κατάλληλα στις καταστάσεις πρωτοβάθμιας περίθαλψης (point-of-care) και αυτο-παρακολούθησης.

Αυτοέλεγχος Γλυκόζης Αίματος - Self-Monitoring Blood Glucose—SMBG

Οι συσκευές SMBG είναι τα τυπικά γλυκομετρα που απαιτούν τρύπημα του δακτύλου για πρόσβαση στο τριχοειδές αίμα. Η μέθοδος μέτρησης της γλυκόζης είναι ουσιαστικά η ίδια ηλεκτροχημική τεχνική που περιγράφηκε προηγουμένως. Η κύρια διαφορά όμως είναι ότι η πλήρης αντίδραση και ανίχνευση πραγματοποιείται σε μια ταινία μέτρησης γλυκόζης συνδεδεμένη με ένα μετρητή. Μετά την ρίψη σταγόνας αίματος στη δοκιμαστική ταινία, η γλυκόζη οξειδώνεται παρουσία ενός ενζύμου για να παράγει μια συγκεκριμένη ποσότητα ρεύματος ανάλογη με το επίπεδο γλυκόζης. Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια ταξιδεύουν στο μετρητή που περιέχει έναν μετατροπέα ρεύματος-σε-τάση για παροχή τάσης ανάλογης με το επίπεδο της γλυκόζης.

Η δοκιμαστική ταινία περιέχει το ένζυμο και μια διάταξη τριών ηλεκτροδίων (**Εικόνα 1.4**): το ηλεκτρόδιο εργασίας, το οποίο ανιχνεύει το πραγματικό ρεύμα της αντίδρασης, το ηλεκτρόδιο αναφοράς, που συγκρατεί μια τάση πάντα σταθερή σχετική με το ηλεκτρόδιο λειτουργίας, για να βοηθήσει στη χημική αντίδραση και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο, που τροφοδοτεί το ρεύμα στο ηλεκτρόδιο εργασίας . Ωστόσο, τα νέα μοντέλα χρειάζονται μόνο τα ηλεκτρόδια εργασίας και αναφοράς. Επίσης, ανάλογα με το μοντέλο, ορισμένες συσκευές χρησιμοποιούν οξείδωση γλυκόζης GOx ως ένζυμο, ενώ άλλα χρησιμοποιούν αφυδρογονάση γλυκόζης (GDH) συνδεδεμένη με ένα συνένζυμο, PQQ(πυρρολοκινολίνη-κινόννη) ή FAD(δινουκλεοτίδιο φλαβίνης αδερίνης), αν και έχουν αναφερθεί από ορισμένες μελέτες ζητήματα ανακρίβειας με το GDH-PQQ, λόγω παρεμβολής με άλλα σάκχαρα.[12]



Εικόνα 1.6: Διάταξη της συσκευής για τη μέτρηση γλυκόζης με τη μέθοδο τρυπήματος του δακτύλου

Συνεχής Παρακολούθηση Γλυκόζης - Continuous Glucose Monitoring—CGM

Οι συσκευές CGM αποτελούνται από τρία βασικά μέρη: έναν ασύρματο δέκτη, έναν πομπό και έναν αισθητήρα.

Ο δέκτης διαθέτει οθόνη που εμφανίζει την ένδειξη γλυκόζης. Ο πομπός είναι συνδεδεμένος στον αισθητήρα και μεταδίδει τις μετρήσεις στον δέκτη μέσω κυμάτων RF. Ο αισθητήρας είναι μια μικροσκοπική συσκευή ανίχνευσης που εισάγεται στον υποδόριο ιστό και επεκτείνεται αρκετά ώστε να έχει πρόσβαση στο διάμεσο υγρό (ISF). Στη συνέχεια, με την ηλεκτροχημική τεχνική, ο αισθητήρας χρησιμοποιεί GOx για να οξειδώσει τη γλυκόζη που υπάρχει στο ISF, ακριβώς όπως κάνει μια δοκιμαστική ταινία σε συσκευές SMBG. Το υπεροξείδιο που προκύπτει αντιδρά με την πλατίνα και παράγει ηλεκτρικό ρεύμα, το οποίο διασχίζει κατά μήκος ένα λεπτό σύρμα προς τον πομπό, που βρίσκεται έξω από το δέρμα. Μόλις ο δέκτης λάβει τα δεδομένα από τον πομπό, επεξεργάζεται τις πληροφορίες και υπολογίζει το επίπεδο γλυκόζης.

Κλινική Αξία

Παρόλο που το προφανές πλεονέκτημα των συσκευών CGM είναι η ικανότητα συνεχούς μέτρησης των επιπέδων γλυκόζης, δεν μπορούν να θεωρηθούν ως η βέλτιστη επιλογή για την παρακολούθηση της γλυκόζης του αίματος, καθώς εξακολουθούν να χρειάζονται βαθμονόμηση με την τυπική μέθοδο τρυπήματος των δακτύλων. Επιπλέον, οι συσκευές CGM μετρούν τη γλυκόζη από το ISF, υποδηλώνοντας έτσι την ύπαρξη χρονικού διαστήματος καθυστέρησης μεταξύ 6 και 12 λεπτών [13], που σημαίνει ότι οι μετρήσεις στο ISF δεν αντικατοπτρίζουν το πραγματικό επίπεδο γλυκόζης στο αίμα. Ακόμη, υπάρχουν ζητήματα που σχετίζονται με ανακριβείς μετρήσεις λόγω κακού χειρισμού και κακής τεχνικής αυτοελέγχου, προβλήματα που σχετίζονται με την εισαγωγή του αισθητήρα κάτω από το δέρμα, τον ερεθισμό του δέρματος και δυσφορία με την ένταξη της συσκευής στο σώμα.

Οι συσκευές MBG που υπολογίζουν τα επίπεδα γλυκόζης με το τρύπημα των άνω άκρων (δακτύλων) είναι επί του παρόντος οι πιο αξιόπιστες και ακριβείς συσκευές αυτοελέγχου χάρην

της σχετικής απλότητας της διαδικασίας μέτρησης και της εξάρτησή τους από το τριχοειδές αίμα για τη λήψη ακριβών μετρήσεων γλυκόζης. Δυστυχώς, ο πόνος και η δυσφορία που προκαλούνται με το τακτικό τρύπημα του δακτύλου πολλές φορές την ημέρα και το κόστος που σχετίζεται με τη συνεχή αγορά των ταινιών μέτρησης, αποτρέπουν πολλούς ασθενείς από το να ελέγχουν τακτικά τα επίπεδα γλυκόζης τους, όπως αποδεικνύεται από ορισμένες μελέτες, συμπεριλαμβανομένου μιας που πραγματοποιήθηκε από τους Ward et al το 2015, δείχνοντας ότι το 50% είναι πρόθυμο να μετρήσει τη γλυκόζη του επίπεδα «περιστασιακά, όπως χρειάζεται» [14].

1.2.2 Ελάχιστα Επεμβατικές και Μη επεμβατικές Τεχνολογίες

Τεχνολογίες για την ανίχνευση γλυκόζης χωρίς την επεμβατικότητα, τον πόνο, την ταιπωρία και τους κινδύνους που συνδέονται με τις συνήθεις μεθόδους, έχουν βρεθεί στο επίκεντρο εντατικής έρευνας.

Έτσι, μπορούμε να τις ταξινομήσουμε σε δύο κατηγορίες μεγάλες ομάδες: ελάχιστα επεμβατικές (MI) και μη επεμβατικές (NI).

Οι τεχνολογίες MI είναι εκείνες που χρειάζονται να αφαιρέσουν κάποια μορφή υγρού από το σώμα (π.χ. δάκρυα και διάμεσο υγρό) για να μετρήσουν τη συγκέντρωση γλυκόζης μέσω μιας ενζυμικής αντίδρασης.

Οι τεχνολογίες NI βασίζονται αποκλειστικά σε κάποια μορφή ακτινοβολίας χωρίς την ανάγκη πρόσβασης σε οποιοδήποτε σωματικό υγρό.

Ομοίως, οι τεχνολογίες για την ανίχνευση της γλυκόζης μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις υποομάδες: Οπτικές, θερμικές, ηλεκτρικές και νανοτεχνολογίας (**Εικόνα 1.5**).



Εικόνα 1.7: Αναπτυσσόμενες Τεχνολογίες για την ελάχιστη επέμβατική και μη-επεμβατική μέτρηση της γλυκόζης

Οι οπτικές, με την ευρεία έννοια, περιλαμβάνουν όλες τις τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για να λειτουργούν στις υπέρυθρες και οπτικές ζώνες του φάσματος, δεδομένου ότι αξιοποιούν τις ιδιότητες ανάκλασης, απορρόφησης και σκέδασης του φωτός κατά τη διέλευσή του από βιολογικά μέσα.

Οι θερμικές μέθοδοι παρακολουθούν τη γλυκόζη με την ανίχνευση φυσιολογικών δεικτών που σχετίζονται με τη μεταβολική παραγωγή θερμότητας του μορίου της γλυκόζης, ως εκ τούτου, λειτουργούν στη ζώνη μακρινού υπέρυθρου.

Οι ηλεκτρικές μέθοδοι εκμεταλλεύονται τις διηλεκτρικές ιδιότητες της γλυκόζης σε χαμηλές συχνότητες χρησιμοποιώντας μικρές ποσότητες ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, ρεύματος και υπερήχων.

Τέλος, υπάρχει ο νέος τομέας της νανοτεχνολογίας. Επί του παρόντος, μόνο δύο τεχνικές έχουν αρχίσει να εξερευνούν εκτενώς αυτόν τον νέο χώρο (Συντονισμός επιφανειακών πλάσμων(SPR) και φθορισμός), σε συνδυασμό με οπτικές τεχνικές. Ωστόσο, υπάρχουν πολλές άλλες πιθανές τεχνικές που μπορούν να αναπτυχθούν, όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα (car-

bon tubes [15, 16], αλλά αυτές βρίσκονται ακόμη σε πολύ πρώιμο στάδιο ανάπτυξης, με την περισσότερη πρόοδο να σημειώνεται στο θεωρητικό υπόβαθρο.

Παρά όλα αυτά, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ανεξάρτητα από τον τύπο της τεχνολογίας, όλες αποσκοπούν στην ελαχιστοποίηση της επιρροής της φυσιολογικής μεταβλητότητας και των διαφόρων περιβαλλοντικών συνθηκών.

Φθορισμός

Η τεχνολογία φθορισμού βασίζεται στην αρχή της εκπομπής φωτός φθορισμού σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος μετά την απορρόφηση ακτινοβολίας διαφορετικού ενεργειακού επιπέδου, προκαλώντας διαφορά μήκους κύματος γνωστή ως μετατόπιση Stokes. Η τεχνολογία χρησιμοποιεί ειδικά μόρια που ονομάζονται φθοροφόρα, τα οποία εκπέμπουν φθορίζον φως ειδικών χαρακτηριστικών ανάλογα της συγκέντρωσης της υπό εξέταση αναλυόμενης ουσίας.

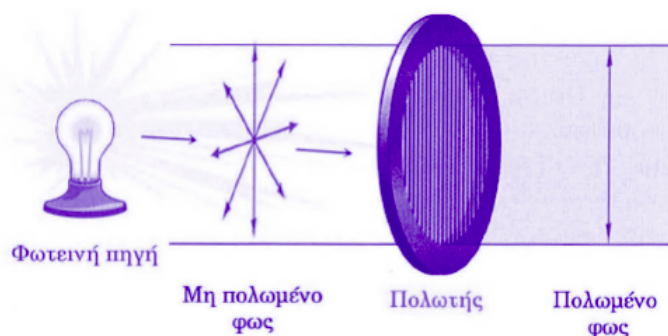
Στην περίπτωση της γλυκόζης, ενώ μερικά από τα φθοροφόρα μπορούν να συνδεθούν με το μόριο της γλυκόζης άμεσα, ζητήματα που σχετίζονται με χαμηλή επιλεκτικότητα, μη αναστρεψιμότητα, παρεμβολές και εξάντληση αναλυτών, καθιστούν απαραίτητη τη χρήση ενδιάμεσων μορίων που ονομάζονται υποδοχείς καθώς συνδέονται περισσότερο με τη γλυκόζη αποτελεσματικά και μπορούν να υποστούν αναστρέψιμες αλλαγές στις τοπικές ιδιότητές τους, που οδηγούν σε αλλαγές φθορισμού [17]. Επιπλέον, οι υποδοχείς μπορεί να είναι διαφορετικών τύπων και φύσης, όπως ένζυμα, παράγωγα βορονικού οξέος, πρωτεΐνες που δεσμεύουν τη γλυκόζη (GBPs), ακόμη και κατασκευασμένα συνθετικά υλικά όπως νανοσωλήνες άνθρακα και κβαντικές κουκίδες (QDs) [18], επιτρέποντας τη χρήση αρκετών τεχνικών φθορισμού και την εποπτεία παραμέτρων σε ένα ευρύ διάστημα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και ειδικότερα από το υπεριώδες (UV) στο εγγύς υπέρυθρο (NIR).

Μεταξύ των πολλών υπάρχουσών τεχνικών, η μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού (FRET), γνωστή και ως μεταφορά ενέργειας συντονισμού Förster, έχει λάβει μεγάλη προσοχή, καθώς εκμεταλλεύεται τη μεταφορά ενέργειας μεταξύ δύο φωτοευαίσθητων μορίων που ονομάζονται δότης (το φθοροφόρο) και δέκτης (ο υποδοχέας). Κατ' αρχήν, όταν η γλυκόζη δεσμεύεται στο μόριο δέκτη, η σύνδεση δέκτη-δότη διαταράσσεται, οδηγώντας σε μειωμένη κατανομή ηλεκτρονίων και αυξημένο φθορισμό. Όμως, ελλείψει γλυκόζης, η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του δότη και του δέκτη αυξάνεται, οδηγώντας σε λιγότερο φθορισμό.

Η παρακολούθηση του φθορισμού μπορεί να μετρηθεί είτε μέσω ανίχνευσης έντασης είτε μέσω ανίχνευσης χρόνου αποσύνθεσης (decay-time sensing). Ωστόσο, το τελευταίο προτιμάται καθώς η διάρκεια ζωής του φθορισμού είναι συγκεκριμένη για κάθε αναλύτη, επιτρέποντας την διαφοροποίηση μεταξύ ουσιών, ακόμα κι αν όλες εκπέμπουν φως ακριβώς στο ίδιο μήκος κύματος. Επιπλέον, η διάρκεια ζωής του φθορισμού μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια σε μέσα σκέδασης, συμπεριλαμβανομένων των στρωμάτων δέρματος [19], υποδεικνύοντας ότι η τεχνολογία φθορισμού είναι κατάλληλη προς εφαρμογή σε συσκευές παρακολούθησης της γλυκόζης που βασίζονται στη διαδερμικό έλεγχο, όπως σε φακούς επαφής και αποσυνδεδεμένους μετατροπείς που εισάγονται στον ιστό, κοινώς γνωστοί ως υποδόρια εμφυτεύματα.

Πολωσιμετρία - Optical Polarimetry (OP)

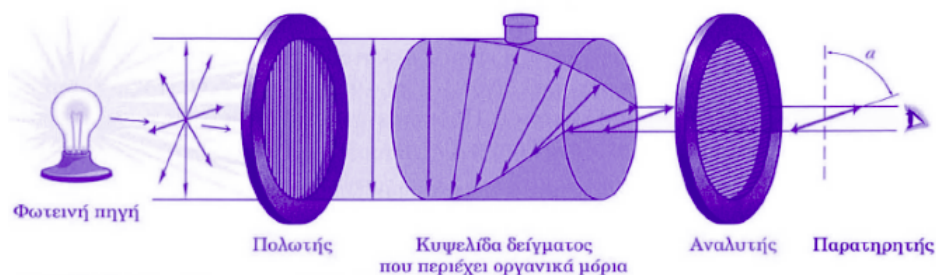
Μια δέσμη φωτός αποτελείται από ηλεκτρομαγνητικά κύματα, τα οποία ταλαντώνονται σε άπειρο αριθμό επιπέδων, κάθετων προς τη διεύθυνση διάδοσης του φωτός [20]. Όταν μια δέσμη φωτός διέλθει από μια συσκευή, που ονομάζεται πολωτής, διέρχονται μόνο τα κύματα που ταλαντώνονται σε ένα επίπεδο και το φως αυτό ονομάζεται πολωμένο στο επίπεδο φως (**Εικόνα 1.8** [21]).



Εικόνα 1.8: Πολωμένο στο επίπεδο φως

Όταν μια δέσμη πολωμένου στο επίπεδο φωτός διέλθει από ένα διάλυμα ορισμένων οργανικών μορίων (λ.χ. σάκχαρα), το επίπεδο της πόλωσης στρέφεται (**Εικόνα 1.9**). Η οπτική πολωσιμετρία εκμεταλλεύεται την έννοια των "οπτικά ενεργών ενώσεων, δηλαδή ενώσεις που έχουν την ιδιότητα να στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός. Η στροφή του επιπέδου πόλωσης μετρείται με ένα πολωσίμετρο. Περιστρέφοντας τον αναλυτή έως ότου το πολωμένο φως διέλθει από αυτόν, υπολογίζεται η στροφή που προκάλεσε η οπτικά ενεργή ουσία. Το μέγεθος της στροφής συμβολίζεται με το γράμμα α και εκφράζεται σε μοίρες. Το μέγεθος της στροφής στο πολωσίμετρο εξαρτάται από:

1. τη συγκέντρωση των οπτικά ενεργών μορίων (με τρόπο ανάλογο)
2. το μήκος της κυψελίδας του δείγματος (με τρόπο ανάλογο)
3. το μήκος κύματος του φωτός που χρησιμοποιείται

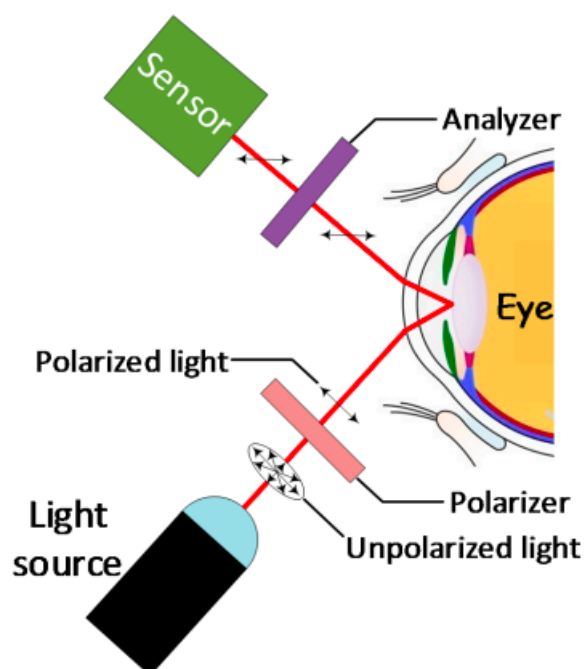


Εικόνα 1.9: Στροφή κατά γωνία α του πολωμένου φωτός

Η γλυκόζη είναι ένα οπτικά ενεργό μόριο και άρα μπορεί να περιστρέψει το επίπεδο πόλωσης μιας δέσμης φωτός κατά γωνία α , κατά τη ωρολογιακή φορά, οπότε χαρακτηρίζεται ως δεξιόστροφα οπτικά ενεργό μόριο. Το ποσό της περιστροφής είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας, το μήκος της οπτικής διαδρομής, της θερμοκρασίας και του

μήκους κύματος της δέσμης laser, η οποία είναι συνήθως κάπου μεταξύ της άνω περιοχής του NIR και της κατώτερης περιοχής της οπτικής ζώνης (~780–400 nm).

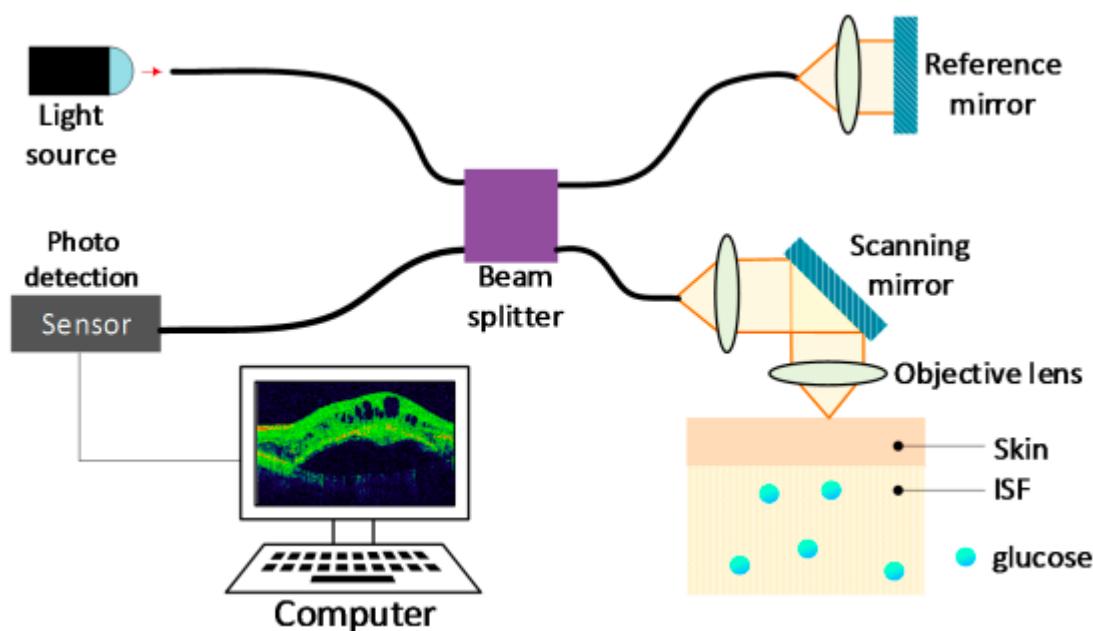
Δυστυχώς, η ελάχιστη οπτική περιστροφή που σχετίζεται με το φυσιολογικό επίπεδο γλυκόζης, η παρουσία άλλων ενεργών μορίων και ο υψηλός βαθμός σκέδασης φωτός στο δέρμα και του ιστού, καθιστούν αδύνατη τη χρήση οπτικής πολωσιμετρίας στο δέρμα. Ωστόσο, είναι δυνατή η χρήση της στο υδατοειδές υγρό στον εμπρόσθιο θάλαμο του ματιού (**Εικόνα 1.10**) λόγω των εξαιρετικών οπτικών ιδιοτήτων [22]. Η μέθοδος συνίσταται στην πόλωση του φωτός που εκπέμπεται από μια πηγή φωτός πριν φτάσει στο μάτι. Το ανακλώμενο φως στη συνέχεια αναλύεται για να προσδιοριστεί η γωνία περιστροφής α και η έντασή του. Τέτοια τεχνική έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης μικρών ποσοτήτων γλυκόζης και μάλιστα με πολύ υψηλή ανάλυση, εφόσον ζητήματα όπως λ.χ η ευαισθησία στη θερμοκρασία και την κίνηση μπορούν να αντιμετωπιστούν κατάλληλα.



Εικόνα 1.10: Η Αρχή της οπτικής πολωσιμετρίας στον οφθαλμό για την παρακολούθηση γλυκόζης

Οπτική Τομογραφία Συνοχής - Optical Coherence Tomography (OCT)

Η οπτική τομογραφία συνοχής είναι μια τεχνολογία απεικόνισης που βασίζεται στις αρχές της συμβολομετρίας² χαμηλής συνοχής με συνεκτική ακτινοβολία [23], που είναι ικανή να ανιχνεύει αλλαγές στα οπτικά χαρακτηριστικά των βιολογικών ιστών σε αναλύσεις τάξης μικρόμετρων. Παρά το γεγονός ότι αρχικά αναπτύχθηκε για τομογραφική απεικόνιση του ματιού, μπορεί σήμερα να μετρήσει τη συγκέντρωση γλυκόζης μέσω του δέρματος με αποδεκτή ακρίβεια και ειδικότητα. Η τεχνολογία συνίσταται στην ακτινοβολία του δέρματος με συνεκτικό φως³, με μήκος κύματος μεταξύ 800 και 1300 nm. Ορισμένοι μελετητές χρησιμοποίησαν ως πηγή φωτός δέσμη LASER [24]. Η οπισθοσκεδαζόμενη ακτινοβολία που δημιουργείται στη συνέχεια συνδυάζεται με μια αναφορά για να παραχθεί ένα συμβολομετρικό σήμα που ανιχνεύεται από έναν φωτοανιχνευτή, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.11**. Επομένως, εάν προκύψει αύξηση της γλυκόζης, θα αυξήσει τον δείκτη διάθλασης και θα μειώσει τον συντελεστή σκέδασης, δημιουργώντας μείωση της αναντιστοιχίας του δείκτη διάθλασης μεταξύ του μέσου και της αναφοράς, που είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση γλυκόζης.



Εικόνα 1.11: Η αρχή της σάρωσης OCT για την παρακολούθηση γλυκόζης

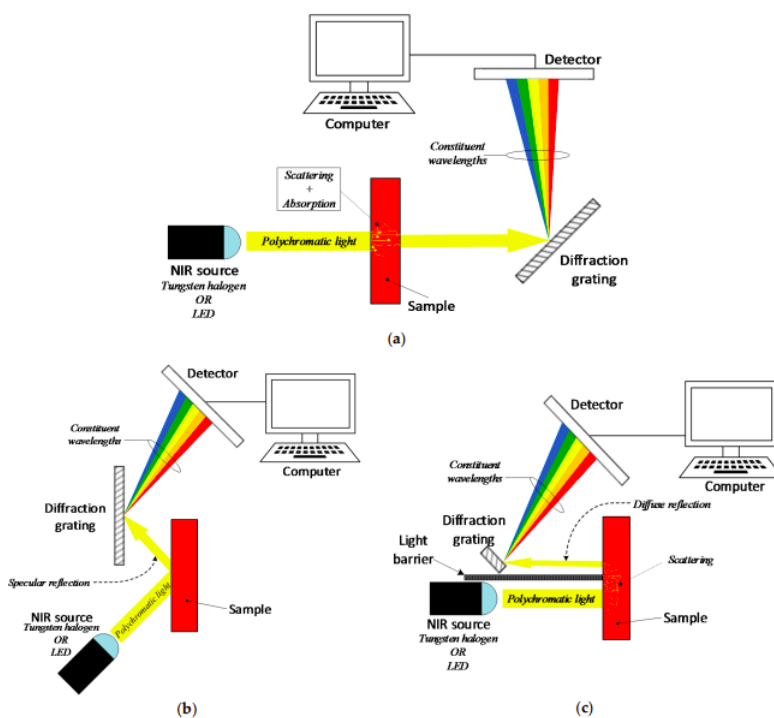
Τα μεγάλα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι προσφέρει υψηλή ευκρίνεια, υψηλή αναλογία σήματος προς θόρυβο (SNR) και μεγάλο βάθος διείσδυσης, τα οποία είναι πολύ επιθυμητά χαρακτηριστικά στη μη επεμβατική παρακολούθηση της γλυκόζης. Έτσι, εφόσον επιλυθούν ζητήματα όπως η ευαισθησία στην αλλαγή θερμοκρασίας και την κίνηση, αυτή η τεχνολογία παρουσιάζει πολλές προοπτικές.

²Η συμβολομετρία είναι μια τεχνική στην οποία ηλεκτρομαγνητικά κύματα συμβάλλουν για να εξάγουμε πληροφορίες για τα κύματα. Αν είναι συμφασικά, τα πλάτη προστίθενται (ενισχυτική συμβολή), ενώ αν έχουν διαφορά φάσης 180° αλληλοεξουδετερώνονται (αποσβεστική συμβολή).

³Η συνοχή είναι μια ιδιότητα του φωτός που επιτρέπει στα κύματα να σχηματίζουν προσωρινά ή στάσιμα μοτίβα παρεμβολών. Η συνοχή ορίζεται σε δύο κύματα. Εάν δύο κύματα είναι μονοχρωματικά (έχουν το ίδιο μήκος κύματος, άρα την ίδια συχνότητα) και είναι της ίδιας φάσης, αυτά τα δύο κύματα ορίζονται ως συνεκτικά κύματα

Φασματοσκοπία Εγγύς Υπερύθρου (Near-Infrared)

Η τεχνολογία Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) βασίζεται στην απορρόφηση και τη σκέδαση μήκων κύματος στην περιοχή από 780 nm έως 2500 nm λόγω μοριακών δονήσεων και περιστροφής δεσμών στο εσωτερικό του μορίου [25]. Χρησιμοποιεί τρεις βασικούς τρόπους μέτρησης: μετάδοση, ανάκλαση και της αλληλεπίδρασης. Ωστόσο, όλα βασίζονται στην ίδια θεμελιώδη τεχνολογία, το φασματόμετρο διασποράς. Στη λειτουργία μετάδοσης (**Εικόνα 1.12α**), μια πηγή φωτός ακτινοβολεί πολυχρωμικό φως στο δείγμα, και ένα πλέγμα περίθλασης στην άλλη πλευρά διασπά τη μεταδιδόμενη ακτινοβολία στα συστατικά της μήκη κύματος πριν ανιχνευθούν και αναλυθούν από τον ανιχνευτή και υπολογιστή αντίστοιχα. Στη λειτουργία ανάκλασης (**Εικόνα 1.12β**), το πλέγμα περίθλασης και ο ανιχνευτής βρίσκονται στην ίδια πλευρά της πηγής για την ανίχνευση της κατοπτρικής ανάκλασης, δηλαδή ανάκλαση σε καθορισμένη γωνία, από το δείγμα. Ομοίως, στη λειτουργία αλληλεπίδρασης (**Εικόνα 1.12γ**), ανιχνεύεται επίσης το ανακλώμενο φως από το δείγμα, αλλά χρησιμοποιείται ένα φράγμα φωτός μεταξύ των δεσμών που προσπίπτουν και αυτών που ανακλώνται, για να διαχωρίσουν το οπτικό πεδίο του ανιχνευτή από το φωτιζόμενη περιοχή. Όλοι οι τρόποι λειτουργίας είναι κατάλληλοι για τη μέτρηση της απορρόφησης/διαπερατότητας και της διασποράς στο δείγμα και η προτίμηση για ένα από αυτά βασίζεται μόνο στον τύπο του μέσου. Για παράδειγμα, η λειτουργία μετάδοσης προτιμάται για την ανάλυση υγρών και πολύ λεπτών ή διαφανών δειγμάτων, ενώ οι λειτουργίες ανάκλασης και αλληλεπίδρασης, προτιμώνται με πυκνά στερεά ή παχιά δείγματα.



Εικόνα 1.12: Σχηματική αναπαράσταση των τριών λειτουργιών της NIR φασματοσκοπίας (α)λειτουργία μετάδοσης (β)λειτουργία ανάκλασης (γ)λειτουργία αλληλεπίδρασης

Αν και στη ζώνη NIR η γλυκόζη δεν παρουσιάζει ισχυρή απορρόφηση σε σύγκριση με άλλες περιοχές, όπως η φασματοσκοπία MIR, το νερό επίσης δεν απορροφά μεγάλη ακτινοβολία NIR. Ως αποτέλεσμα, μέχρι το 95% του φωτός μπορεί να διαπεράσει το εξωτερικό στρώμα της επιδερμίδας (stratum corneum) για να φτάσει σε περιοχές με υψηλότερη συγκέντρωση αίματος, χωρίς να επηρεάζεται από τη μελάγχρωση του δέρματος[26]. Επίσης, εξαρτήματα και υλικά για τη φασματοσκοπία NIR είναι διαθέσιμα στην αγορά σε προσιτές τιμές. Όλα αυτά τα πλεονεκτήματα στρέφουν το ενδιαφέρον προς την τεχνολογία που βασίζεται σε NIR ως την πρώτη επιλογή για την ανάπτυξη μη επεμβατικών συσκευών αυτοελέγχου για ανίχνευση γλυκόζης. Από την άλλη πλευρά, η φασματοσκοπία NIR παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως υψηλό βαθμό σκέδασης στον ιστό και παρεμβολή πρωτεϊνών και οξέων που μοιράζονται παρόμοια χαρακτηριστικά απορρόφησης με το μόριο γλυκόζης, οδηγώντας σε αυξημένη πολυπλοκότητα και αναξιοπιστία κατά την ανάλυση του ανιχνευμένου σήματος [27]. Ως αποτέλεσμα, το ενδιαφέρον προσανατολίζεται σε εναλλακτικές τεχνολογίες που χρησιμοποιούν NIR. Ένα από αυτά είναι η φασματοσκοπία Raman που προσδιορίζει πολύ καλά καθορισμένες κορυφές απορρόφησης και θα αναλυθεί στη συνέχεια.

Φασματοσκοπία Μέσου Υπερύθρου(Mid-Infrared)

Η φασματοσκοπία μεσαίας υπέρυθρης ακτινοβολίας (MIRS) είναι μια επίσης τεχνική φασματοσκοπίας, η οποία βασίζεται στις ίδιες αρχές διαμόρφωσης και απορρόφησης συστήματος της φασματοσκοπίας NIR, αλλά χρησιμοποιείται στην περιοχή του μεσαίου υπέρυθρου, περίπου μεταξύ 120 THz (2,5 μm) και 30 THz (10 μm)[28].

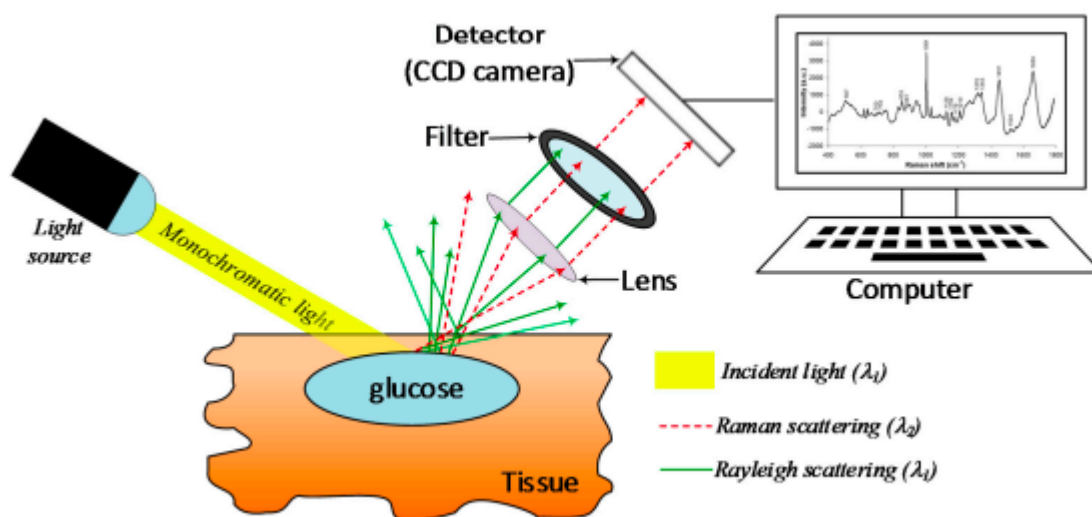
Λόγω του μεγαλύτερου μήκους κύματος, υπάρχει μικρότερη σκέδαση της ακτινοβολίας MIR στον ιστό, οδηγώντας σε υψηλότερους ρυθμούς απορρόφησης και συγκεκριμένες ευκρινείς γραμμές απορρόφησης στο φάσμα, ειδικά μεταξύ 8–10 μm. Αυτό το χαρακτηριστικό σημαίνει ότι τα μόρια έχουν ένα μοναδικό φάσμα στην περιοχή MIR, καθιστώντας το ιδανικό για μοριακή ταυτοποίηση. Δυστυχώς, η ισχυρή απορρόφηση νερού σε αυτήν την περιοχή δεν επιτρέπει στα σήματα MIR να διεισδύσουν περισσότερο από μερικά μικρόμετρα στον ιστό (100 μm περίπου), καθιστώντας απαραίτητη τη χρήση ισχυρών πηγών MIR όπως το Quantum Cascade Laser (QCL)[29], και τη χρήση συμπληρωματικών τεχνολογιών, όπως η φωτοακουστική φασματοσκοπία, που συζητείται σε ακόλουθη υποενοότητα, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία στην ανίχνευση γλυκόζης.

Φασματοσκοπία Raman

Ο βαθμός σκέδασης του μονοχρωματικού φωτός καθορίζεται με βάση το φαινόμενο Raman (Raman effect). Όταν το φως ενός μήκους κύματος χτυπά έναν στόχο, παράγει διάσπαρτο φως που ταξιδεύει προς όλες τις κατευθύνσεις. Η πλειοψηφία αυτής της ακτινοβολίας, που ονομάζεται ελαστική ή σκέδαση Rayleigh, έχει το ίδιο μήκος κύματος με αυτό του προσπίπτοντος φωτός, ενώ το υπόλοιπο είναι απλώς μια μικρή ποσότητα σκεδαζόμενης ακτινοβολίας με διαφορετικό μήκος κύματος, που ονομάζεται «ανελαστική σκέδαση» ή «σκέδαση Raman». Μια τέτοια διαφορά μήκους κύματος είναι η μετατόπιση Raman, και αντιπροσωπεύει τη διαφορά μεταξύ της αρχικής και της τελικής κατάστασης δόνησης του μορίου υπό μελέτη. Συνεπώς, η φασματοσκοπία Raman εξαρτάται από τις καταστάσεις περιστροφής και

δόνησης μέσα στα μόρια, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση συγκεκριμένων ζωνών απορρόφησης και την ποσοτικοποίηση των αντίστοιχων μορίων [26], που σημαίνει ότι οι θέσεις κορυφής στο φάσμα Raman δείχνουν τους τρόπους δόνησης της κάθε λειτουργικής ομάδας μέσα στο μόριο. Έτσι, υποδεικνύοντας ότι η μετατόπιση Raman (εκφράζεται σε κυματοαριθμούς, cm^{-1}) παραμένει σταθερή ανεξάρτητα από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός.

Στην περίπτωση της γλυκόζης, οι πιο αντιπροσωπευτικοί τρόποι δόνησης είναι αυτοί που συνδέονται με τη ζώνη τάνυσης C-H, γύρω στα 2900 cm^{-1} , και οι ζώνες τάνυσης C—O και C—C μεταξύ 800 και 1300 cm^{-1} . [30] Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.13**, η βασική διαμόρφωση ενός φασματόμετρου Raman αποτελείται από έναν φακό που συλλέγει μέρος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και την κατευθύνει σε ένα φίλτρο, για να αφήσει μόνο το σκεδαζόμενο φως Raman αισθητό από τον ανιχνευτή. Ο υπολογιστής κάνει την επεξεργασία του σήματος και παρέχει την αντίστοιχη μετατόπιση Raman. Δυστυχώς, οι παρεμβολές και τα ζητήματα ασάφειας εμποδίζουν τη φασματοσκοπία Raman από την παροχή ακριβών μετρήσεων γλυκόζης *in vivo*.

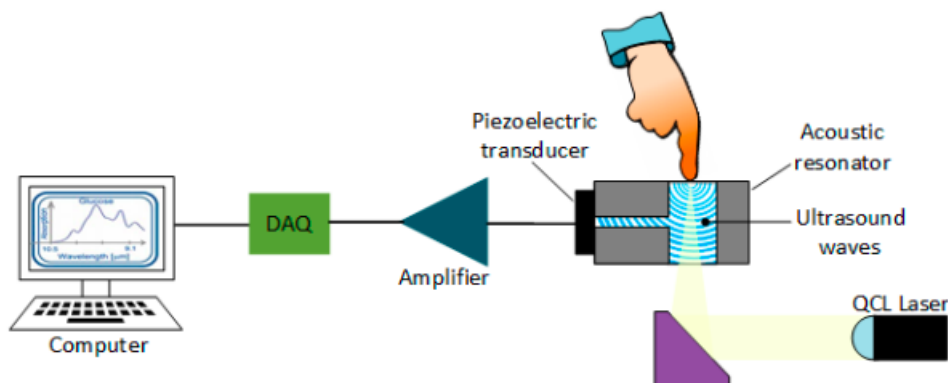


Εικόνα 1.13: Σχηματική αναπαράσταση του οργάνου φασματοσκοπίας Raman

Φωτοακουστική Φασματοσκοπία -Photoacoustic Spectroscopy (PAS)

Αυτή η τεχνολογία χρησιμοποιεί την ίδια ιδέα των υπερήχων κυμάτων, αλλά χρησιμοποιεί σύντομους παλμούς λέιζερ με ένα μήκος κύματος που απορροφάται από ένα συγκεκριμένο μόριο στο υγρό για να παράγει μικροσκοπική εντοπισμένη θερμότητα, ανάλογα με την ειδική θερμοχωρητικότητα του υπό εξέταση ιστού. Η απορροφημένη θερμότητα προκαλεί μια ογκομετρική διαστολή του μέσου, δημιουργώντας ένα κύμα υπερήχων που μπορεί να ανιχνευθεί από ακουστικό αισθητήρα ή αισθητήρα πίεσης. Παρακολουθώντας τις παραλλαγές peak-to-peak του σήματος που ανιχνεύτηκε, είναι δυνατόν να συσχετιστούν με τις διακυμάνσεις των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.

Για τη μη επεμβατική ανίχνευση της γλυκόζης, τα παλμικά και συνεχόμενα κύματα (CW) είναι οι δύο βασικές μορφές διέγερσης. Στη παλμική λειτουργία, οι παλμοί έχουν διάρκεια τάξης νανοδευτερολέπτων και έναν ρυθμό επανάληψης παλμών μερικών kilohertz, οδηγώντας σε γρήγορη και αδιαβατική θερμική διαστολή του δείγματος και δημιουργώντας ένα ευρύ φάσμα ακουστικών συχνοτήτων, μαζί με "τρέμουλο" (jitter) και ακουστικό θόρυβο στο ευρύ φάσμα του ανιχνευτή (μορφοτροπία) [31]. Από την άλλη πλευρά, η διέγερση CW χρησιμοποιεί ένα διαμορφωμένο συνεχές κύμα, δημιουργώντας μια ενιαία ακουστική συχνότητα στο ανιχνευόμενο φάσμα και ένα υψηλό λόγο σήματος προς θόρυβο (SNR).



Εικόνα 1.14: Βασική οπτική διάταξη για την μη επεμβατική φωτοακουστική μέτρηση της γλυκόζης

Η **Εικόνα 1.14** δείχνει τη βασική διαμόρφωση της ανίχνευσης PAS. Το φως που εκπέμπεται από ένα λέιζερ προσκρούει στο δείγμα για τη δημιουργία του υπερηχητικού κύματος, με τη διαδικασία που συζητήθηκε προηγουμένως. Το παραγόμενο υπερηχητικό κύμα διαδίδεται μέσω του ακουστικού συντονιστή, γνωστό και ως κύτταρο, και φτάνει στον ανιχνευτή, που γενικά αποτελείται από έναν πιεζοηλεκτρικό μορφοτροπία όπως ένα μικρόφωνο. Το ηλεκτρικό σήμα στην έξοδο του αισθητήρα στη συνέχεια ενισχύεται, ψηφιοποιείται και αποστέλλεται στον υπολογιστή για ανάλυση. Αυτή η διαμόρφωση, ωστόσο, έχει το κύριο μειονέκτημα της χαμηλής ευαισθησίας για την in-vivo ανίχνευση της γλυκόζης. Έτσι, όπως προτείνουν οι Kottmann et al. [32], μια εναλλακτική σε αυτή τη μέθοδο είναι η χρήση δύο πηγών λέιζερ. Το ένα καλύπτει μήκη κύματος ισχυρής απορρόφησης γλυκόζης και το άλλο καλύπτει περιοχές που δεν είναι ευαίσθητες σε γλυκόζη, προκειμένου να επιτευχθεί μεγάλη αναλογία μεταξύ των δύο μετρήσεων, βελτιώνοντας το συνολικό SNR του συστήματος. Επί του πα-

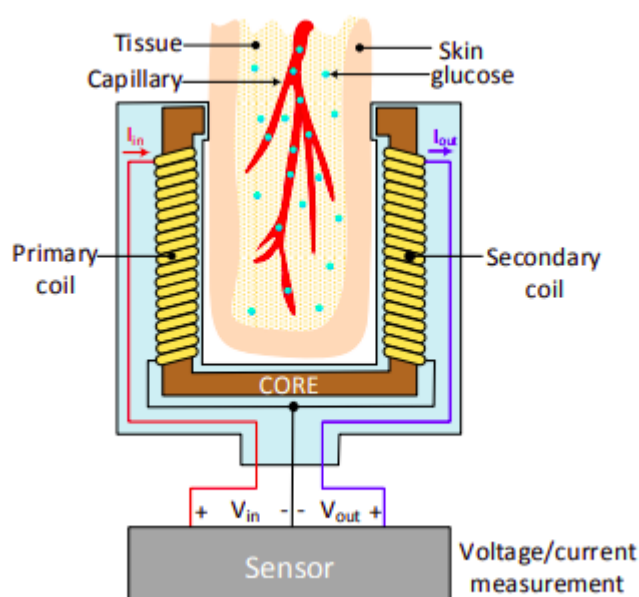
ρόντος, η διάταξη αυτή παρέχει καλή σταθερότητα, αλλά η ευαισθησία εξακολουθεί να είναι χαμηλή, αν και μπορεί να βελτιωθεί αυξάνοντας την ισχύ του λέιζερ .

Ένα πλεονέκτημα που παρουσιάζει η PAS είναι πως μπορεί να χρησιμοποιήσει ένα ευρύ φάσμα μηκών κύματος, από υπεριώδες μέχρι NIR. Ωστόσο, μέχρι πρόσφατα οι δοκιμές έδειξαν ότι το PAS μπορεί ακόμη και να χρησιμοποιηθεί και στη ζώνη MIR. Αυτή η εξέλιξη μας επιτρέπει να εκμεταλλευτούμε τα ισχυρά χαρακτηριστικά απορρόφησης του μορίου της γλυκόζης μεταξύ $800\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$, παρά το χαμηλό βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας αυτής στο ανθρώπινο δέρμα ($8,33\text{--}12,5\text{ }\mu\text{m}$). Ως αποτέλεσμα, οι τρέχουσες προσπάθειες επικεντρώνονται στη χρήση των QCL για τη βελτίωση του SNR σε μέρη του σώματος στα οποία είναι εφικτό να φτάσει στο διάμεσο υγρό (ISF), δηλαδή σε βάθος $10\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$ [33].

Ηλεκτρομαγνητικός Έλεγχος - Electromagnetic Sensing

Αυτή η τεχνολογία υπολογίζει το ρεύμα, ή την τάση, το οποίο είναι ανάλογο με τη μαγνητική σύζευξη μεταξύ δύο επαγωγέων [34]. Δεδομένου ότι η σύζευξη εξαρτάται από τα διηλεκτρικά χαρακτηριστικά του μέσου μεταξύ των δύο πηνίων, είναι επίσης ανάλογη με τη συγκέντρωση και τον τύπο της αναλυόμενης ουσίας (**Εικόνα 1.15**).

Με άλλα λόγια, ο λόγος μεταξύ των τάσεων εισόδου και εξόδου, ή μεταξύ των ρευμάτων, είναι ανάλογος της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Επιπλέον, η συχνότητα του σήματος παίζει θεμελιώδη ρόλο για την παραγωγή επαρκούς σύζευξης, αν και αυτό εξαρτάται επίσης από τη θερμοκρασία του δείγματος υπό εξέταση. Ως αποτέλεσμα, οι συχνότητες στη ζώνη μεταξύ 2.4 MHz και 2.9 MHz είναι γενικά κατάλληλες για την ανίχνευση παραλλαγών γλυκόζης in-vivo, ενώ άλλοι ερευνητές, όπως οι Melikyan et al, προτείνουν ότι τα 7.7 GHz είναι καλύτερη επιλογή [35].



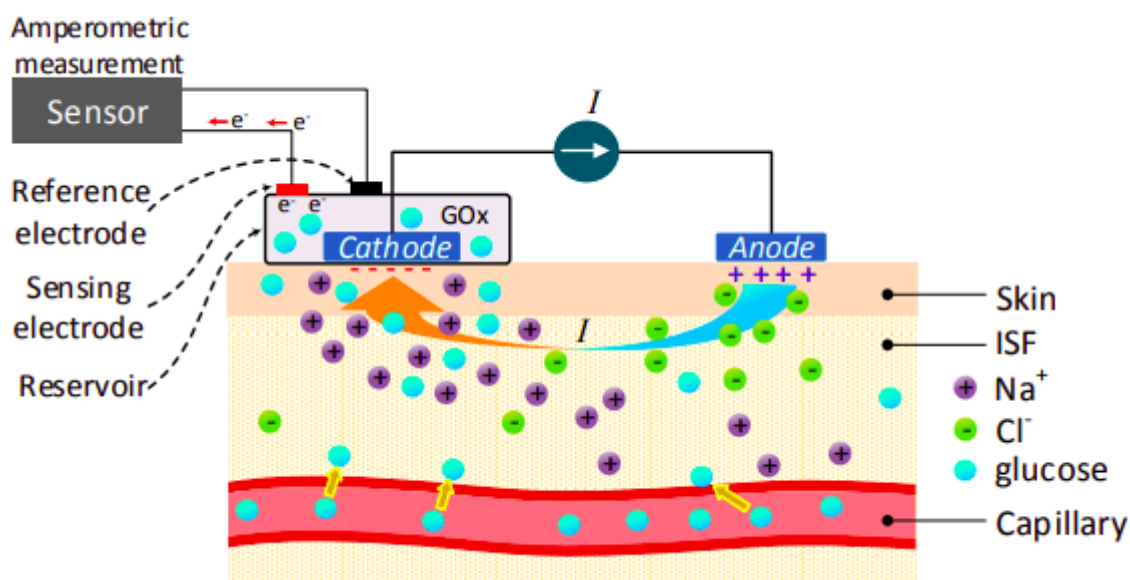
Εικόνα 1.15: Η έννοια της μέτρησης συγκέντρωσης γλυκόζης στον ροδό του αυτιού χρησιμοποιώντας ηλεκτρομαγνητική μέθοδο

Υπέρηχος - Ultrasound

Αυτή η τεχνολογία υπολογίζει το χρόνο διάδοσης των κυμάτων υπερήχων μέσω των μέσων. Όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση γλυκόζης, τόσο πιο γρήγορα διαδίδεται το υπερηχητικό κύμα μέσα στο μέσο, μειώνοντας άρα το χρόνο διάδοσης. Ανάλογα με την ισχύ των δυνάμεων που συγκρατούν τους δεσμούς μεταξύ των μορίων και την πυκνότητα του μέσου, το ρευστό ή ο ιστός έχει έναν ορισμένο βαθμό συμπιεστότητας που καθορίζει την ακουστική ταχύτητα κυμάτων χαμηλής συχνότητας μέσα στο μέσο [36]. Συνεπώς, αλλαγές στη συγκέντρωση της γλυκόζης στο εξωκυττάριο υγρό επηρεάζουν την πυκνότητα και την αδιαβατική συμπιεστότητα, επηρεάζοντας γραμμικά κατ' επέκταση την ακουστική αντίσταση.

Αντίστροφη Ιοντοφόρηση - Reverse Iontophoresis (RI)

Η αντίστροφη ιοντοφόρηση κατηγοριοποιείται ως «ελάχιστα επεμβατική» τεχνολογία, καθώς βασίζεται στην κυκλοφορία ενός μικρού ηλεκτρικού ρεύματος μεταξύ μιας ανόδου και μιας καθόδου που βρίσκονται στην επιφάνεια του δέρματος για να έχουν πρόσβαση σε μια μικρή ποσότητα διάμεσου υγρού (ISF). Η μετανάστευση των ιόντων νατρίου κυρίως παράγει το ρεύμα, προκαλώντας μια συναγωγική ροή (ηλεκτρο-οσμωτική ροή) του ενδιάμεσου υγρού (ISF), μεταφέροντας μαζί του μόρια γλυκόζης προς την κάθοδο [37]. Στην κάθοδο, υπάρχει ένας τυπικός αισθητήρας γλυκόζης που μετρά τη συγκέντρωση γλυκόζης απευθείας με την ενζυματική μέθοδο, δηλαδή οξείδωση με ένζυμο, όπως η οξειδάση της γλυκόζης (GOx) όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.16**.



Εικόνα 1.16: Η αρχή της αντίστροφης ιοντοφόρησης για την παρακολούθηση της γλυκόζης

Η τεχνολογία RI είναι μια από τις πιο διερευνημένες μεθόδους για την παρακολούθηση της γλυκόζης διότι, με δεδομένο ότι έχει πρόσβαση σε ένα δείγμα γλυκόζης, σημαίνει ότι έχει υψηλό επίπεδο ακρίβειας.

1.3 Κατανόηση του φαινομένου του φθορισμού

1.3.1 Απορρόφηση Ενέργειας

Η εκπομπή φωτός από ένα σώμα, η οποία δεν οφείλεται στην υψηλή του θερμοκρασία καλείται φωταύγεια. Ένα σύστημα που εκπέμπει φωταύγεια χάνει ενέργεια. Συνεπώς, το σύστημα χρειάζεται να απορροφήσει κάποιο είδος ενέργειας πρώτα και για αυτό τα είδη της φωταύγειας διαχωρίζονται ανάλογα με την πηγή αυτής της ενέργειας. Διακρίνουμε έτσι την ηλεκτροφωταύγεια, τη ραδιοφωταύγεια, τη χημειοφωταύγεια και τη φωτοφωταύγεια. Στην τελευταία μορφή φωταύγειας, η ενέργεια προέρχεται από την απορρόφηση υπεριώδους, ορατού ή υπέρυθρου φωτός.

1.3.2 Ενεργειακές Καταστάσεις

Η απορρόφηση πραγματοποιείται για διακριτά ποσά ενέργειας. Κάθε μόριο κατέχει μια σειρά ενεργειακών σταθμών και μπορεί να μεταβεί από μια χαμηλότερη σε μια υψηλότερη στάθμη με την απορρόφηση ενός φωτονίου, ενέργειας ίσης με τη διαφορά των δύο ενεργειακών επιπέδων. Σε κάθε ηλεκτρονιακή στάθμη αντιστοιχεί και ένα πλήθος δονητικών επιπέδων του μορίου. Η βασική στάθμη συμβολίζεται με G , η πρώτη διεγερμένη μονήρης ηλεκτρονιακή στάθμη με S^* , και η πρώτη διεγερμένη τριπλή κατάσταση με T^* , όπου $*$ ο αριθμός της στάθμης.

Η διαφορά μεταξύ μονήρους και τριπλής διεγερμένης κατάστασης σχετίζεται με το συνολικό σπιν των ηλεκτρονίων της στάθμης. Σε ένα πολυατομικό μόριο, η βασική κατάσταση καταλαμβάνεται από άρτιο πλήθος ηλεκτρονίων που συνδυάζονται σε ζεύγη με αντιπαράλληλα σπιν. Η πολλαπλότητα (M) μιας στάθμης, που εκφράζει την τροχιακή στροφορμή, σχετίζεται με το συνολικό σπιν της στάθμης (S) μέσω της σχέσης $M = 2S + 1$. Έτσι στην περίπτωση ζεύγων ηλεκτρονίων με αντιπαράλληλα σπιν, το συνολικό σπιν είναι ίσο με μηδέν ($S = 0$) και η πολλαπλότητα ισούται με τη μονάδα ($M = 1$). Μια τέτοια κατάσταση ονομάζεται μονήρης ηλεκτρονιακή στάθμη (singlet). Όταν το σπιν ενός ηλεκτρονίου αντιστραφεί, τότε στην κατάσταση αυτή υπάρχουν δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλα σπιν και ολικό σπιν $\Sigma = 1$ και πολλαπλότητα στάθμης $M = 3$. Μια τέτοια ηλεκτρονιακή στάθμη καλείται τριπλή (triplet).

Η απορρόφηση ενός κβάντου φωτός συμβαίνει σε χρονικό διάστημα της τάξης των 10^{-15} s και ακολουθείται από μετάβαση σε ανώτερη διεγερμένη ηλεκτρονιακή στάθμη. Αυτή είναι η πρώτη ή η δεύτερη διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση, ανάλογα με το αν το μόριο απορροφά φωτόνιο ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας. Το ηλεκτρόνιο μεταβαίνει από τη βασική σε μονήρη διεγερμένη στάθμη και οι μεταβάσεις αυτές ευθύνονται για τα φάσματα απορρόφησης των μορίων στο ορατό (380 - 700 nm) και το υπεριώδες (100 - 400 nm).

1.3.3 Ενεργειακές Μεταβάσεις

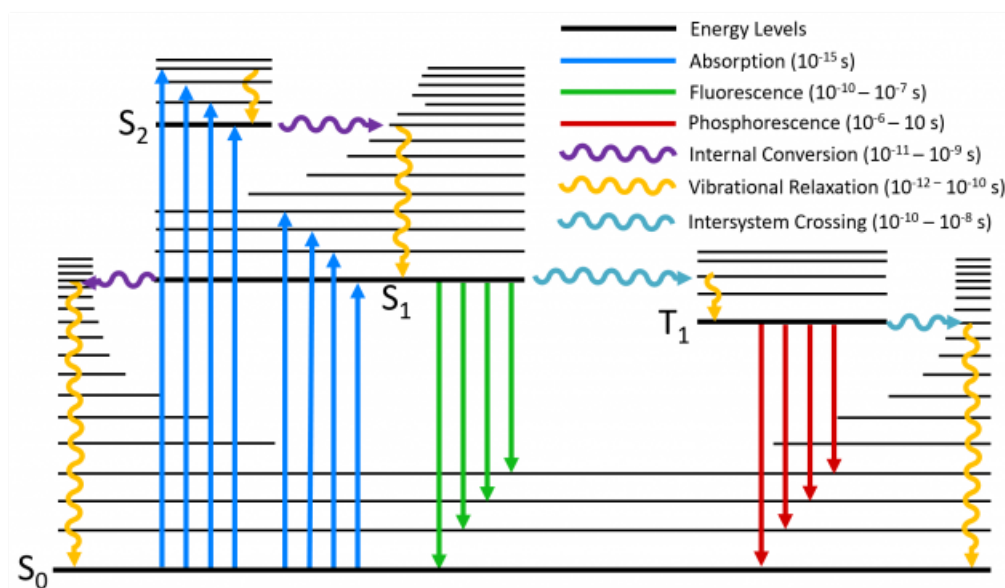
Κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η πλεονάζουσα ενέργεια σε σχέση με την ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της στάθμης διοχετεύεται μέσω συγκρούσεων σε άλλα μόρια. Με αυτή τη διαδικασία, το μόριο καταλαμβάνει το χαμηλότερο

δονητικό επίπεδο της διεγερμένης μονήρους στάθμης. Το ηλεκτρόνιο θα επιστρέψει στη βασική κατάσταση με έναν από τους ακόλουθους μηχανισμούς:

- **Εσωτερική Μετατροπή:** το μόριο μπορεί από τη διεγερμένη κατάσταση, να μεταπηδήσει σε ένα κοντινό, δονητικό επίπεδο της βασικής ενεργειακής κατάστασης. Η ενέργεια χάνεται χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας μέσω δονητικής αποδιέγερσης.
- **Εσωτερική Μετάπτωση $S^* \rightarrow T^*$:** το διεγερμένο ηλεκτρόνιο μπορεί να μεταβεί από τη μονήρη στην πρώτη διεγερμένη τριπλή στάθμη. Η μετάπτωση αυτή είναι επιτρεπτή διότι η ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της T^* είναι μικρότερη από αυτή της S^* . Η ανάποδη μετάβαση είναι πρακτικά απίθανη. Ύστερα, το μόριο μπορεί να επανέλθει στη βασική κατάσταση. Η άμεση επιστροφή στην G μπορεί να πραγματοποιηθεί με ή χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, που στην πρώτη περίπτωση αναφερόμαστε στο φαινόμενο του φωσφορισμού.
- **Μεταφορά μέσω ενέργειας κρούσεων- απόσβεση φθορισμού:** αν το διεγερμένο μόριο συγκρουστεί με άλλο μόριο, που βρίσκεται σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο, τότε η ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί σε αυτό το μόριο χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας.
- **Μεταφοράς ενέργειας μέσω συντονισμού:** η ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί σε άλλο μόριο χωρίς επαφή μέσω μιας σύζευξης διπόλου-διπόλου ανάμεσα στα μόρια. Για αποστάσεις έως και 5 nm, επιτυγχάνεται ικανοποιητική μεταφορά ενέργειας. Πρόκειται για παραλλαγή της απόσβεσης φθορισμού.
- **Φωτοχημική Αντίδραση:** η ενέργεια μπορεί να επάγει μια χημική αντίδραση, δηλαδή τη δημιουργία ενός νέου είδους μορίου. Η ενέργεια καταναλώνεται κατά τη δημιουργία αυτών των ενώσεων, που έχουν διαφορετικές ιδιότητες φθορισμού από τις αρχικές.
- **Εκπομπή φθορισμού:** το μόριο μπορεί να μεταβεί σε ένα διεγερμένο δονητικό επίπεδο στη βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση, με εκπομπή ενός φωτονίου. Η διάρκεια ζωής του φθορισμού είναι της τάξης των nsec. Στη συνέχεια, το μόριο επιστρέφει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης. Ο φθορισμός (η εκπεμπόμενη ενέργεια) είναι μεγαλύτερου μήκους κύματος σε σχέση με την απορροφηθείσα ενέργεια. Σχετικά με τον φθορισμό, ο κανόνας Kasha δηλώνει ότι θα προέρχεται πάντα από το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης μονήρους στάθμης, του S_1 , ενώ ο φωσφορισμός θα προέρχεται από το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης τριπλής στάθμης, του T_1 , ανεξάρτητα από την αρχική διεγερμένη κατάσταση του μορίου.

1.3.4 Διάγραμμα Jablonski

Το Διάγραμμα Jablonski είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την απεικόνιση των πιθανών μεταβάσεων που μπορούν να συμβούν μετά τη φωτοδιέγερση ενός μορίου (Διάγραμμα [38]).



Σχήμα 1.1: Διάγραμμα ηλεκτρονικών καταστάσεων Jablonski

Φάσμα διέγερσης

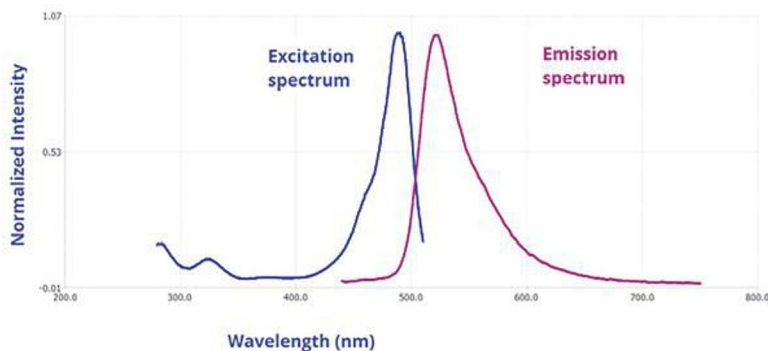
Το φάσμα διέγερσης εκφράζει τη σχετική απόδοση των διαφόρων μηκών κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας στην επαγωγή φθορισμού. Το φάσμα διέγερσης, που λαμβάνεται με ένα φασματοφωτόμετρο φθορισμού, πρέπει να συμπίπτει με το φάσμα απορρόφησης του μορίου, που λαμβάνεται με ένα φασματοφωτόμετρο. Αυτό συμβαίνει σπάνια και οι διαφορές οφείλονται σε κατασκευαστικούς λόγους. Τέτοιοι είναι α) οι αλλαγές στην απόκριση τον φωτοπολλαπλασιαστή, β) αλλαγές στο εύρος ζώνης των μονοχρωμάτορα ή στην φωτεινή πηγή και γ) σταθερότητα των σχισμών του μετρητή φθορισμού. Για να ληφθεί το διορθωμένο φάσμα του συστατικού, που ενδιαφέρει η καμπύλη πρέπει να διορθώνεται με βάση αυτούς τους παράγοντες. Εξέταση του φάσματος διέγερσης κάθε μορίου, δείχνει τις θέσεις του φάσματος απορρόφησης, οι οποίες μπορούν να επάγουν εκπομπή φθορισμού. Γενικά το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης στο φάσμα διέγερσης είναι αυτά, που επιλέγεται για την διέγερση του δείγματος. Όταν ένα μόριο μεταπίπτει από τη διεγερμένη κατάσταση στη βασική, εκπέμπεται φως σε χαρακτηριστικό μήκος κύματος. Η ενέργεια των εκπεμπόμενων φωτονίων ισούται με τη διαφορά της ενέργειας ανάμεσα στις δύο ενεργειακές καταστάσεις και η διαφορά αυτή καθορίζει το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας (λ_e).

Φάσμα εκπομπής

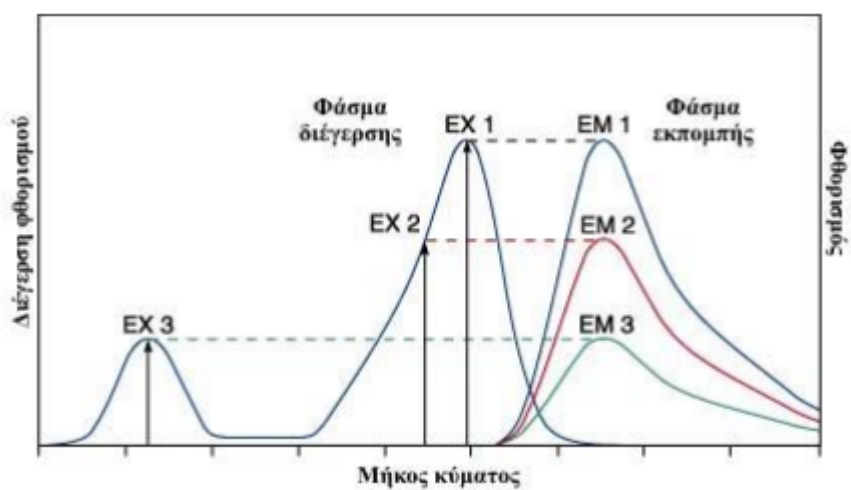
Το φάσμα εκπομπής εκφράζει την κατανομή της έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας στα διάφορα μήκη κύματος, που επάγεται για ένα μήκος κύματος διέγερσης. Το φάσμα εκπομπής οφείλεται στην επανεκπομπή της ακτινοβολίας που απορροφήθηκε από το μόριο. Το φάσμα φθορισμού, εκφράζει τις διαφορετικές πιθανές μεταβάσεις από τη μονήρη διεγερμένη κατάσταση στα διάφορα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η σχετική πιθανότητα να συμβεί κάποια από τις πιθανές διαδρομές διαφέρει από μόριο σε μόριο και εξαρτάται όχι μόνο από τη δομή του, αλλά και από το τοπικό του περιβάλλον.

Το φάσμα του φθορισμού της $S_1 \rightarrow S_0$ εκπομπής είναι περίπου κατοπτρικό του φάσματος απορρόφησης της μετάβασης $S_1 \leftarrow S_0$, και εκτείνεται σε χαμηλότερες ενέργειες (**Εικόνα 1.13 [39]**). Το σχήμα των φάσματος εκπομπής είναι ανεξάρτητο από το μήκος διέγερσης, εξαιτίας της εσωτερικής μετατροπής και κατά τον κανόνα Kasha. Πράγματι οι υψηλότερα υπάρχουσες μονήρεις διεγερμένες στάθμες μεταπίπτουν στην S_1 πάρα πολύ γρήγορα μέσω της εσωτερικής μετατροπής η οποία για τις στάθμες αυτές είναι σαφώς ταχύτερη από τον φθορισμό. Έτσι φθορισμό έχουμε από την S_1 στην S_0 όπου ο ρυθμός εσωτερικής μετατροπής είναι μικρότερος και συγκρίσιμος με αυτόν τον φθορισμό.

Η ένταση του φθορισμού αντίθετα εξαρτάται από το μήκος κύματος της διέγερσης. Αν για παράδειγμα το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης είναι διαφορετικό από αυτό που αντιστοιχεί στο μέγιστο απορρόφησης, λιγότερη ενέργεια θα απορροφηθεί από το μόριο και επομένως λιγότερη ενέργεια θα εκπεμφθεί. Συνεπώς όλα τα μήκη κύματος των φάσματος απορρόφησης μπορούν να διεγείρουν το μόριο και να επάγουν φθορισμό. Η κορυφή του φθορισμού θα είναι πάντα στο ίδιο μήκος κύματος αλλά η ένταση του θα διαφέρει ανάλογα με την ένταση της απορρόφησης (**Εικόνα 1.14**).



Εικόνα 1.17: Τα φάσματα εκπομπής και διέγερσης για ένα δεδομένο φθοροφόρο (μόριο που φθορίζει) είναι κατοπτρικές εικόνες το ένα του άλλου



Εικόνα 1.18: Η διέγερση του χρωμοφόρου με τρία διαφορετικά μήκη κύματος (EX 1, EX 2, EX 3) δεν μεταβάλλει το σχήμα του φάσματος εκπομπής αλλά προκαλεί διακυμάνσεις στην ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού (EM 1, EM 2, EM 3) το οποίο αντιστοιχεί στο μέγεθος του φάσματος διέγερσης

Πειραματική Μελέτη

2.1 Σκοπός της πειραματικής μελέτης

Παρά τη σημαντική πρόοδο στην ανάπτυξη των ηλεκτροχημικών αισθητήρων, οι εντελώς μη επεμβατικές μέθοδοι παρακολούθησης της γλυκόζης εξακολουθούν να παρουσιάζουν μεγάλη ζήτηση, λόγω της δυνατότητάς και της προοπτικής τους να είναι αξιόπιστες, ευαίσθητες, φιλικές προς το χρήστη και προσαρμοσμένες σε θεραπευτικά σχήματα. Στον τομέα της μη επεμβατικής παρακολούθησης της γλυκόζης στο αίμα, οι οπτικές μέθοδοι έχουν τη μεγαλύτερη ερευνητική αξία και δυναμικότητα, επειδή οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούν το φως για να λάβουν πληροφορίες σχετικά με την γλυκόζη στο αίμα, ώστε να καταστεί δυνατή η μέτρηση και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής της σε αυτό. Ως εκ τούτου, η μη επεμβατική μέθοδος παρακολούθησης της γλυκόζης αίματος έχει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως η μη επεμβατικότητα, το χαμηλό κόστος, η εύκολη λειτουργία και η ισχυρή απόδοση σε πραγματικό χρόνο, η οποία έχει επίσης προσελκύσει εκτεταμένη προσοχή και έρευνα.

Στα πλαίσια της έρευνας γύρω από τη μη επεμβατική παρακολούθηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης, από τις οπτικές μεθόδους που περιγράφονται στο θεωρητικό υπόβαθρο, η διπλωματική εργασία επικεντρώθηκε στη φασματοσκοπία φθορισμού.

Οι λόγοι που οδήγησαν στην επιλογή του φθορισμού είναι ότι παρουσιάζει πέντε βασικά χαρακτηριστικά ως εργαλείο τόσο στη φασματοσκοπία όσο και τη μικροσκοπία και είναι τα παρακάτω:

- **Επιλεκτικότητα (specificity).** Τα φθορίζοντα μόρια απορροφούν και εκπέμπουν φως σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος. Συνεπώς, οι φθορίζοντες ιχνηθέτες μπορούν επιλεκτικά να διεγερθούν και να ανιχνευθούν ανάμεσα σε ένα μείγμα διαφόρων μορίων.
- **Ευαισθησία (sensitivity).** Μπορεί να ανιχνευθεί ένας μικρός αριθμός φθορίζοντων μορίων. Περίπου 50 μόρια μπορούν να ανιχνευθούν σε όγκο ενός κυβικού μικρομέτρου ενός κυττάρου με τη μικροσκοπία φθορισμού. Ο αριθμός αυτός συνέχεια μειώνεται με τις εξελίξεις στη χημεία των ιχνηθετών, στις πειραματικές μεθόδους και στους φωτοανιχνευτές.
- **Φασματοσκοπία (spectroscopy).** Τα φθορίζοντα μόρια μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να είναι ιδιαίτερος ευαίσθητα σε απότομες αλλαγές τον φυσικοχημικού τους περιβάλλοντος όπως το pH, το ελεύθερο ασβέστιο, το δυναμικό της μεμβράνης, η υδροφοδικότητα,

η κατανομή των φορτίων, οι μοριακές αποστάσεις και οι συντελεστές διάχυσης.

- **Χρονική διακριτική ικανότητα (temporal resolution).** Οι μετρήσεις του φθορισμού περιορίζονται ως προς τη χρονική διακριτική τους ικανότητα από εκείνα τα γεγονότα τα οποία συμβαίνουν με συχνότητα ίση ή μεγαλύτερη από το αντίστροφο του χρόνου που μεσολαβεί ανάμεσα στην απορρόφηση και στην εκπομπή του φωτός.
- **Χωρική διακριτική ικανότητα (spatial resolution).** Τα σήματα φθορισμού μπορούν να καταγραφούν από κυτταρικές δομές τόσο μικρές όσο ένα μόριο, εάν τα μόρια αυτά περιέχουν ικανοποιητικό αριθμό χρωμοφώρων. Η διακριτική ικανότητα των δομών περιορίζεται επιπλέον από τα οπτικά του μικροσκοπίου και πιο συγκεκριμένα από το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού και το μήκος κύματος της εκπομπής. Ωστόσο, αν και υπάρχουν αυτοί οι περιορισμοί στη διακριτική ικανότητα, μπορούν να υπολογιστούν ακόμα και αποστάσεις μεταξύ μορίων, με τη μέθοδο συντονισμού μεταφοράς ενέργειας (resonance energy transfer).

Συγκεκριμένα, σκοπός της διπλωματικής εργασίας αυτής ήταν να μελετηθεί και να συσχετιστεί η ένταση του φθορισμού που παρουσίαζαν διάφορα διαλύματα που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν με την εκάστοτε συγκέντρωσή της γλυκόζης που υπήρχε διαλυμένη σε αυτά.

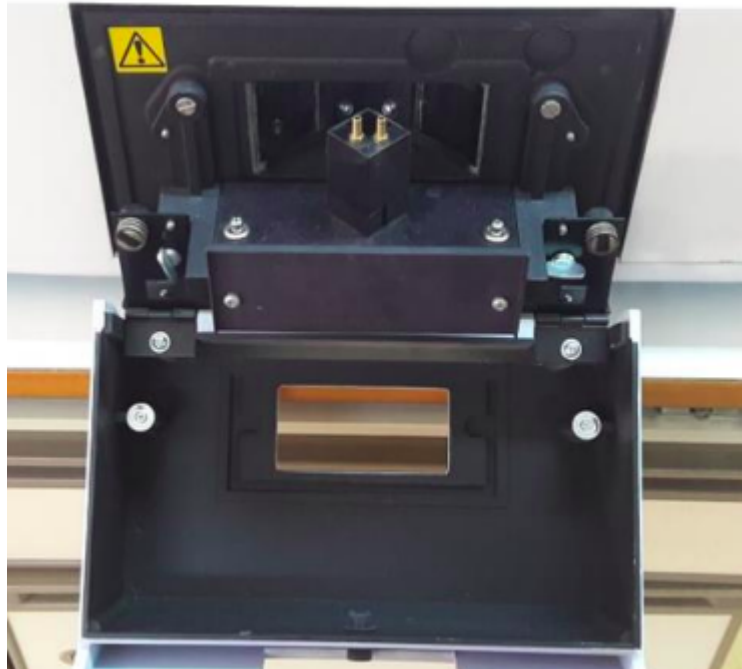
2.2 Πειραματικός Εξοπλισμός

2.2.1 Φασματοσκοπική διάταξη φθορισμού

Τα φάσματα φθορισμού που χρειάστηκαν λήφθηκαν με το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer, το οποίο πέρα από φθορισμό, μπορεί να ανιχνεύσει φωσφορισμό, βιοφωταύγεια ή χημειοφωταύγεια. Η μέτρηση φασμάτων φθορισμού μπορεί να προκύψει: I) με συνεχή σάρωση σε όλο το δυναμικό εύρος μηκών κύματος του οργάνου, II) σε κάποιο επιλεγμένο τμήμα του και III) σε επιλεγμένα μεμονωμένα μήκη κύματος.

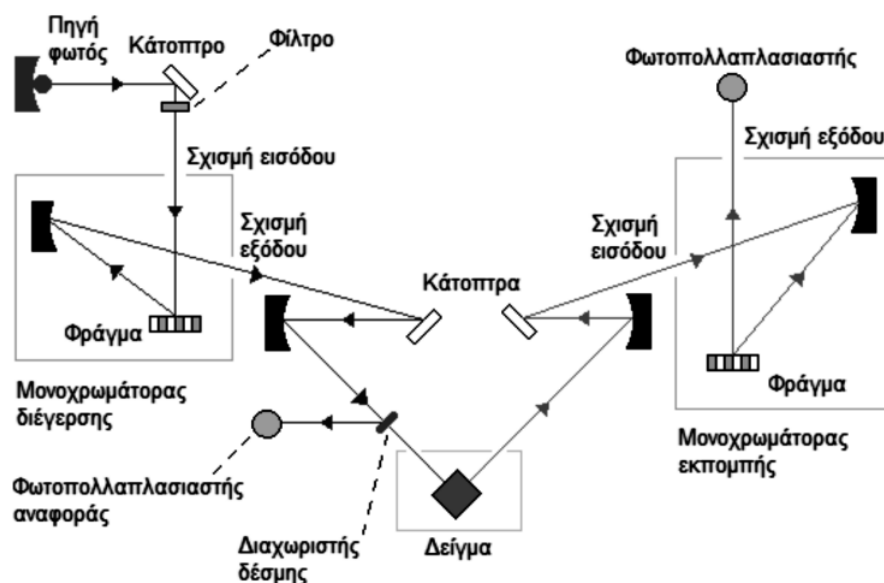


Εικόνα 2.1: Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer



Εικόνα 2.2: Υποδοχή κυβέτας

Στη συνέχεια, απεικονίζεται το οπτικό διάγραμμα για τη συλλογή των σημάτων φθορισμού.



Εικόνα 2.3: Οπτικό διάγραμμα του φασματοφωτόμετρου φθορισμού

Η πηγή φωτός είναι μια λυχνία ξένου (Xenon flash tube), η οποία παράγει ένα ισχυρό παλμό μικρής χρονικής διάρκειας και μεγάλης έντασης. Η ακτινοβολία από τη λυχνία ξένου, με τη βοήθεια κατόπτρων προσανατολίζεται προς τη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα διέγερσης, ο οποίος περιλαμβάνει φράγμα 1440 lines/mm και σφαιρικό κάτοπτρο για τη σωστή κάλυψη του φράγματος από τη φωτεινή δέσμη. Από τη σχισμή εξόδου εξέρχεται το μονοχρωματικό φως, σε συγκεκριμένη στενή φασματική περιοχή, με κεντρικό μήκος κύματος που καθορίζεται από τη γωνιακή θέση σάρωσης του φράγματος περίθλασης, το οποίο ελέγχει ο βηματικός κινητήρας. Η μονοχρωματική δέσμη διέγερσης προσπίπτει με τη βοήθεια κατόπτρων στο δείγμα, για το οποίο υπάρχει κατάλληλος υποδοχέας υπό γωνία 45° . Επίσης με ένα διαχωριστή δέσμης (beam splitter), ένα μικρό μέρος από τη δέσμη διέγερσης εστιάζεται σε φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς. Για τη διόρθωση της φασματικής απόκρισης τον φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς είναι αποθηκευμένη στο όργανο, καμπύλη αναφοράς ροδαμίνης B.

Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα, σε γωνία 90° ως προς τη δέσμη διέγερσης, εστιάζεται από κάτοπτρα στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής, ο οποίος περιλαμβάνει οπτικό φράγμα περίθλασης 1200 lines/mm και σφαιρικό κάτοπτρο. Το εύρος της σχισμής αποτελεί σημαντική παράμετρο που καθορίζει τη διακριτική ικανότητα της διάταξης. Βελτίωση της διακριτικής ικανότητας επιτυγχάνεται με την ελάττωση του εύρους της σχισμής, παρουσιάζοντας όμως το μειονέκτημα μείωσης του φωτός που είτε διεγείρει το δείγμα είτε συλλέγεται για καταγραφή (υποδιπλασιασμός του εύρους της σχισμής συνεπάγεται μείωση κατά τέσσερις φορές του διερχόμενου φωτός). Η στενή φασματική περιοχή που εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής, η κίνηση του φράγματος του οποίου επίσης ελέγχεται από βηματικό κινητήρα, τελικά αναλύεται από φωτοπολλαπλασιαστή. Οι μονοχρωμάτορες μπορούν να σαρώσουν ανεξάρτητα είτε συνδυαστικά και για εύρος πεδίου, το οποίο κυμαίνεται για το μονοχρωμάτορα διέγερσης από 200 έως 800 nm και για το μο-

νοχρωμάτορα εκπομπής από 200 έως 900 nm. Επίσης υπάρχει η δυνατότητα σύγχρονης σάρωσης, με σταθερή διαφορά μήκους κύματος διέγερσης και εκπομπής.

Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται φωτοπολλαπλασιαστές λόγω της ευαισθησίας και της γρήγορης απόκρισής τους, οι οποίοι ενισχύουν και έπειτα ψηφιοποιούν τα σήματα που λαμβάνουν.

Ο έλεγχος του φασματοφωτόμετρου φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer γίνεται μέσω υπολογιστή με τη χρήση του λογισμικού πακέτου FL WinLab. Με το συγκεκριμένο λογισμικό, ρυθμίζονται διάφοροι παράμετροι και εκτελούνται εργασίες όπως:

- Επιλογή του μήκους κύματος διέγερσης της ουσίας.
- Μηδενισμός του σήματος που μπορεί να οφείλεται είτε στο διαλύτη είτε στο θόρυβο του οργάνου.
- Επεξεργασία των φασμάτων που προκύπτουν έπειτα από τη διεξαγωγή των μετρήσεων.

2.3 Ουσίες και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

1. Γλυκόζη σε μορφή σκόνης
2. Φυσιολογικός Ορός
3. DMEM solution - low glucose
4. DMEM solution - high glucose

2.3.1 Διάλυμα DMEM

Το Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) είναι ένα τροποποιημένο μέσο που παρασκευάζεται εμπορικά και προορίζεται για τη συντήρηση της ανάπτυξης ενός ευρέος φάσματος τύπων θηλαστικών κυττάρων. Στο DMEM, η συγκέντρωση της βιταμινών αυξάνεται έως και τέσσερις φορές, αυξάνοντας έτσι την περιεκτικότητα του μέσου σε θρεπτικά συστατικά.

Το DMEM τροποποιείται επίσης με την προσθήκη περισσότερων αλάτων όπως ο νιτρικός σίδηρος, το πυροσταφυλικό νάτριο και ορισμένα μη απαραίτητα αμινοξέα όπως η σερίνη και η γλυκίνη. Η σύνθεση της γλυκόζης στα μέσα αλλάζει επίσης. Η αρχική σύνθεση αποτελείται από 100 mg/dl γλυκόζης, ενώ στο DMEM, η συγκέντρωση αυξάνεται έως και 450 mg/dL. Το DMEM απαιτεί επίσης συμπλήρωμα με ορό, καθώς δεν είναι πλήρες μέσο. Τις περισσότερες φορές, το DMEM συμπληρώνεται με ορό εμβρύου βοοειδών (FBS). Το FBS παρέχει τις απαιτούμενες πρωτεΐνες και αυξητικούς παράγοντες για τη διαδικασία καλλιέργειας.

Το pH του μέσου ποικίλλει κατά την προσθήκη διττανθρακικού νατρίου. Το pH του μέσου πριν από την προσθήκη διττανθρακικού νατρίου είναι περίπου 6.80 – 7.40, ενώ το pH μετά την προσθήκη διττανθρακικού νατρίου κυμαίνεται από 7.60 – 8.20. Η θερμοκρασία αποθήκευσης του μέσου είναι 2 – 8 °C.

2.4 Στάδια Πειραματικής Διαδικασίας

Για τη διεξαγωγή των μετρήσεων γίνεται χρήση του φασματοφωτόμετρου φθορισμού Perkin Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer.

2.4.1 Παρασκευή πειραματικών διαλυμάτων

Ποσότητα 43,3 mg γλυκόζης σε μορφή σκόνης διαλύθηκαν σε 1 ml φυσιολογικού ορού. Η ίδια ποσότητα προστέθηκε κατόπιν και σε 1 ml διαλύματος DMEM με χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη και συγκεκριμένα 0,03 mg/ml, η οποία μπορεί να θεωρηθεί και αμελητέα εν τέλει. Πριν ξεκινήσουν οι μετρήσεις γίνεται μηδενισμός του σήματος για αποφυγή σφαλμάτων που οφείλονται σε θόρυβο, αλλά και πιθανού φθορισμού του διαλύτη. Έπειτα, το σήμα που καταγράφεται αφαιρείται κάθε φορά από το εκάστοτε φάσμα φθορισμού που λαμβάνεται. Συνεπώς, κυβέτα με 3 ml φυσιολογικό ορό στην μία περίπτωση και διάλυμα DMEM εισάγεται στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού.

Τα διαλύματα που χρειάζονται παρασκευάζονται ως εξής:

Από το αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης: $C_{initial} = 43,3 \text{ mg/ml}$, θέλουμε να φτιάξουμε 3 ml ενδιάμεσου διαλύματος γιατί αυτή είναι η χωρητικότητα της κυβέτας που εισάγεται στο φασματοφωτόμετρο. Η συγκέντρωση του ενδιάμεσου αυτού διαλύματος σε γλυκόζη αρχίζει από 60 mg/dl και με βήμα 20 mg/dl τελειώνει στην τιμή 200 mg/dl. Επομένως, οι τιμές περιεκτικότητας σε mg/ml που εξετάζονται είναι:

[60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200].

Για την επίτευξη αυτών των συγκεντρώσεων από το αρχικό διάλυμα, εφαρμόζουμε το νόμο Αραίωσης Διαλυμάτων

$$C_{initial} * V_{initial} = C_{final} * V_{final}$$

προκειμένου να υπολογίζεται κάθε φορά ο απαιτούμενος όγκος που πρέπει να ληφθεί από το αρχικό διάλυμα, ώστε να προκύπτει τελικά 3 ml διαλύματος της εκάστοτε υπό μελέτη συγκέντρωσης.

2.4.2 Αρχική Προσέγγιση

Αρχικά, με σκοπό να είναι αυξημένες οι πιθανότητες παρατήρησης του φθορισμού, επιλέξαμε την παρασκευή διαλύματος με περιεκτικότητα 200 mg/dl σε γλυκόζη, τιμή που παραπέμπει απευθείας σε ένδειξη υπεργλυκαιμικού επεισοδίου. Πραγματοποιήθηκε έτσι δοκιμή μέτρησης του φθορισμού της γλυκόζης τόσο σε διάλυμα φυσιολογικού ορού όσο και σε διάλυμα DMEM. Οι τιμές διέγερσης ήταν 360, 410 και 485 nm και επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες έπειτα από βιβλιογραφική αναζήτηση [40]. Ωστόσο, σε καμία από τις παραπάνω τιμές, δεν ανιχνεύθηκε κάποιο σήμα, παρά μόνο θόρυβος.

Ο λόγος αποδείχθηκε εκ των υστέρων, όπως θα επισημανθεί στη συνέχεια, και ήταν ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης που προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε ήταν εκτός του δυναμικού εύρους του φασματοφωτόμετρου.

2.4.3 Ακόλουθη Προσέγγιση

Το επόμενο βήμα ήταν η επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας, επιλέγοντας αυτή τη φορά διάλυμα DMEM με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη και συγκεκριμένα 450 mg/dl. Αυτή τη φορά, η μέτρηση απέβη επιτυχής, διότι το φασματοφωτόμετρο μέτρησε τη συγκεκριμένη συγκέντρωση και είχαμε απόκριση φθορισμού κατ'επέκταση. Οι τιμές διέγερσης παρέμεναν οι ίδιες (360, 410 και 485 nm). Έτσι, στη συνέχεια, προσθέταμε σε αυτό το διάλυμα DMEM , διάλυμα γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό, έτσι ώστε να πετύχουμε τις συγκεντρώσεις που θέλαμε από 60 mg/dl σε 200 mg/dl με βήμα 20, οι οποίες άρα είναι 8(οκτώ) στο σύνολο .Τελικά, συλλέξαμε τα φάσματα φθορισμού για κάθε μία τιμή διέγερσης σε 9 δείγματα (το σκέτο διάλυμα ΔMEM και ύστερα τα διαλύματα DMEM με τη διαλυμένη σε φυσιολογικό ορό γλυκόζη σε 8 διαφορετικές τιμές συγκεντρώσεων).

Η λήψη των φασμάτων φθορισμού για κάθε διάλυμα λαμβάνεται με σάρωση στις περιοχές που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα :

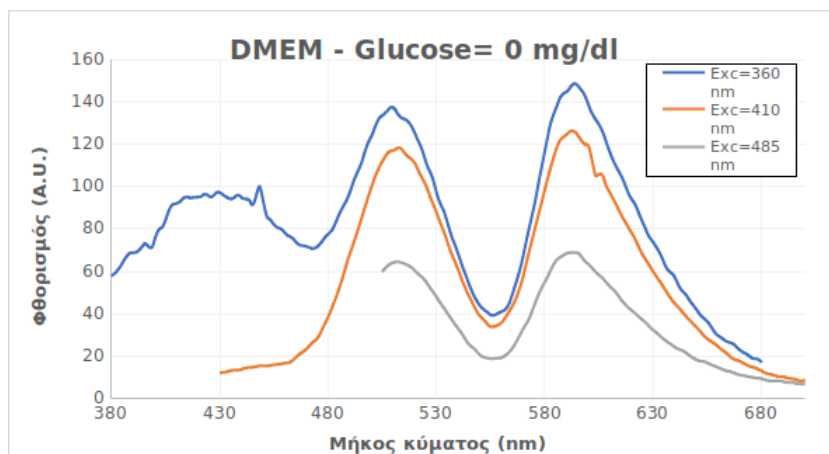
Τιμή διέγερσης(nm)	Φάσμα Σάρωσης για Συλλογή Φθορισμού(nm)
360	380-680
410	430-700
485	505-700

Πίνακας 2.1: Συνοπτικός πίνακας με διεγέρσεις και τα φάσματα ανίχνευσης φθορισμού

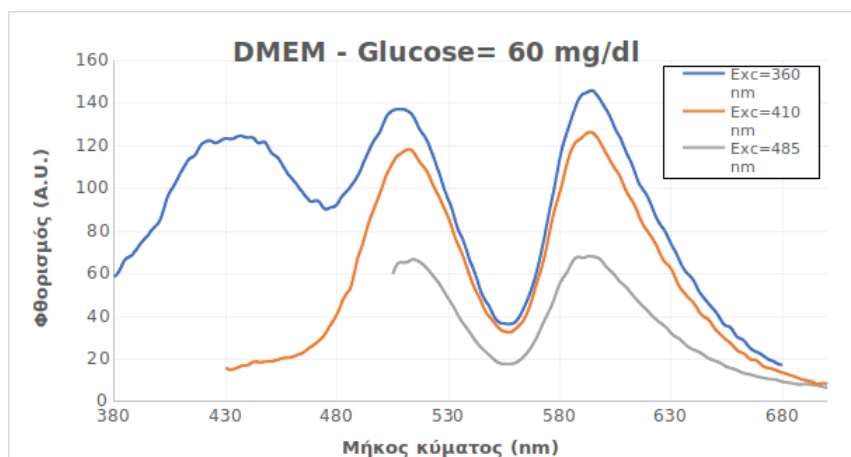
Παραθέτουμε τα φάσματα φθορισμού που προέκυψαν από τις πειραματικές μετρήσεις με το φασματοφωτόμετρο φθορισμού .Υπενθυμίζουμε ότι οι συγκεντρώσεις που εξετάζουμε πρακτικά προστίθενται στην αρχική συγκέντρωση DMEM διαλύματος σε γλυκόζη, που είναι 450 mg/dl, διότι μόνο με αυτόν τον τρόπο μπορούσε να είναι ανιχνεύσιμος ο φθορισμός. Συνεπώς στο διάγραμμα "DMEM- Glucose = 0 mg/dl", αναφερόμαστε στο σκέτο DMEM διάλυμα, χωρίς την προσθήκη δηλαδή επιπρόσθετης γλυκόζης διαλυμένη σε φυσιολογικό ορό. Στα επόμενα διαγράμματα με τιμές 60,80,...,200 mg/dl, γίνεται αναφορά στην διαλυμένη σε φυσιολογικό ορό γλυκόζη που προστέθηκε στο DMEM διάλυμα και όχι στη συνολική συγκέντρωση του DMEM διαλύματος σε γλυκόζη, μετά την προσθήκη. Δε γίνεται αραίωση, με άλλα λόγια, καθώς τότε δεν θα ήταν δυνατό να καταγραφεί σήμα φθορισμού από το όργανο.

Μήκος κύματος διέγερσης (nm)	Μήκος κύματος μέγιστου φθορισμού (nm)
360	442, 511, 592
410	511, 592
485	511, 592

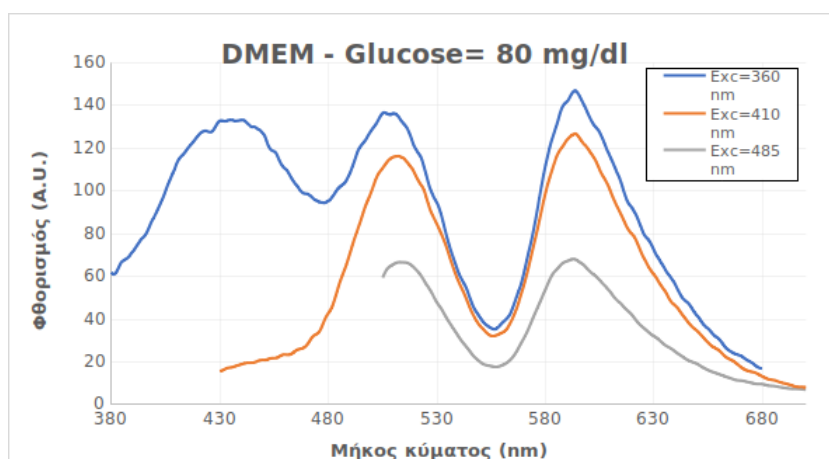
Πίνακας 2.2: Συνοπτικός πίνακας με διεγέρσεις και κορυφές φθορισμού



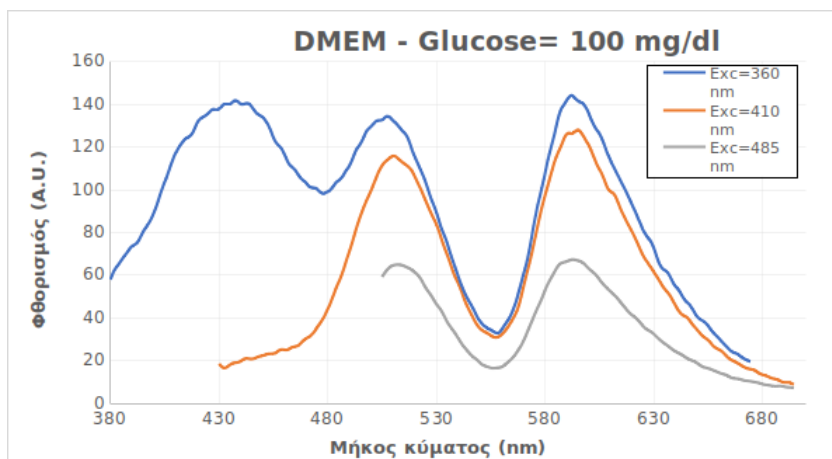
Σχήμα 2.1: Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM για κάθε μία τιμή διέγερσης



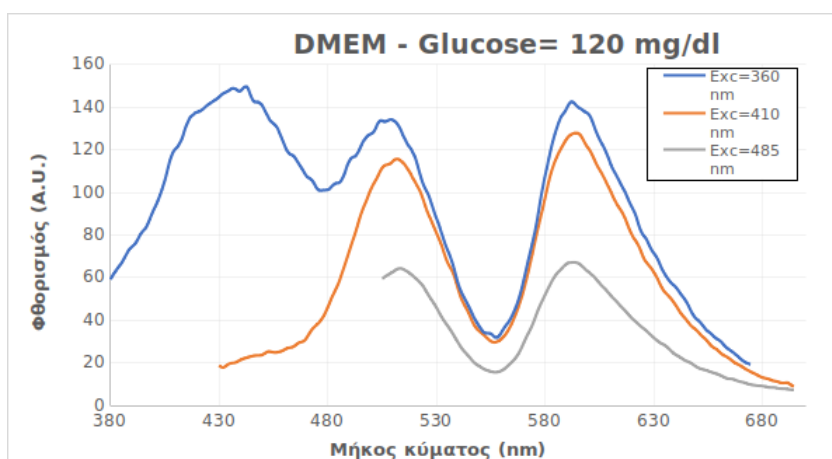
Σχήμα 2.2: Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 60 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης



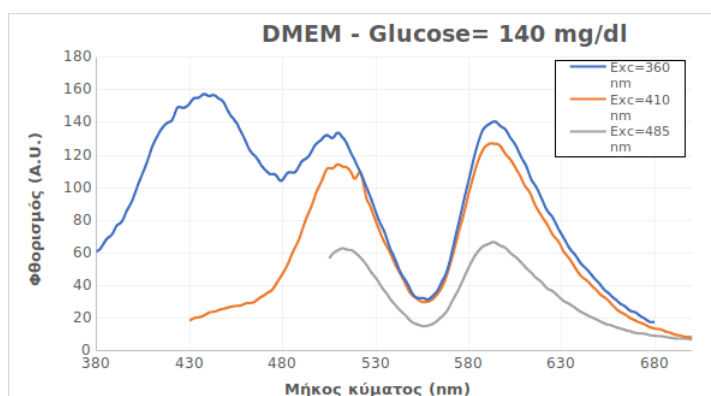
Σχήμα 2.3: Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 80 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης



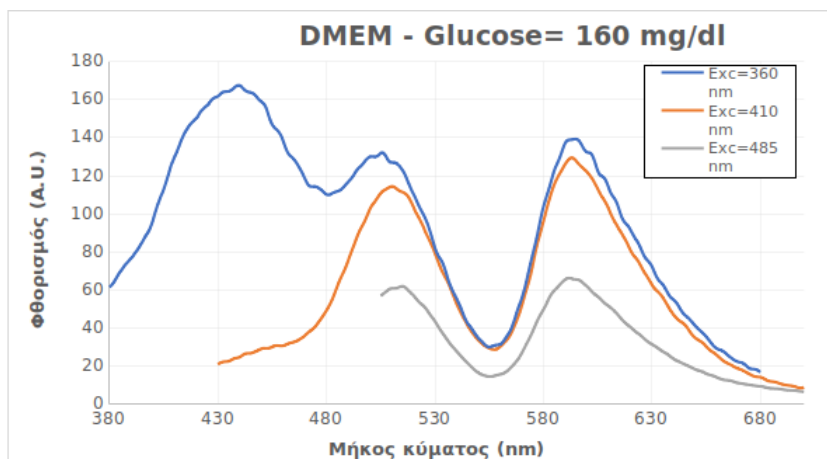
Σχήμα 2.4: Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 100 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης



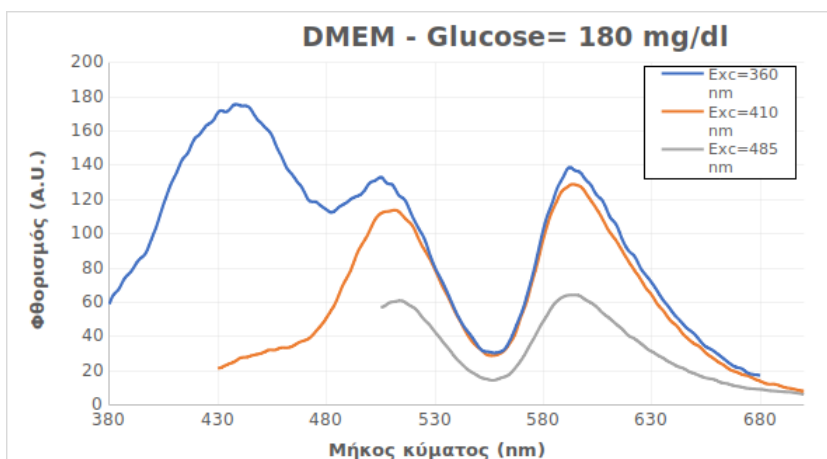
Σχήμα 2.5: Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 120 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης



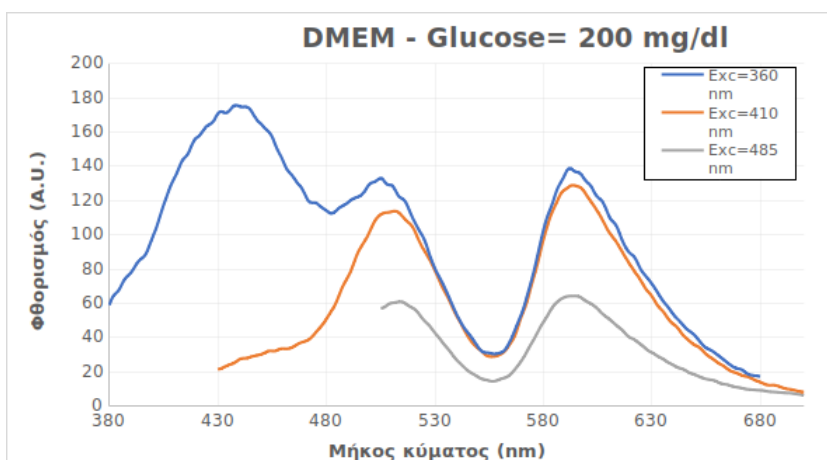
Σχήμα 2.6: Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 140 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης



Σχήμα 2.7: Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 160 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης

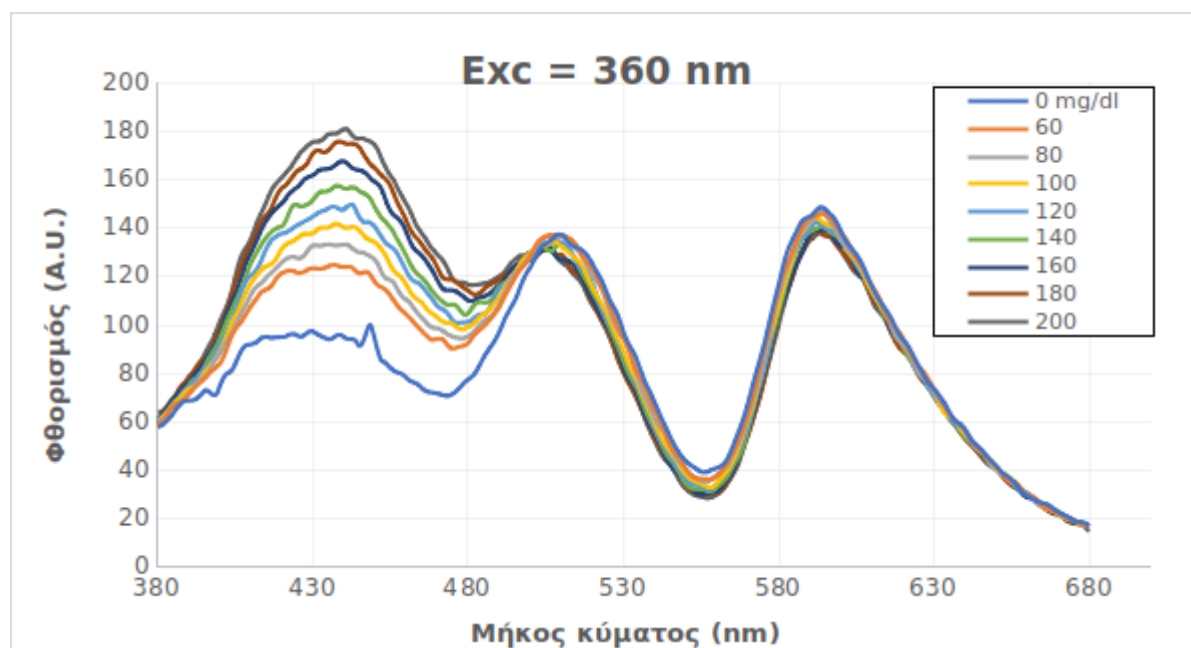


Σχήμα 2.8: Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 180 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης

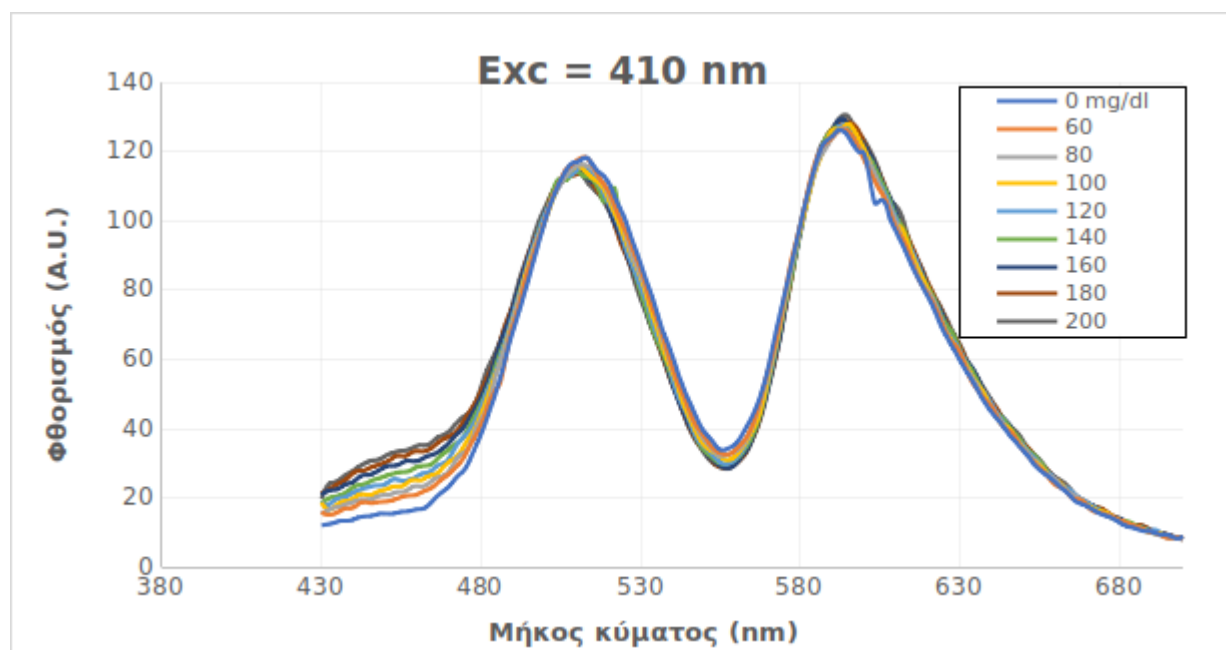


Σχήμα 2.9: Διάγραμμα με συγκεντρωμένα τα φάσματα φθορισμού γλυκόζης στο διάλυμα DMEM με την προσθήκη γλυκόζης σε φυσιολογικό ορό περιεκτικότητας 200 mg/dl για κάθε μία τιμή διέγερσης

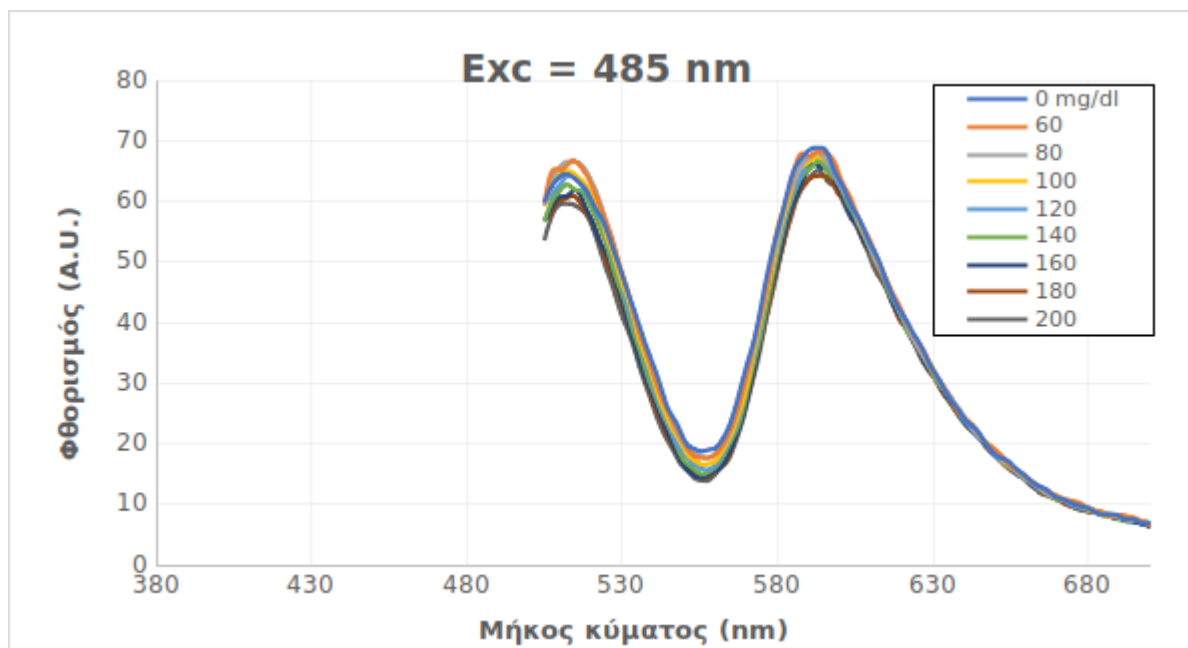
2.5 Επεξεργασία και Ανάλυση Μετρήσεων



Σχήμα 2.10: Διάγραμμα με συγκεντρωμένα όλα τα φάσματα φθορισμού για όλες τις συγκεντρώσεις γλυκόζης στο διάλυμα DMEM για την τιμή διέγερσης 360 nm



Σχήμα 2.11: Διάγραμμα με συγκεντρωμένα όλα τα φάσματα φθορισμού για όλες τις συγκεντρώσεις γλυκόζης στο διάλυμα DMEM για την τιμή διέγερσης 410 nm

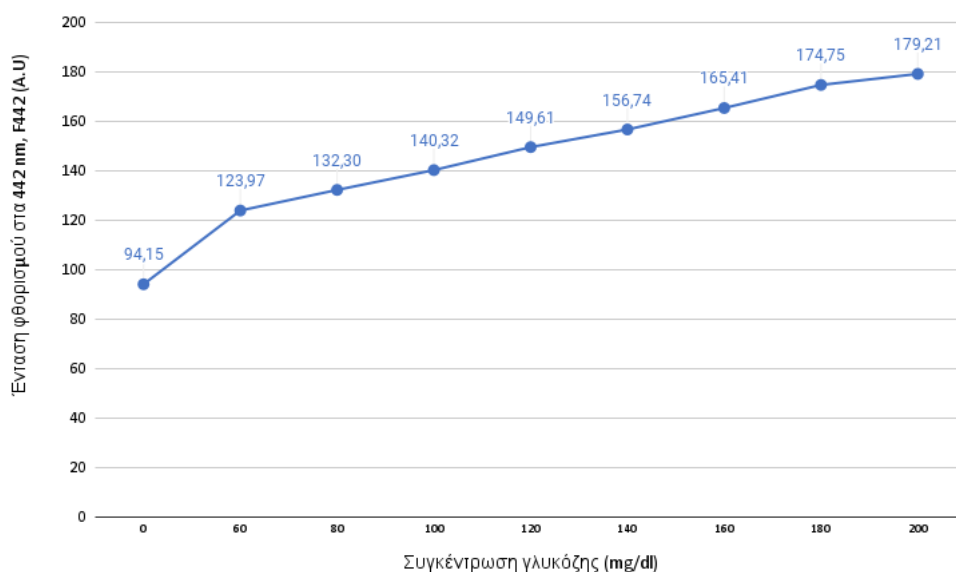


Σχήμα 2.12: Διάγραμμα με συγκεντρωμένα όλα τα φάσματα φθορισμού για όλες τις συγκεντρώσεις γλυκόζης στο διάλυμα DMEM για την τιμή διέγερσης 485 nm

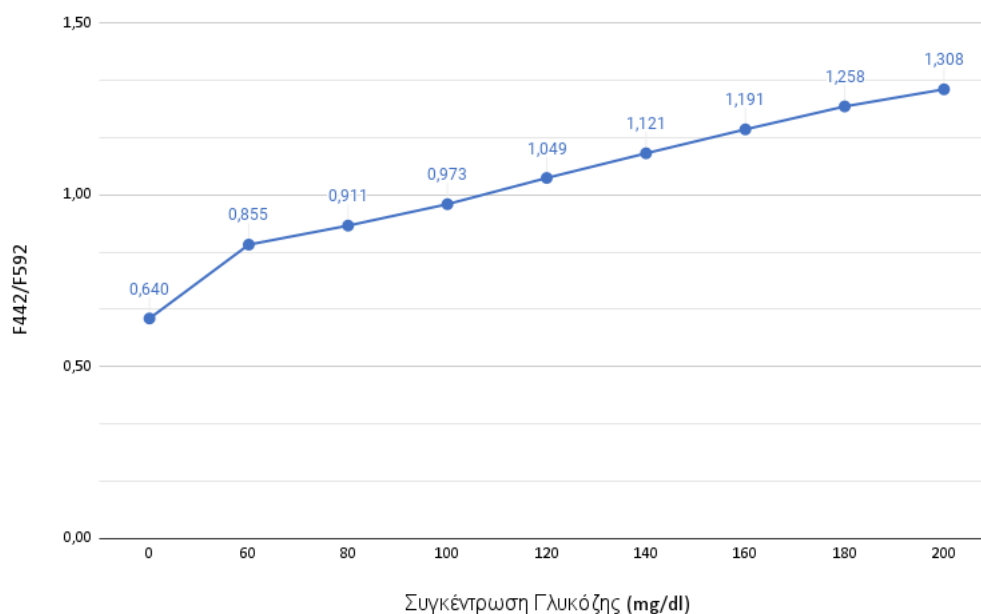
2.5.1 Συμπεράσματα και παρατηρήσεις ως προς τις διεγέρσεις

1. Από τον πίνακα, διαπιστώνουμε πως για την τιμή διέγερσης ίση με 360 nm, τα δείγματα εμφανίζουν 3 διακριτές κορυφές φθορισμού, στα 442, 511 και 592 nm. Οι κορυφές φθορισμού στα 511 και 592 nm παραμένουν σταθερές και δεν αλλάζουν με τη συγκέντρωση του δείγματος σε γλυκόζη. Επομένως, δεν παρατηρείται δόσοεξάρτηση. Αντίθετα, η κορυφή στα 442 nm αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης.
2. Από τα διαγράμματα, βλέπουμε πως για τις τιμές διέγερσης ίσες με 410 και 485 nm, τα δείγματα εμφανίζουν μέγιστη εκπομπή φθορισμού στα 511 και 592 nm. Ομοίως με την διέγερση στα 360 nm, οι κορυφές φθορισμού στα 511 και 592 nm παραμένουν σταθερές και δεν αλλάζουν με τη συγκέντρωση του δείγματος σε γλυκόζη.
3. Η μη εξάρτηση των κορυφών από τη συγκέντρωση της γλυκόζης είναι κοινό χαρακτηριστικό και στις 3 διεγέρσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Η ένταση της μέγιστης εκπομπής φθορισμού στα 442 nm, η τιμή της κορυφής δηλαδή σε αυτό το μήκος κύματος, μεταβάλλεται αναλόγως της συγκέντρωσης γλυκόζης μόνο στην πρώτη διέγερση στα 360 nm.

2.5.2 Συμπεράσματα και παρατηρήσεις ως προς τη δοσοεξάρτηση



Σχήμα 2.13: Διάγραμμα έντασης φθορισμού στα 442 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης γλυκόζης στο διάλυμα DMEM



Σχήμα 2.14: Διάγραμμα λόγου έντασης φθορισμού στα 442 nm προς την ένταση φθορισμού στα 592 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης γλυκόζης στο διάλυμα DMEM

Η διέγερση πραγματοποιήθηκε στο μήκος κύματος 360 nm, τιμή που προέκυψε μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση. Η συλλογή του φάσματος φθορισμού έγινε από τα 380-680 nm και ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός καταγράφηκε στα 442, 511 και 592 nm. Στις δύο τελευταίες κορυφές, δεν παρατηρήθηκε δοσοεξάρτηση, όπως περιγράφηκε στην προη-

γούμενη υποενοότητα.

Για την πρώτη όμως, στο Διάγραμμα 2.13 έχει σχεδιαστεί η ένταση φθορισμού στα 442 nm, που αποτελεί την πρώτη κορυφή φθορισμού για τη συγκεκριμένη διέγερση, συναρτήσει της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Στην περίπτωση αυτή στον κατακόρυφο άξονα είναι οι τιμές της έντασης. Η τιμή (ένταση) φθορισμού της γλυκόζης στα 442 nm σε σχέση με τη συγκέντρωση της περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0.427x + 96.93$ όπου y είναι το σήμα φθορισμού και x η συγκέντρωση. Όπως φαίνεται η ένταση του σήματος φθορισμού μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση της γλυκόζης.

Είναι φυσικό επακόλουθο ο ανιχνευτής της εκάστοτε φασμαφωτομετρικής διάταξης που θα χρησιμοποιηθεί να επηρεάζει τις τιμές αυτές, καθώς εφαρμόζεται άλλο κέρδος ενίσχυσης στην καθεμιά. Οπότε, τα αποτελέσματα να μην θα είναι ποιοτικά ίδια αν οι ίδιες μετρήσεις πραγματοποιηθούν σε διαφορετικό φασματοφωτόμετρο, αλλά ποσοτικά θα υπάρχει διαφοροποίηση αναλόγως της ενίσχυσης του σήματος που εφαρμόζει ο φωτοπολλαπλασιαστής του καθενός.

Προκειμένου να υπάρχει κοινή αναφορά ανεξάρτητα της χρησιμοποιούμενης διάταξης, αναπαριστούμε στο Διάγραμμα 2.14 το λόγο της έντασης φθορισμού της κορυφής στα 442 nm προς την ένταση φθορισμού της κορυφής στα 592 nm όπου δεν παρατηρείται δοσοεξάρτηση συναρτήσει της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Ο λόγος αυτός των εντάσεων θα παραμένει πάντα σταθερός ανεξάρτητα με την φασμαφωτομετρική διάταξη που θα χρησιμοποιείται. Αυτό οφείλεται στο ότι όση ενίσχυση εφαρμόζει ο φωτοπολλαπλασιαστής, που δρα ως ανιχνευτής, θα είναι ίδια και στις 2 μετρούμενες εντάσεις. Έτσι, στο λόγο αυτό, τα κέρδη απαλείφονται. Ο λόγος της έντασης φθορισμού της γλυκόζης στα 442 nm προς την ένταση φθορισμού στα 592 nm σε σχέση με τη συγκέντρωσή της περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0.003x + 0.64$ όπου y είναι το σήμα φθορισμού και x η συγκέντρωση. Όπως φαίνεται και από την γραφική παράσταση, η ένταση του σήματος φθορισμού μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση της γλυκόζης.

Κεφάλαιο **3**

Περιγραφή και σχεδιασμός προτεινόμενου βιο-αισθητήρα μέτρησης συγκέντρωσης γλυκόζης

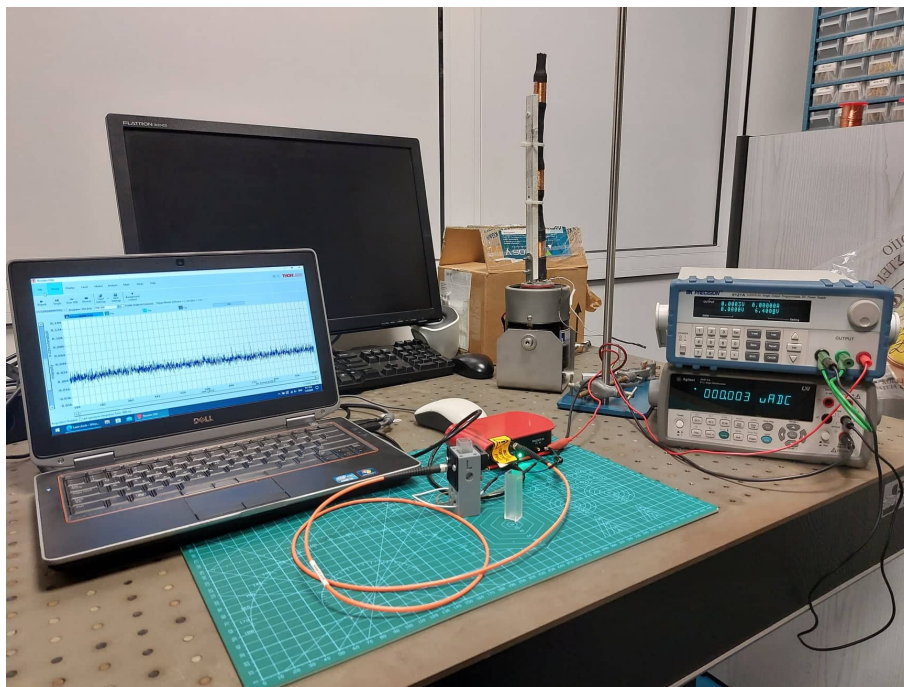
Στο κεφάλαιο αυτό, θα αξιοποιήσουμε τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων που διεξήχθησαν και παρατέθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο στην κατεύθυνση περιγραφής και σχεδιασμού μιας διάταξης βιοαισθητήρα μέτρησης συγκέντρωσης γλυκόζης σε ούρα.

3.1 Χαρακτηριστικά και σκοπός βιοαισθητήρα

Τα κύρια θεμιτά χαρακτηριστικά του θα είναι η φορητότητα, το χαμηλό κόστος, η ευκολία στη χρήση του και το σημαντικότερο, ότι θα κατατάσσεται στην κατηγορία της μη επεμβατικής παρακολούθησης της συγκέντρωσης γλυκόζης και επομένως δε θα απαιτείται η δειγματοληψία αίματος. Αντίθετα, ως δείγμα θα χρησιμοποιούνται τα ούρα, τα οποία έχουν το πλεονέκτημα της εύκολης και ανώδυνης συλλογής, γεγονός που προτρέπει στη τακτική και συχνή χρήση της διάταξης. Σαφώς, σε πρώτο στάδιο δε δύναται να αντικαταστήσει μεθόδους και συσκευές που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία, ωστόσο έχει την προοπτική να αποτελέσει ένα ισχυρό εργαλείο έγκαιρης πρώτης ένδειξης και προειδοποίησης σε καταστάσεις υπογλυκαιμίας και υπεργλυκαιμίας σε άτομα με διαβήτη. Επιπλέον, θα είναι ιδιαίτερα χρήσιμο και ως συσκευή στο πλαίσιο ενός προσιτού εύκολου ιατρικού ελέγχου (check-up) στον οικιακό χώρο, που θα μπορεί να προλάβει και ανακατευθύνει σε ειδικούς του ιατρικού κλάδου σε περιπτώσεις που και υγιή άτομα παρατηρήσουν σε συχνή βάση τιμές που κυμαίνονται εκτός των φυσιολογικών ορίων, που είναι από 0- 15 mg/dl.

3.2 Διάταξη Αναφοράς

Ως διάταξη αναφοράς, χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη :



Εικόνα 3.1: Η διάταξη αναφοράς

Αποτελείται από :

1. πηγή διέγερσης
2. 3d-printed υποδοχή της κυβέτας στην οποία τοποθετείται το υπό εξέταση δείγμα (**εικόνα 3.2**)
3. καλώδιο οπτικής ίνας
4. φασματόμετρο της εταιρείας THORLABS (μοντέλο CCS200)
5. ψηφιακό πολύμετρο
6. τροφοδοτικό
7. ηλεκτρονικό υπολογιστή, στον οποίο είναι εγκατεστημένο το πρόγραμμα “**Thorlabs OSA**” επίσης της εταιρείας THORLABS

Αναλυτικότερα , ως πηγή διέγερσης, χρησιμοποιείται ένα LED, το οποίο διαρρέεται μέσω του τροφοδοτικού με τάση 6 - 6.4 Volts .Το συγκεκριμένο εύρος τιμών προκύπτει από τις κατασκευαστικές του προδιαγραφές.

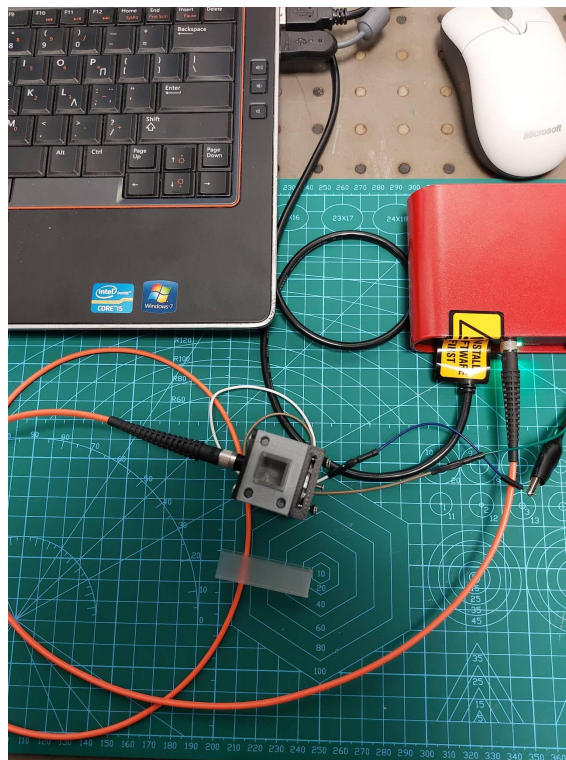
Το φάσμα ανίχνευσης μηκών κύματος του φασματογράφου καλύπτει το διάστημα από τα 200 έως τα 1000 nm.

Το καλώδιο οπτικής ίνας διοχετεύει το φως που συλλέγει και το στέλνει στο φράγμα περίθλασης του φασματογράφου.

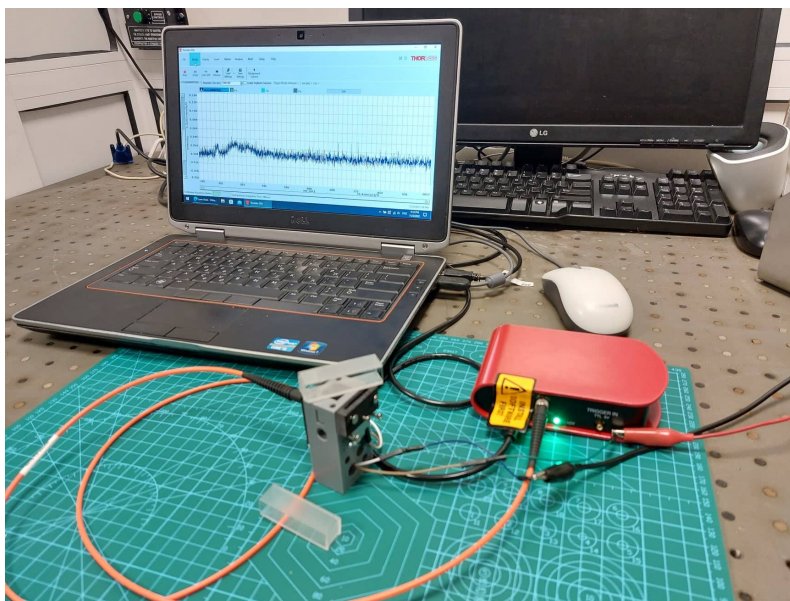
Μετά το φράγμα περίθλασης το φως αυτό προσπίπτει πάνω σε αισθητήρα εικόνας CCD, που αποτελείται από μια μονοδιάστατη ακολουθία 3648 pixels διαστάσεων $8 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$.

Το φράγμα περίθλασης κατανέμει χωρικά (και στο ίδιο επίπεδο) τις διάφορες συνιστώσες του φωτός που δέχεται, ανάλογα με το μήκος κύματος ή τα μήκη κύματος που το απαρτίζουν. Το φράγμα περίθλασης προβάλλει αυτό το φως (το επίπεδα κατανεμημένο) κατά μήκος της ακολουθίας pixels CCD, έτσι ώστε η συσκευή να ανιχνεύει από τα 200 έως τα 1000 nm, ανάλογα με την τιμή έντασης που λαμβάνουν τα pixels.

Μέσω του λογισμικού Thorlabs OSA απεικονίζεται το φάσμα απόκρισης, στο οποίο μπορούν να παρατηρηθούν οι κορυφές των μηκών κύματος που ανιχνεύθηκαν καθώς και οι αρμονικές συνιστώσες αυτών, όπως διαπιστώθηκε κατά την διάρκεια της λειτουργίας της διάταξης. Πιο συγκεκριμένα, το γράφημα στην οθόνη του H/Y είναι πρακτικά η οπτικοποίηση των εντάσεων φωτός που ανιχνεύει η ακολουθία των CCD pixels, που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Ο κατακόρυφος άξονας y αναπαριστά τις τιμές έντασης σε αυθαίρετες μονάδες (A.U.) και ο οριζόντιος άξονας x αναπαριστά την ακολουθία των 3648 pixels, καθένα από τα οποία αντιστοιχεί σε ορισμένο μήκος κύματος (nm), γεγονός που εξαρτάται από την ακρίβεια της βαθμονόμησης που έχει γίνει (ενδεικτικά μπορεί να φτάσει μέχρι και 12 nm).



Εικόνα 3.2: Υποδοχή κυβέτας



Εικόνα 3.3: Διάταξη αναφοράς

3.3 Προσαρμογή της διάταξης αναφοράς για το σχεδιασμό του προτεινόμενου βιοαισθητήρα

Η διάταξη που περιγράφηκε παραπάνω, διαπιστώνουμε ότι διαθέτει τις κατάλληλες προδιαγραφές για να μπορέσει να αποτελέσει θεμέλιο στη διαδικασία σχεδιασμού ενός φορητού βιοαισθητήρα, ο οποίος θα έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει σε τελικό στάδιο τη συγκέντρωση γλυκόζης που υπάρχει μέσα στα ούρα. Επισημαίνεται ότι ο λόγος που ως δείγμα επιλέγονται τα ούρα είναι η εύκολη και κυρίως ανώδυνη διαδικασία συλλογής τους.

Ωστόσο, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν οι κατάλληλες τροποποιήσεις, ώστε να προσαρμοστεί η λειτουργία της διάταξης στα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν και αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 2 και κατ' επέκταση στην επιθυμητή λειτουργία του βιοαισθητήρα.

Πιο λεπτομερώς :

1. Ως πηγή διέγερσης, υπάρχει η δυνατότητα τοποθέτησης είτε ενός μονοχρωματικού LASER 360 nm είτε μιας διόδου LASER (LASER DIODE στο ίδιο μήκος κύματος. Η δεύτερη επιλογή έχει τα πλεονεκτήματα του χαμηλότερου κόστους και του λιγότερου χώρου που καταλαμβάνει συγκριτικά με τη διάταξη ενός LASER. Η επιλογή αυτού του μήκους κύματος εξασφαλίζει ότι θα υπάρξει κορυφή φθορισμού στα 442 nm, η ένταση της οποίας εξαρτάται από την συγκέντρωση της γλυκόζης.
2. Η τροφοδοσία θα γίνεται μέσω θύρας USB από πλακέτα Arduino, η οποία στη συνέχεια θα επεξεργάζεται και τις μετρήσεις που λαμβάνουμε από το φάσμα φθορισμού.
3. Το δείγμα που θα τοποθετείται μέσα στην κυβέτα αναμένεται να είναι διάλυμα DMEM με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη μαζί με μια ορισμένη ποσότητα ούρων. Είναι απαραίτητη η παρουσία του DMEM διαλύματος σε αυτή τη φάση μελέτης, καθώς η

ποσότητα της γλυκόζης θα είναι συνολικά τέτοια ώστε να επιτρέψει την ανίχνευση του σήματος φθορισμού αργότερα.

4. Μεγάλο ρόλο διαδραματίζει το υλικό από το οποίο είναι κατασκευασμένη η κυβέτα στην οποία εξετάζουμε το δείγμα. Αυτό διότι πρέπει να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να απορροφάει τόσο το φως διέγερσης όσο και το φως που εκπέμπεται. Σε αντίθετη περίπτωση, τα δεδομένα που θα προκύπτουν θα είναι αλλοιωμένα και θα οδηγήσουν σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Παράδειγμα αποτελεί ότι μια γυάλινη άδεια κυβέτα εμπόδιζε την ανίχνευση του μήκους κύματος που έστειλε η πηγή στην διάταξη που παρουσιάστηκε προηγουμένως, η οποία ήταν ένα LED με κεντρικό μήκος κύματος κοντά στα 280 nm. Με άλλα λόγια, στο πρόγραμμα του Thorlabs OSA, παρατηρήθηκε στο διάγραμμα ότι είχε χαθεί η κορυφή αυτή, σε αντίθεση με την περίπτωση που στην υποδοχή δεν είχε τοποθετηθεί καθόλου η κυβέτα ή είχε τοποθετηθεί κυβέτα από χαλαζία, που τότε ήταν δυνατόν να φανεί.
5. Με δεδομένο ότι το σήμα διέγερσης είναι πολύ πιο ισχυρό σήμα συγκριτικά με το σήμα φθορισμού, για να εξασφαλιστεί ότι δε θα περάσει και θα είναι επομένως εφικτό να ανιχνευθεί το σήμα φθορισμού, χρειάζεται η διαμεσολάβηση ενός long pass φίλτρου ενδεικτικά με cutoff συχνότητα από τα 380 nm και ύστερα. Το φίλτρο αυτό χρειάζεται να τοποθετηθεί προτού το σήμα εκπομπής φθορισμού διέλθει μέσα από το καλώδιο της οπτικής ίνας, που καταλήγει στον φασματογράφο.
6. Η τελική συσκευή προορίζεται να απευθύνεται στο ευρύ κοινό, το οποίο ως τελικό αποτέλεσμα επιδιώκεται να βλέπει την συγκέντρωση της γλυκόζης στο δείγμα των ούρων που τοποθέτησε. Συνεπώς, οι μετρήσεις της έντασης φθορισμού στα 442 nm που αναμένεται να προκύψουν χρειάζεται να αντιστοιχιστούν με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις που τις προκαλούν. Η διαδικασία αυτή αντιστοίχισης και η συνεπαγόμενη μιας θεωρητικής βάσης δεδομένων θα γίνεται με προγραμματισμό της πλακέτας Arduino.
7. Τελικώς, χρειάζεται να ενσωματωθεί στη επιθυμητή διάταξη του βιοαισθητήρα μια οθόνη στην οποία θα οπτικοποιείται η ένταση του φθορισμού αντιστοιχισμένη στην εκάστοτε συγκέντρωση της υπάρχουσας γλυκόζης. Επομένως, θα συνδέεται επίσης με την πλακέτα Arduino.
8. Οι τιμές έντασης φθορισμού στην κορυφή 442 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης γλυκόζης, που λαμβάνονται από το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης της παρούσας διπλωματικής, σε σχέση με τις τιμές που λαμβάνονται από το φασματομέτρο στην διάταξη αναφοράς αυτή, ποιοτικά θα είναι ίδιες. Ωστόσο, είναι αναμενόμενο λόγω διαφορετικού φωτοπολλαπλασιαστή να εφαρμόζουν διαφορετική τιμή ενίσχυσης στο σήμα εκπομπής φθορισμού και άρα να διαφέρουν.
Επομένως, για σύγκριση των αποτελεσμάτων και για ακριβέστερα συμπεράσματα, ενδείκνυται η χρήση του λόγου έντασης στα 442 nm προς την ένταση στα 592 nm- που δεν υπάρχει δοσοεξάρτηση-, ο οποίος αναμένεται θεωρητικά να είναι ίδιος και στα δύο όργανα.

Σύνοψη και Γενικά Συμπεράσματα

4.1 Εκπομπή φθορισμού σε διάφορες συγκεντρώσεις και διεγέρσεις

Για τα πειράματα που έλαβαν χώρα σχετικά με την εκπομπή φθορισμού επιλέχθηκαν έπειτα από βιβλιογραφική αναζήτηση οι τιμές 360, 410 και 485 nm ως διέγερση.

Ως προς την επιλογή διαλύματος, σήμα φθορισμού λήφθηκε μόνο από το διάλυμα DMEM με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (450 mg/dl), διότι έπειτα από προσπάθειες με φυσιολογικό ορό και διάλυμα DMEM σχεδόν χωρίς γλυκόζη, διαπιστώθηκε ότι οι ποσότητες που επιχειρούσαμε να μετρήσουμε ήταν εκτός του δυναμικού εύρος του φασματοφωτομέτρου. Ύστερα, προστέθηκε και άλλη ποσότητα γλυκόζης στο διάλυμα DMEM διαλυμένη σε φυσιολογικό ορό.

Στη διέγερση των 360 nm μία εκ των τριών κορυφών παρουσίασε δοσοεξάρτηση και συγκεκριμένα η τιμή 442 nm από τις κορυφές 511 και 592 nm.

Μάλιστα, η μεταβολή της τιμής της έντασης φθορισμού στα 442 nm συναρτίζεται της συγκέντρωσης γλυκόζης είναι γραμμική.

Σε όλους τους άλλους πιθανούς συνδυασμούς διεγέρσεων και συγκεντρώσεων, η ένταση φθορισμού παρέμενε σταθερή ανεξάρτητη από την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης.

Τέλος, είναι σημαντικό σαν παρατήρηση να επισημανθεί, ότι το σήμα φθορισμού δεν προέρχεται από τον αυτοφθορισμό της γλυκόζης αυτό καθ' αυτόν, γιατί άλλωστε σε υδατικά διαλύματα δεν είναι εφικτό, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, να παρατηρηθεί φθορισμός. Ωστόσο, στο DMEM διάλυμα μπορεί να παρατηρηθεί αυτοφθορισμός που εξαρτάται από την παρουσία της γλυκόζης. Και αυτό επιβεβαιώνεται από τις πειραματικές μετρήσεις.

4.2 Σχεδιασμός βιοαισθητήρα μέτρηση συγκέντρωσης γλυκόζης

Η πειραματική μελέτη που διεξήχθη αποτελεί πρόσφορο έδαφος για τον σχεδιασμό ενός φορητού βιοαισθητήρα μέτρησης συγκέντρωσης γλυκόζης σε ούρα, που η λειτουργία του θα μπορεί να βασιστεί στο φαινόμενο του φθορισμού. Υπάρχει ήδη μια διάταξη, η οποία μπορεί να επεκταθεί και να παραμετροποιηθεί κατάλληλα, ώστε να ανταποκρίνεται στις προδιαγραφές του επιθυμητού βιοαισθητήρα.

Η πηγή διέγερσης θα είναι ένα LASER ή ένα LASER LED 360 nm.

Το δείγμα μέσα στην κυβέτα θα περιλαμβάνει διάλυμα DMEM και ούρα.

Ένα long-pass φίλτρο χρειάζεται να τοποθετηθεί πριν το σήμα εκπομπής διέλθει μέσα από το καλώδιο της οπτικής ίνας, ώστε να εξασθενήσει το ισχυρό σήμα διέγερσης και να καταστήσει δυνατή την ανίχνευση του σήματος εκπομπής.

Η τροφοδοσία και η επεξεργασία των μετρήσεων έντασης φθορισμού θα πραγματοποιούνται από μια πλακέτα Arduino.

Τέλος, η συγκέντρωση γλυκόζης στα ούρα θα απεικονίζεται σε μια οθόνη, από την οποία θα λαμβάνει τελικά την πληροφορία αυτή ο χρήστης.

4.3 Μελλοντικές Προεκτάσεις και Προτάσεις Περαιτέρω Έρευνας

Τα αποτελέσματα της τρέχουσας διπλωματικής εργασίας αδιαμφισβήτητα ενισχύουν την προσπάθεια καθιέρωσης της μη επεμβατικής παρακολούθησης της γλυκόζης και ιδανικά στον οικιακό χώρο.

Είναι ιδιαίτερα σημαντικό, ακόμα και αν μέχρι στιγμής παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, να αρχίζει να εξασθενεί ο παράγοντας της επεμβατικότητας διότι συνδέεται με αισθήματα πόνου, δυσφορίας και πιθανής πρόκλησης μολύνσεων, όταν απαιτείται και συχνή δειγματοληψία. Τα άτομα με διαβήτη δεν πρέπει να αισθάνονται τον έλεγχο του διαβήτη ως μια επώδυνη και δύσκολη διαδικασία, αλλά αντιθέτως να μπορούν να παρακολουθούν τα επίπεδα γλυκόζης με αποτελεσματικό και αξιόπιστο τρόπο, γρήγορα, εύκολα -από την άνεση του σπιτιού τους-, οικονομικά και κυρίως ανώδυνα. Για τον σκοπό αυτό, ιδιάζουσας σημασίας προτάσεις περαιτέρω μελέτης και μελλοντικές προοπτικές είναι οι εξής:

- Η διερεύνηση της απόκλισης που παρουσιάζει η μέτρηση συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα, την οποία θεωρούμε ως την πραγματική τιμή γλυκόζης, και η μέτρηση συγκέντρωσης γλυκόζης στα ούρα την ίδια χρονική στιγμή. Επομένως, αναμφίβολα, ως αναφορά χρειάζεται να γίνουν οι ίδιες μετρήσεις με τις εργαστηριακές τεχνικές για να εξασφαλιστεί υψηλή ακρίβεια και η εξαγωγή ορθών συμπερασμάτων.
- Ελαχιστοποίηση του χρόνου επεξεργασίας των μετρήσεων της διάταξης του βιοαισθητήρα. Ο χρήστης χρειάζεται, με άλλα λόγια, να βλέπει στην οθόνη σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα τη συγκέντρωση γλυκόζης.
- Μελέτη του υλικού από το οποίο θα είναι κατασκευασμένη η κυβέτα, ώστε να μην απορροφάει ούτε το φως που στέλνει η πηγή ούτε το φως που εκπέμπεται από το δείγμα.
- Η διερεύνηση μεθόδων συνεχούς μη επεμβατικής παρακολούθησης -σε πραγματικό χρόνο-, ώστε να είναι εφικτό το ιδανικό σενάριο της πλήρους αντικατάστασης των επεμβατικών μεθόδων παρακολούθησης γλυκόζης στο αίμα.
- Το δείγμα που τοποθετείται σε θεωρητικό πλαίσιο είναι ένα μίγμα ούρων με DMEM διάλυμα, το οποίο θα παρέχεται μαζί με τη φορητή συσκευή του βιοαισθητήρα. Είναι όμως άξιο περαιτέρω έρευνας να εξεταστεί πρακτικά αν το δείγμα θα παρουσιάζει

την ίδια συμπεριφορά με το δείγμα μόνο του DMEM διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική μελέτη (αν θα έχει ίδιες τιμές διέγερσης, κορυφές φθορισμού κλπ). Και αυτό διότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να αλλάζουν οι οπτικές ιδιότητες του διαλύματος. Τελικό στάδιο μελέτης θα μπορούσε να είναι η συλλογή μόνο ούρων ως δείγμα, χωρίς να απαιτείται άρα η παρουσία του θρεπτικού υλικού.

- Διερεύνηση κατασκευής μιας χαμηλού εμπορικού κόστους βιοαισθητήρα ώστε να είναι προσβάσιμο από κάθε άτομο, που θα εγγυάται όμως γρήγορα, έγκυρα, ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα μετρήσεων.

Βιβλιογραφία

- [1] Διαγνωστικά και Θεραπευτικά Πρωτόκολλα Συνταγογράφησης Σακχαρώδη Διαβήτη. <https://www.moh.gov.gr/articles/health/domes-kai-draseis-gia-thn-ygeia/kwdikopoihseis/therapeytika-prwtokolla-syntagografshs/diagnwtika-kai-therapeytika-prwtokolla-syntagografshs/5419-diagnwtika-kai-therapeytika-prwtokolla-syntagografshs-sakxarwdh-diabhth>.
- [2] Roger J McNichols και Gerard L Cote. *Optical glucose sensing in biological fluids: an overview*. *Journal of biomedical optics*, 5(1):5–16, 2000.
- [3] Xi Peng, Yi Xin Yan και He Liu. *On the use of fiber lasers in non-invasive blood glucose monitoring*. *Optical Fiber Technology*, 68:102822, 2022.
- [4] Liu Tang, Shwu Jen Chang, Ching Jung Chen και Jen Tsai Liu. *Non-Invasive Blood Glucose Monitoring Technology: A Review*. *Sensors*, 20(23), 2020.
- [5] Eric Renard. *Monitoring glycemic control: the importance of self-monitoring of blood glucose*. *The American Journal of Medicine*, 118(9):12–19, 2005.
- [6] Eda Cengiz και William V. Tamborlane. *A Tale of Two Compartments: Interstitial Versus Blood Glucose Monitoring*. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 11(Σ1):S-11–S-16, 2009.
- [7] Ελληνική Αντικαρκινική Εταιρεία. <https://cancerhellas.org/encyclopedia/%CE%B4%CE%AD%CF%81%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%82/>.
- [8] Willemijn Groenendaal, Golovon Basum, Kristiane A. Schmidt, Peter A. J. Hilbers και Natal A. W.van Riel. *Quantifying the Composition of Human Skin for Glucose Sensor Development*. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 4(5):1032–1040, 2010.
- [9] Wilbert Villena Gonzales, Ahmed Toaha Mobashsher και Amin Abbosh. *The Progress of Glucose Monitoring—A Review of Invasive to Minimally and Non-Invasive Techniques, Devices and Sensors*. *Sensors*, 19(4), 2019.
- [10] J M Burrin και C P Price. *Measurement of Blood Glucose*. *Annals of Clinical Biochemistry*, 22(4):327–342, 1985.
- [11] Yafen Liang, Jonathan Wanderer, James Nichols, David Klonoff και Mark Rice. *Blood Gas Analyzer Accuracy of Glucose Measurements*. *Mayo Clinic Proceedings*, 92, 2017.
- [12] Laya Ekhlaspour, Debbie Mondesir, Norman Lautsch, Courtney Balliro, Mallory Hillard, Kendra Magyar, Laura Goergen Radocchia, Aryan Esmaeili, Manasi Sinha και

- Steven J. Russell. *Comparative Accuracy of 17 Point-of-Care Glucose Meters*. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 11(3):558–566, 2017.
- [13] *Diabetes Australia. Continuous Glucose Monitoring*. <https://static.diabetesaustralia.com.au/s/fileassets/diabetes-australia/e2feb45e-ebc4-4133-85e1-b514e67d24de.pdf>.
- [14] Mokshagundam SP Ward JE, Stetson BA. *Patient perspectives on self-monitoring of blood glucose: perceived recommendations, behaviors and barriers in a clinic sample of adults with type 2 diabetes*. *J Diabetes Metab Disord*.2015, 2015.
- [15] MIT. *Carbon Nanotube Sensor Detects Glucose in Saliva*. <https://www.technologyreview.com/s/514456/carbon-nanotube-sensor-detects-glucose-in-saliva/>.
- [16] Jinyan Jia, Wenjun Guan, Minghao Sim, Yongquan Li και Hong Li. *Carbon Nanotubes Based Glucose Needle-type Biosensor*. *Sensors*, 8(3):1712–1718, 2008.
- [17] John C. Pickup, Faeiza Hussain, Nicholas D. Evans, Olaf J. Rolinski και David J.S. Birch. *Fluorescence-based glucose sensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12):2555–2565, 2005.
- [18] David C. Klonoff. *Overview of Fluorescence Glucose Sensing: A Technology with a Bright Future*. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 6(6):1242–1250, 2012.
- [19] *Sensing oxygen through skin using a red diode laser and fluorescence lifetimes*. *Biosensors and Bioelectronics*, 10(6):643–652, 1995.
- [20] *Οργανική Χημεία, Κεφάλαιο 5: Στερεοχημεία και τετραεδρικά κέντρα, Τμήμα Βιολογίας Κρήτης Πανεπιστημίου Κρήτης*. http://www.biology.uoc.gr/courses/BI06_Organiki_Ximia/documents/Lecture4.pdf.
- [21] *ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, 8η θεματική ενότητα: Στερεοχημεία οργανικών ενώσεων, Χαράλαμπος Καραντώνης, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Πανεπιστημίου Αιγαίου*. <https://eclass.aegean.gr/modules/document/file.php/FNS147/%CE%98%CE%95%CE%9C%CE%91%CE%A4%CE%99%CE%9A%CE%95%CE%A3%20%CE%95%CE%9D%CE%9F%CE%A4%CE%97%CE%A4%CE%95%CE%A3%08%20%CE%A3%CF%84%CE%B5%CF%81%CE%B5%CE%BF%CF%87%CE%B7%CE%BC%CE%B5%CE%AF%CE%B1%20%CE%BF%CF%81%CE%B3%CE%B1%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CF%8E%CE%BD%20%CE%B5%CE%BD%CF%8E%CF%83%CE%B5%CF%89%CE%BD.pdf>.
- [22] Bilal H. Malik και Gerard L. Coté. *Real-time, closed-loop dual-wavelength optical polarimetry for glucose monitoring*. *Journal of Biomedical Optics*, 15(1):017002.
- [23] A F Fercher, W Drexler, C K Hitzenberger και T Lasser. *Optical coherence tomography - principles and applications*. *Reports on Progress in Physics*, 66(2):239, 2003.
- [24] Lucas R. De Pretto, Tania M. Yoshimura, Martha S. Ribeiro και Anderson Z. de Freitas. *Optical coherence tomography for blood glucose monitoring through signal attenuation*. *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XX*, τόμος 9697, σελίδα 96973Φ, 2016.

- [25] Lidia Esteve Agelet και Charles R. Hurburgh Jr. *A Tutorial on Near Infrared Spectroscopy and Its Calibration*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40(4):246–260, 2010.
- [26] N. S. Oliver, C. Toumazou, A. E. G. Cass και D. G. Johnston. *Glucose sensors: a review of current and emerging technology*. *Diabetic Medicine*, 26(3):197–210.
- [27] Katsuhiko Maruo, Tomohiro Oota, Mitsuhiro Tsurugi, Takehiro Nakagawa, Hidenobu Arimoto, Mamoru Tamura, Yukihiro Ozaki και Yukio Yamada. *New Methodology to Obtain a Calibration Model for Noninvasive Near-Infrared Blood Glucose Monitoring*. *Applied Spectroscopy*, 60(4):441–449, 2006.
- [28] Omar S. Khalil. *Non-Invasive Glucose Measurement Technologies: An Update from 1999 to the Dawn of the New Millennium*. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 6(5):660–697, 2004.
- [29] Sabbir Liakat, Kevin A. Bors, Laura Xu, Callie M. Woods, Jessica Doyle και Claire F. Gmachl. *Noninvasive in vivo glucose sensing on human subjects using mid-infrared light*. *Biomed. Opt. Express*, 5(7):2397–2404, 2014.
- [30] Yijing Xu, Joseph F. Ford, Charles K. Mann, Thomas J. Vickers, John M. Brackett, Kristen L. Cousineau και W. Gerard Robey. *Raman measurement of glucose in bio-reactor materials*. *Biomedical Sensing, Imaging, and Tracking Technologies II*, τόμος 2976, 1997.
- [31] Y. Tanaka, T. Tajima και M. Seyama. *Differential photoacoustic spectroscopy with continuous wave lasers for non-invasive blood glucose monitoring*. *Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2018*, τόμος 10494.
- [32] Jonas Kottmann, Julien M. Rey και Markus W. Sigrist. *Mid-Infrared Photoacoustic Detection of Glucose in Human Skin: Towards Non-Invasive Diagnostics*. *Sensors*, 16(10), 2016.
- [33] Miguel A. Pleitez, Tobias Lieblein, Alexander Bauer, Otto Hertzberg, Hermann von Lilienfeld-Toal και Werner Mäntele. *Windowless ultrasound photoacoustic cell for in vivo mid-IR spectroscopy of human epidermis: Low interference by changes of air pressure, temperature, and humidity caused by skin contact opens the possibility for a non-invasive monitoring of glucose in the interstitial fluid*. *Review of Scientific Instruments*, 84(8):084901, 2013.
- [34] Andrea Tura, Stefano Sbrignadello, Domenico Cianciavichia, Giovanni Pacini και Paolo Ravazzani. *A Low Frequency Electromagnetic Sensor for Indirect Measurement of Glucose Concentration: In Vitro Experiments in Different Conductive Solutions*. *Sensors*, 10(6):5346–5358, 2010.
- [35] Harutyun Melikyan, Emma Danielyan, Seungwan Kim, Jongchel Kim, Arsen Babajanyan, Jungha Lee, Barry Friedman και Kiejin Lee. *Non-invasive in vitro sensing of d-glucose in pig blood*. *Medical Engineering Physics*, 34(3):299–304, 2012.

- [36] Ilana Harman-Boehm, Avner Gal, Alexander M. Raykhman, Jeffrey D. Zahn, Eugene Naidis και Yulia Mayzel. *Noninvasive Glucose Monitoring: A Novel Approach*. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 3(2):253-260, 2009.
- [37] *Recent advances in noninvasive glucose monitoring*. *Medical Devices : Evidence and Research*, 5(1):45-52, 2012.
- [38] *What is a Jablonski Diagram (Perrin-Jablonski Diagram)?* <https://www.edinst.com/us/blog/jablonski-diagram/>.
- [39] *What is a Fluorescence Measurement??* <https://www.horiba.com/sgp/scientific/technologies/fluorescence-spectroscopy/what-is-a-fluorescence-measurement/>.
- [40] Ousam Abdallah, Qasem Qananwah, Armin Bolz, Jan Hansmann, Svenja Hinderer και H. Mertsching. *Fluorescence Spectroscopy by Detection of Glucose Concentrations in DMEM-solutions and its Perspectives for Non-invasive Measurement.*, σελίδες 411-414, 2011.