



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

**Μελέτη για τον σχεδιασμό βιοαισθητήρα εντοπισμού του Αβ πεπτιδίου στο
δακρυϊκό δείγμα για την πρώιμη διάγνωση της νόσου του Alzheimer**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Δήμητρα Χ. Μπόμπα

Επιβλέπων: Ευάγγελος Β. Χριστοφόρου
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Συνεπιβλέπουσα: Ελένη Αλεξανδράτου,
ΕΔΙΠ Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Νοέμβριος 2022



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

**Μελέτη για τον σχεδιασμό βιοαισθητήρα εντοπισμού του Αβ πεπτιδίου στο
δακρυϊκό δείγμα για την πρόωμη διάγνωση της νόσου του Alzheimer**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Δήμητρα Μπόμπα

Επιβλέπων: Ευάγγελος Β. Χριστοφόρου
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Συνεπίβλεπуща: Ελένη Αλεξανδράτου,
ΕΔΙΠ Ε.Μ.Π.

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 15^η Νοεμβρίου 2022.

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

.....
Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος
Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

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

Αθήνα, Νοέμβριος 2022

.....
Δήμητρα Χ. Μπόμπα

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών Ε.Μ.Π.

Copyright © Δήμητρα Μπόμπα, 2022.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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.

Περίληψη

Η νόσος του Αλτσχάιμερ αποτελεί τη συχνότερη νευροεκφυλιστική ασθένεια με επιπτώσεις που πλήττουν το υγειονομικό, κοινωνικό και οικονομικό επίπεδο των χωρών. Η αιτιολογία της νόσου δεν είναι γνωστή, όμως, έχουν εντοπιστεί διάφοροι παράγοντες που φαίνεται να συνδέονται άμεσα με τη νόσο. Οι δομές αυτές είναι γνωστές ως «αμυλοειδείς πλάκες» και «νευροϊνιδιακοί κόμβοι» και συναντώνται στον εγκέφαλο.

Η σημασία της έγκυρης και έγκαιρης διάγνωσης φέρνουν στην επιφάνεια την ανάγκη δημιουργίας μιας όσο το δυνατόν λιγότερο επεμβατικής μεθόδου. Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην αναζήτηση βιοδεικτών στα φυσιολογικά υγρά (δάκρυα, ιδρώτας, σίελος, ούρα). Στην παρούσα εργασία επιλέγεται ως βιολογικό δείγμα το δακρυϊκό υγρό το οποίο φέρει πολύτιμες πληροφορίες, όχι μόνο για τον ίδιο τον οφθαλμό αλλά και για τη λειτουργία ολόκληρου του σώματος. Αναφορικά με την νόσο του Αλτσχάιμερ, στα δάκρυα εκφράζονται 4 κατηγορίες βιοδεικτών: το Αβ πεπτιδίο, η πρωτεΐνη tau, ο συνδυασμός των πρωτεϊνών LCN-1,DCD,LACRT, LYZ και το microRNA-200b-5p. Επίσης, η συλλογή του δακρυϊκού δείγματος μπορεί να επιτευχθεί με διαφορετικούς τρόπους, όπως το Schirmer test, τη μέθοδο των τριχοειδών σωλήνων ή ακόμα και με μια εναλλακτική μέθοδο, των φακών επαφής.

Θέτοντας ως στόχο τη δέσμευση του Αβ πεπτιδίου στα υδατικά διαλύματα και επιλέγοντας ως ανιχνευτή την κουρκουμίνη ακολουθεί η φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης και φθορισμού του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη.

Τέλος, προτείνεται ο σχεδιασμός δυο οπτικών βιοαισθητήρων ανίχνευσης του Αβ πεπτιδίου στα δάκρυα, ένας απορρόφησης και ένας φθορισμού, με βάση τα φασματοσκοπικά αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας.

Λέξεις-κλειδιά: Αλτσχάιμερ, δάκρυα, Αβ πεπτιδίο, κουρκουμίνη, φασματοσκοπία απορρόφησης και φθορισμού

Abstract

Alzheimer is nowadays the most common neurodegenerative disease with health, social and economic consequences globally. The etiology of the disease is not known, however, several factors have been identified that appear to be directly linked to the disease. These structures are known as 'amyloid plaques' and 'fibrillary tangles' and are found in the brain.

The importance of the accurate and early diagnosis gives prominence to the need of creating a method less invasive, as possible. In recent years, the interest revolves around the search for biomarkers in physiological fluids (tears, sweat, saliva, urine). In this diploma thesis, the tear fluid is selected as a biological sample, which carries valuable information, not only about the eye, but also about the functioning of the entire body. In regards to the Alzheimer disease, there are 4 categories of biomarkers that appear through the tears: the A β peptide, the tau protein, the combination of proteins LCN-1, DCD, LACRT, LYZ and the microRNA-200b-5p. Moreover, the collection of tear sample, can be achieved through different ways, such as the Schirmer's test, the capillary tube method or even an alternative method, contact lens.

Setting the aim to bind the A β peptide in aqueous solutions and choosing curcumin as a probe, the absorption and fluorescence spectroscopic study of the A β -curcumin complex is presented furtherly in the dissertation.

Finally, following the spectroscopy results of the experimental process, the dissertation deals with the design of two optical biosensors for the detection of the *A β peptide* in tears, to have the potential of absorption through the one and fluorescence through the second.

Keywords: Alzheimer, tears, A β peptide, curcumin, absorption and fluorescence spectroscopy

στους γονείς μου

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή, κ. Ευάγγελο Χριστοφόρου που από την πρώτη μέρα στήριξε την ιδέα αυτής της εργασίας ενθαρρύνοντάς με να προχωράω σε όλα τα στάδιά της και να ξεπερνάω τα εμπόδια.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ την κ. Ελένη Αλεξανδράτου, Εργαστηριακό Διδακτικό προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π.), για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε και για την ουσιαστική συμβολή της σε ό,τι αφορά στην πειραματική διαδικασία.

Ευχαριστώ πολύ, την καλή μου φίλη Ορσαλία-Ζωή Βελουδίου, για την έμπνευση, τις συμβουλές και τις πλάκες καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, Άννα και Χριστόδουλο, και στην αδερφή μου, Μαρία, που η αγκαλιά τους είναι σταθερά παρούσα σε όλα μου τα βήματα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μου τους φίλους και πιο πολύ το Γλαύκο, τη Βασιλική, την Ανδριάνα, τη Δήμητρα, τη Δανάη, την Αγγελική και τα παιδιά από τη μπάντα που τόσα χρόνια φτιάχνουμε τις πιο ωραίες αναμνήσεις. Χωρίς αυτή την αγάπη, όλα θα ήταν πιο δύσκολα.

Αθήνα, Νοέμβριος 2022

Δημήτρια Μπόμπα

Πίνακας περιεχομένων

1	Νευροεκφυλιστικές Νόσοι – Η νόσος του Alzheimer (AD)	23
1.1	Μορφές άνοιας	24
1.2	Συμπτώματα της νόσου AD	25
1.2.1	Στατιστικά στοιχεία	26
1.2.2	Σημασία έγκαιρης διάγνωσης	26
1.2.3	Οι πιο συνηθισμένοι βιοδείκτες της νόσου AD	27
1.2.4	Απεικονιστικοί Βιοδείκτες	28
1.2.5	Γενετικοί βιοδείκτες	29
1.2.6	Διαγνωστικές εξετάσεις για τη νόσο	30
1.2.7	Αιτιολογία της νόσου	31
1.3	Σχηματισμός Αβ πεπτιδίου	32
1.4	Σχηματισμός της πρωτεΐνης tau	33
2	Προσδιορισμός κατάλληλου Βιοδείκτη για την ανίχνευση της νόσου του Alzheimer στο δακρυϊκό δείγμα	35
2.1	Βιοδείκτες	35
2.2	Οφέλη δακρυϊκού υγρού	36
2.2.1	Δακρυϊκό υγρό	37
2.2.2	Σύσταση δακρύων	39
2.3	Μέθοδοι συλλογής δακρυϊκού υγρού	40
2.3.1	Schirmer test	41
2.3.2	Τριχοειδείς σωλήνες	42
2.3.3	Φακοί επαφής	44
2.4	Βιοδείκτες στοδακρυϊκό υγρό	44
2.4.1	Το Αβ πεπτιδίου πιθανός βιοδείκτης της AD στα δάκρυα	45
2.4.2	Η πρωτεΐνη tau πιθανός βιοδείκτης της AD στα δάκρυα	48
2.4.3	Ο συνδυασμός των πρωτεϊνών LCN-1, DCD, LACRT, LYZ-ως πιθανός βιοδείκτης της AD στα δάκρυα	49

2.4.4	Το microRNA-200b-5'ως πιθανός βιοδείκτης της ADστα δάκρυα	50
3	Βιοαισθητήρες	51
3.1	Γενικά στοιχεία βιοαισθητήρων	51
3.2	Χαρακτηριστικά αισθητήρων	52
3.3	Οπτική.....	54
3.4	Ανιχνευτές	57
3.4.1	Η θειοβλαβίνη – Thioflavin, ThT.....	59
3.4.2	Η Κουρκουμίνη - Curcumin	60
4	Πειραματικές διατάξεις και ουσίες	63
4.1	Σκοπός Πειραματικής μελέτης	63
4.2	Πειραματικές Διατάξεις.....	64
4.2.1	Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης.....	64
4.2.2	Φασματοφωτόμετρο φθορισμού	67
4.3	Ουσίες.....	71
4.3.1	Αβ.....	71
4.3.2	Κουρκουμίνη	71
4.3.3	PBS.....	72
5	Κεφάλαιο Πειραματικές Μέθοδοι.....	74
5.1	Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης.....	74
5.2	Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού.....	75
6	Αποτελέσματα	76
6.1	Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης του σύμπλοκουΑβ-κουρκουμίνης	76
6.1.1	Αποτελέσματα	76
6.1.2	Συμπεράσματα	78
6.2	Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού του σύμπλοκουΑβ-κουρκουμίνης.....	79
6.2.1	Αποτελέσματα	79
6.2.2	Συμπεράσματα	81
7	Επίλογος.....	82
7.1	Συμπεράσματα	82

7.2	Προτεινόμενος σχεδιασμός βιοασθητήρα.....	83
7.2.1	Αισθητήρας απορρόφησης	84
7.2.2	Αισθητήρας φθορισμού	86
7.3	Συζήτηση-Μελλοντικές προοπτικές	88
	Βιβλιογραφία	89

Ευρετήριο Εικόνων

ΕΙΚΟΝΑ 1-ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΗΣ AD, ΑΡΙΣΤΕΡΑ ΤΟ ΑΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ, ΣΤΗ ΜΕΣΗ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ MCI ΚΑΙ ΔΕΞΙΑ, ΤΟ ΤΕΛΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ AD.....	25
ΕΙΚΟΝΑ 2-ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ AD ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	32
ΕΙΚΟΝΑ 3-ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ APP, ΤΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟ ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΛΙΚΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΝ ΠΛΑΚΩΝ.....	33
ΕΙΚΟΝΑ 4-ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΣΤΗ ΝΟΣΟ AD: ΑΜΥΛΟΕΙΔΕΙΣ ΠΛΑΚΕΣ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΪΝΙΔΙΑΚΑ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΑ	34
ΕΙΚΟΝΑ 5-ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΩΝΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ: ΔΑΚΡΥΑ, ΟΠΤΙΚΟΙ ΑΔΕΝΕΣ, ΣΙΕΛΟΣ, ΟΥΡΑ ΚΑΙ ΑΙΜΑ	37
ΕΙΚΟΝΑ 6- Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΔΑΚΡΥΩΝ: 1) ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ ΥΔΡΟΦΟΒΟ ΣΤΡΩΜΑ ΛΙΠΙΔΙΩΝ, 2) ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ ΥΔΑΤΙΚΟ ΣΤΡΩΜΑ, 3) ΒΛΕΝΝΩΔΕΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΣΤΡΩΜΑ	39
ΕΙΚΟΝΑ 7- ΣΥΣΤΑΣΗ ΔΑΚΡΥΪΚΟΥ ΥΓΡΟΥ	40
ΕΙΚΟΝΑ 8- ΤΕΧΝΙΚΗ SCHIRMERTEST ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΟΥ ΔΑΚΡΥΪΚΟΥ ΥΓΡΟΥ.....	42
ΕΙΚΟΝΑ 9- ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΡΙΧΟΕΙΔΩΝ ΣΩΛΗΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΟΥ ΔΑΚΡΥΪΚΟΥ ΥΓΡΟΥ	43
ΕΙΚΟΝΑ 10- ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΣΕ ΦΑΚΟΥΣ ΕΠΑΦΗΣ	44
ΕΙΚΟΝΑ 11- ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΤΗΣ AD	45
ΕΙΚΟΝΑ 12- ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ	54
ΕΙΚΟΝΑ 13-ΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΟ ΦΑΣΜΑ	57
ΕΙΚΟΝΑ 14-ΟΙ ΔΟΜΙΚΟΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΑΒ	59
ΕΙΚΟΝΑ 15-ΤΟ ΦΥΤΟ CURCUMALONGA, Η ΡΙΖΑ ΤΟΥ ΚΑΙ ΤΟ ΠΑΡΑΓΩΓΟ ΤΟΥ, Η ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ	61
ΕΙΚΟΝΑ 16-ΤΑ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΟΕΙΔΗ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ	61
ΕΙΚΟΝΑ 17-ΤΟ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ, LAMBDA35, UV,VISSPECTROMETER, PERKIN-ELMER.....	64
ΕΙΚΟΝΑ 18-BLOCKΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ LAMBDA 35,UV,VISSPECTROMETER, PERKIN-ELMER.....	66
ΕΙΚΟΝΑ 19-ΟΙ ΘΕΣΕΙΣ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΣΤΟ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ LAMBDA 35,UV/VISSPECTROMETER, PERKIN-ELMER.....	67
ΕΙΚΟΝΑ 20-ΤΟ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ, PERKIN-ELMERLS 45 LUMINESCENCESPECTROMETER.....	68
ΕΙΚΟΝΑ 21-BLOCK ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ PERKIN-ELMERLS 45 LUMINESCENCESPECTROMETER	69
ΕΙΚΟΝΑ 22-Η ΘΕΣΗ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟ ΕΞΕΤΑΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ PERKIN-ELMERLS 45 LUMINESCENCE	71
ΕΙΚΟΝΑ 23-ΦΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥΑΒ-ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΙΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΜΕΡΕΣ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ	77
ΕΙΚΟΝΑ 24-ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΗΣ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΧΡΟΝΟ, ΓΙΑ ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟΑΒ-ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΣΤΑ 446 ΝΜ	78
ΕΙΚΟΝΑ 25-ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΗΣ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΧΡΟΝΟ, ΓΙΑ ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟΑΒ-ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΣΤΑ 344ΝΜ.....	78
ΕΙΚΟΝΑ 26-ΦΑΣΜΑΤΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥΑΒ-ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΙΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΜΕΡΕΣ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ, ΜΕ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΣΤΑ 446 ΝΜ	80
ΕΙΚΟΝΑ 27-ΦΑΣΜΑΤΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥΑΒ-ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΙΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΜΕΡΕΣ 0,3 ΚΑΙ 5, ΜΕ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΣΤΑ 344 ΝΜ	81
ΕΙΚΟΝΑ 28-ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΔΙΑΤΑΞΗ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ.....	85
ΕΙΚΟΝΑ 29-ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΔΙΑΤΑΞΗ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	87

Ευρετήριο Πινάκων

ΠΙΝΑΚΑΣ 1- ΔΙΑΦΟΡΑ ΡΥΘΜΟΥ ΡΟΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΑ ΔΑΚΡΥΑ ΜΕΤΑΞΥ ΥΓΙΩΝ ΜΑΡΤΥΡΩΝ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΩΝ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ ΑΛΤΣΧΑΙΜΕΡ	49
ΠΙΝΑΚΑΣ 2- ΟΙ ΠΙΘΑΝΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΔΑΚΡΥΪΚΟ ΥΓΡΟ.....	51
ΠΙΝΑΚΑΣ 3-ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΤΙΜΩΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥΑΒ-ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΑΝΑ ΜΕΡΑ ΣΤΑ 446 ΝΜ ΚΑΙ 344 ΝΜ	77
ΠΙΝΑΚΑΣ 4- ΠΙΝΑΚΑΣ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΤΙΜΩΝ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥΑΒ-ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΓΙΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΣΤΑ 446 ΝΜ , ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΙΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΜΕΡΕΣ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ	80
ΠΙΝΑΚΑΣ 5-ΠΙΝΑΚΑΣ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΩΝ ΜΕΓΙΣΤΩΝ ΤΙΜΩΝ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥΑΒ-ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΓΙΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΣΤΑ 344 ΝΜ, ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΡΕΣ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ 0,3 ΚΑΙ 5	81

1 Νευροεκφυλιστικές Νόσοι – Η νόσος του Alzheimer (AD)

Ο όρος «Νευροεκφυλιστική νόσος» περιγράφει μια σειρά από παθήσεις οι οποίες προσβάλλουν τους νευρώνες του ανθρώπινου εγκεφάλου. Στη γενική περίπτωση, αυτά τα νοσήματα σχετίζονται με την προοδευτική, επιλεκτική απώλεια νευρικών κυττάρων σε συγκεκριμένες ανατομικές περιοχές. Κατά κανόνα, οι νευρώνες δεν αναπαράγονται και δεν ανανεώνονται, γεγονός που καθιστά την περίπτωση βλάβης τους μη-αντιστρέψιμη κατάσταση αφού δεν μπορούν να αντικατασταθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό. Χαρακτηριστικά παραδείγματα των νευροεκφυλιστικών νόσων είναι το Alzheimer, το Parkinson, η νόσος του Huntington κλπ. Διευκρινίζεται πως σε αυτήν την κατηγορία νοσημάτων, δεν περιλαμβάνονται οι παθήσεις που οφείλονται σε εκφύλιση των νευρώνων λόγω τραυματισμού των νεύρων, ισχαιμιών ή λοιμώξεων [1].

Η συχνότερη Νευροεκφυλιστική ασθένεια είναι το Alzheimer (AlzheimerDisease, AD)σε ποσοστό 60-70% με τις επιπτώσεις της σε κοινωνικό και οικονομικό επίπεδο να είναι τεράστιες [2].

Η νόσος του Alzheimer (AD, AlzheimerDisease) είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος του νευρικού συστήματος του ανθρώπου, τα συμπτώματα της οποίας καταγράφηκαν για πρώτη φορά από το Γερμανό ιατρό AloisAlzheimer το 1904 [2]. Οι αιτίες της νόσου δεν είναι γνωστές [3], όμως, ως κύριοι παράγοντες κινδύνου της νόσου εντοπίζονται οι συσσωρεύσεις β-αμυλοειδούς-που δημιουργούν τις χαρακτηριστικές πλάκες σε συγκεκριμένα σημεία του εξωκυττάριου χώρου του εγκεφάλου (π.χ. υπόκαμπος, φλοιός κλπ) με αποτέλεσμα να δημιουργούνται φλεγμονές που καταστρέφουν τα νευρικά κύτταρα (εκφύλιση νευρώνων) -και η πρωτεΐνη tau. Παλαιότερα, στη νόσο του Alzheimer αποδιδόταν συχνά ο όρος «γεροντική άνοια». Όμως, ο όρος αυτός έχει πάψει να χρησιμοποιείται καθώς η νόσος AD αλλά και εν γένει η άνοια, δεν αποτελούν φυσιολογική εκδήλωση γήρατος. Πρόκειται για νευροεκφυλιστική πάθηση, οι αιτίες της οποίας έχουν ήδη ξεκινήσει αρκετά χρόνια πριν την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων.

1.1 Μορφές άνοιας

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ηνευροεκφυλιστική εξέλιξη της νόσου του Alzheimer αναπτύσσεται βαθμιαία και σε μεγάλο χρονικό διάστημα, καθώς η έναρξη του νοσήματος μπορεί να ξεκινήσει αρκετά χρόνια πριν την παρουσίαση των συμπτωμάτων. Αυτή η χρονική εξέλιξη χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες οι οποίες περιγράφονται παρακάτω.

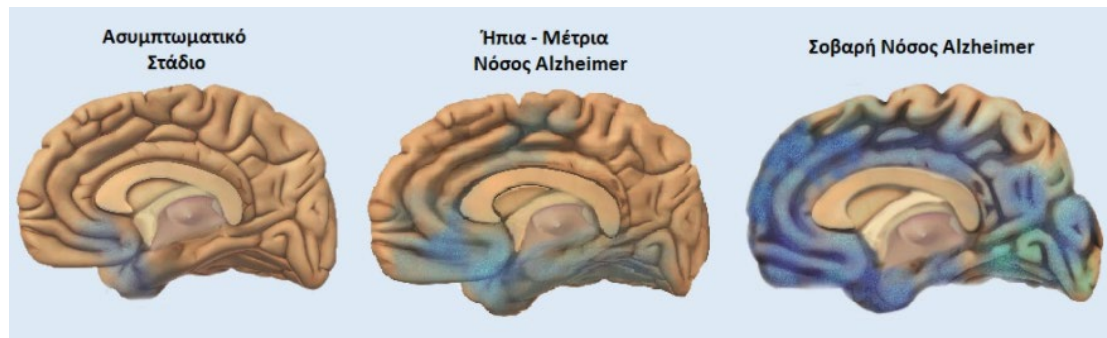
Το πρώτο στάδιο ονομάζεται ασυμπτωματικό ή προκλινικό. Το στάδιο αυτό μπορεί να διαρκέσει πολλά χρόνια κατά τα οποία προκαλείται σταδιακή βλάβη σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Έτσι, κατά τη διάρκεια του ασυμπτωματικού σταδίου, ο ασθενής δεν νοσεί κλινικά, καθώς οι βλάβες που αναπτύσσονται (εναπόθεση αμυλοειδούς, νευροϊνιδιακοί σωροί κλπ) δεν έχουν τόση μεγάλη βαρύτητα ώστε να του προκαλέσουν τα συμπτώματα που παρατηρούνται στα επόμενα στάδια. Βέβαια, είναι πιθανό οι βιολογικές αλλοιώσεις που συμβαίνουν στο στάδιο αυτό να προκαλούν συμπτώματα τα οποία, όμως, δεν είναι εύκολα διακριτά, αφού ενδεχομένως να αντιρροπούνται από τους μηχανισμούς εφεδρείας του εγκεφάλου[4].

Το επόμενο στάδιο ονομάζεται Ήπια Γνωστική Διαταραχή (Mild Cognitive Impairment, MCI). Στο στάδιο αυτό ο ασθενής αρχίζει να παρουσιάζει τα πρώτα συμπτώματα της νόσου τα οποία συνήθως είναι η διαταραχή της πρόσφατης αυτοβιογραφικής μνήμης. Σε κάθε περίπτωση, όμως, ο ασθενής συνεχίζει να είναι λειτουργικός και να ανταπεξέρχεται στις καθημερινές του υποχρεώσεις. Ωστόσο, καθώς η γνωμάτευση της MCI είναι μια περιγραφική διάγνωση, επισημαίνεται πως δεν οφείλεται πάντα σε υποκείμενη AD. Εκτιμάται ότι το 5-15% των ατόμων με MCI μεταπίπτουν σε άνοια κάθε έτος [4].

Το τρίτο στάδιο, το επονομαζόμενο στάδιο κλινικά έκδηλης νόσου Αλτσχάιμερ, είναι αυτό όπου ο ασθενής παρουσιάζει πλέον έντονα συμπτώματα ενώ επίσης η νοητική του κατάσταση επιβαρύνεται με το πέρασμα του χρόνου. Οι περισσότερες περιπτώσεις ασθενών εμφανίζουν συμπεριφορικά και ψυχολογικά προβλήματα με αποτέλεσμα να χρειάζονται όλο και περισσότερη φροντίδα και επιτήρηση. Στα

τελευταία στάδια της νόσου, οι ασθενείς καθίστανται πλήρως εξαρτημένοι από το περιβάλλον τους [4].

Στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 1] φαίνεται η εξέλιξη των αλλοιώσεων στον εγκέφαλο, εξαιτίας της νόσου του Αλτσχάιμερσε καθένα από τα στάδια της πάθησης.



Εικόνα 1-Ιστολογικές αλλοιώσεις της AD, αριστερά το ασυμπτωματικό στάδιο, στη μέση το στάδιο της MCI και δεξιά, το τελικό στάδιο της AD

1.2 Συμπτώματα της νόσου AD

Σύμφωνα με μια έρευνα που διεξήχθη στο Νότινχαμ του Ηνωμένου Βασιλείου, μόνο το 28% των ασθενών κατάφερε να εντοπίσει συμπτώματα της νόσου σε πρώιμο στάδιο, ενώ οι οικείοι/φροντιστές είχαν υποψιαστεί την ύπαρξη αυτών σε ποσοστό 82% [1]. Βέβαια, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα συμπτώματα εισβάλλουν βαθμιαία σε διάστημα αρκετών ετών και σταδιακά επιδεινώνονται. Στο ασυμπτωματικό στάδιο της νόσου είναι πιθανό ο ασθενής να εμφανίσει απότομα συμπτώματα οξείας σύγχυσης κατά τη διάρκεια μιας εμπύρετης λοίμωξης ή μιας χειρουργικής επέμβασης τα οποία, βέβαια, προοδευτικά βελτιώνονται κάτι που συνδέεται με την προσωρινή υπερκέραση της ενεργοποίησης των μηχανισμών εφεδρείας ενός ήδη ευπαθούς εγκεφάλου.

Τα πιο συνήθη συμπτώματα που εκδηλώνουν οι ασθενείς κατά την πάροδο του χρόνου είναι τα παρακάτω [4].

- Διαταραχή μνήμης
- Διαταραχή λόγου

- Διαταραχή της αντίληψης του χώρου
- Δυσκολία στον προγραμματισμό και στην εκτέλεση σύνθετων δραστηριοτήτων
- Απραξία
- Συμπεριφορικά και ψυχολογικά συμπτώματα

1.2.1 Στατιστικά στοιχεία

Μέχρι το Σεπτέμβριο του 2020, καταγράφηκαν 50 εκατομμύρια άνθρωποι που ζουν με άνοια, ενώ το 2030 αναμένεται ο αριθμός αυτός να έχει φτάσει τα 82 εκατομμύρια και τα 152 εκατομμύρια μέσα στο 2050, από τα οποία το 60-70% θα πρόκειται για ασθενείς της AD [2]. Στην Ελλάδα, υπάρχουν σήμερα 200.000 άτομα με άνοια, αριθμός που προβλέπεται να ξεπεράσει τις 600.000 μέχρι το 2050 [3].

Η AD μαζί με τις άλλες μορφές άνοιας προκαλούν υγειονομική κρίση καθώς οι αυξημένες ανάγκες και οι θεραπευτικές αγωγές του πάσχοντος σε συνδυασμό με την υποστήριξη των φροντιστών τους είναι πολύ υψηλές. Πιο συγκεκριμένα, το ετήσιο κόστος της άνοιας παγκοσμίως το 2010 ανήλθε σε 604 δις \$ ενώ ο αντίστοιχος αριθμός στην Ευρώπη έφτασε τα 170 δις €. Στην Ελλάδα το ετήσιο κόστος της άνοιας είναι περίπου 3 δις € [3].

Αναλυτικότερα, σύμφωνα με την Εταιρία AlzheimerΑθηνών, 1 στα 50 άτομα (2%) στο ηλικιακό φάσμα 65-74 ετών έχει άνοια, ποσοστό που εκτοξεύεται στο 19%, δηλαδή σχεδόν 1 στα 5 άτομα για ηλικίες 75-84 χρονών και τελικά στο 42%, σχεδόν 1 στους 3, όταν πρόκειται για άτομα άνω των 85 ετών [3]. Στην Ελλάδα, η νόσος συναντάται περίπου στο 60% των περιπτώσεων άνοιας και εκτιμάται πως υπάρχουν πάνω από 150.000 άτομα με κάποια μορφή άνοιας.

1.2.2 Σημασία έγκαιρης διάγνωσης

Η έγκαιρη διάγνωση είναι ένα κρίσιμο στάδιο τόσο για τη μελέτη όσο και για την αντιμετώπιση των νευροεκφυλιστικών νόσων καθώς όσο νωρίτερα ανιχνευτεί μια

ασθένεια τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό επιτυχίας ως προς τη αποτελεσματικότητα της αντίστοιχης θεραπείας. Μέχρι σήμερα, δεν είναι γνωστός κάποιος αποδοτικός δείκτης για τον έλεγχο του πληθυσμού και σε συνδυασμό με την αργή επιδείνωση των συμπτωμάτων κατά τα πρώτα στάδια της νόσου, το εγχείρημα της διάγνωση αποτελεί μια πολύ δύσκολη διαδικασία[1].

Επιπλέον, η έγκαιρη διάγνωση τις περισσότερες φορές έχει μεγάλο οικονομικό όφελος καθώς αποτρέπει τις περιττές δαπανηρές εξετάσεις, τις επώδυνες καταστάσεις αλλά και τη λήψη φαρμάκων. Στο ευρύ φάσμα της «άνοιας» υπάγεται ένας μεγάλος αριθμός νοσημάτων με αποτέλεσμα συχνά να υπάρχει σύγχυση στη διάγνωση. Βασική αίτια αυτού, είναι η νευροψυχολογική εκτίμηση που πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της νόσου και η νευροπαθολογική εκτίμηση που συνήθως πραγματοποιείται μεταθανάτια χωρίς, όμως, να προσδίδουν απόλυτη ειδικότητα και ευαισθησία. Έχει βρεθεί ότι για τη νόσο του Αλτσχάιμερ απαιτείται ευαισθησία 71-87% και ειδικότητα 44-71% [1]. Μια διάγνωση με μεγάλο ποσοστό ευαισθησίας και ειδικότητας επαναπροσδιορίζει τον τρόπο θεραπείας, αφού η διαχείριση της νόσου, για ασθενείς που βρίσκονται σε πρωταρχικό στάδιο, μπορεί προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες και συμβουλές τόσο για τους ίδιους όσο και για τους οικείους τους.

Φυσικά, με τα δεδομένα που ισχύουν μέχρι σήμερα, ακόμα και αν η διάγνωση γίνει σε πρώιμο στάδιο, ενδέχεται ορισμένα προβλήματα να παραμείνουν άλυτα. Σε αρκετές ασθένειες, ο εντοπισμός κατάλληλων βιοδεικτών είναι μια δύσκολη διαδικασία αφού συχνά ανιχνεύονται σε χαμηλή συγκέντρωση ή σε ανεπαρκή ποσότητα.

1.2.3 Οι πιο συνηθισμένοι βιοδείκτες της νόσου AD

Στα βασικά συμπτώματα της νόσου AD περιλαμβάνονται οι γνωστικές διαταραχές (π.χ. διαταραχή μνήμης, λόγου, αντίληψης χώρου), η δυσκολία εκτέλεσης σύνθετων εργασιών, οι ψυχολογικές διαταραχές και εν τέλει η άνοια. Η πιο ασφαλής μέθοδος για τη διάγνωση της AD θεωρείται πως είναι η αυτοψία του εγκεφάλου και των

χαρακτηριστικών παθολογοανατομικών ευρημάτων της νόσου, η οποία πραγματοποιείται μετά το θάνατο του ασθενή. Σημαντικές πληροφορίες δίνουν, επίσης, οι κλινικές εξετάσεις που περιλαμβάνουν νευροψυχολογικό έλεγχο, εξέταση της μνήμης και άλλων λειτουργιών, όπως η μάθηση, η ομιλία, η προσοχή και η καθημερινότητα του ασθενή, αξιοποιώντας σε κάθε περίπτωση το ιστορικό του. Στις επόμενες υποενότητες παρουσιάζονται οι τρεις τύποι βιοδεικτών (απεικονιστικοί, γενετικοί, χημικοί) καθώς και οι εξετάσεις που διεξάγονται για τη διάγνωση της νόσου του Alzheimer.

1.2.4 Απεικονιστικοί Βιοδείκτες

1.2.4.1 Αξονική τομογραφία (Computed Tomography, CT)

Η αξονική τομογραφία αφορά την εφαρμογή ακτινών Χ στο ανθρώπινο σώμα από πολλαπλές οπτικές γωνίες. Φυσικά, για τη διάγνωση της AD η ακτινοβολήση γίνεται στην περιοχή της κεφαλής του ασθενή έτσι ώστε να ληφθούν κάθετες λεπτές τομές (μεταξύ 0,6-10 mm) του εγκεφάλου, που θα οδηγήσουν σε συμπεράσματα σχετικά με την ύπαρξη όγκων, εγκεφαλικών επεισοδίων και τραυματισμών. Οι εικόνες που λαμβάνονται από τους πάσχοντες της AD περιγράφονται από διάχυτη εγκεφαλική ατροφία, συρρίκνωση των φλοιών του εγκεφάλου και αύξηση των κοιλιών. Έτσι, η μεταβολή του μεγέθους του εγκεφάλου προκαλεί τη γνωστική απώλεια που σχετίζεται με τη νόσο [5].

1.2.4.2 MRI – Magnetic Resonance Imaging

Η μέθοδος του MRI (Magnetic Resonance Imaging, Απεικόνιση Μαγνητικού Συντονισμού) μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τα ανατομικά δεδομένα του εγκεφάλου, που αφορούν κυρίως τη φαιά ουσία του ιππόκαμπου, του παρα-ιππόκαμπου, της αμυγδαλής, του οπίσθιου συνειρμικού φλοιού και των υποφλοιακών σχηματισμών. Αυτό συμβαίνει καθώς το MRI διαθέτει υψηλή διακριτική ικανότητα. Έτσι, είναι εφικτή η μη επεμβατική μελέτη της ενεργοποίησης

του φλοιού με χωρική διακριτική ικανότητα μικρότερης του ενός δευτερολέπτου και με χρονική διακριτική ικανότητα ελαχίστων mm [5].

Επίσης, το εργαλείο fMRI (FunctionalMagneticResonanceImaging, Λειτουργική Απεικόνιση Μαγνητικού Συντονισμού) προφέρει μια μέθοδο, μέσω της οποίας πραγματοποιείται απεικόνιση μερών του εγκεφάλου τα οποία τίθενται σε λειτουργία μέσω κάποιου ερεθίσματος, όπως η παρακολούθηση κάποιου φιλμ σε καθορισμένη χρονική περίοδο. Η μαγνητική απεικόνιση δεν πρέπει να συγχέεται με την «ανατομική απεικόνιση». Η μαγνητική απεικόνιση προσφέρει δεδομένα για το βαθμό κατά τον οποίο ενεργοποιούνται τα διάφορα μέρη του εγκεφάλου σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή, ενώ, η ανατομική απεικόνιση δίνει πληροφορίες για τη δομή και τη μορφή του εγκεφάλου. Ωστόσο, το fMRI μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για λειτουργική απεικόνιση, όσο και για ανατομική, χάρη στις διαφορετικού τύπου μετρήσεις που επιτρέπει να υλοποιηθούν. Το fMRI «εκμεταλλεύεται» το γεγονός ότι οι μηχανισμοί σκέψης, οι αντιδράσεις, η ομιλία και γενικότερα οι νοητικές δραστηριότητες απαιτούν την ενεργοποίηση των νευρώνων [5].

1.2.5 Γενετικοί βιοδείκτες

Όσον αφορά στην πρόληψη για την AD σε άτομα που οι συγγενείς τους έχουν υπάρξει ασθενείς της νόσου, έχουν σχεδιαστεί κατάλληλα γενετικά τεστ που εξετάζουν την πιθανότητα να νοσήσουν και οι ίδιοι. Μια από τις πιο αναγνωρισμένες γενετικές μεταλλάξεις που αφορά την νευροεκφυλιστική νόσο του Αλτσχάιμερ είναι αυτή του πολυμορφισμού (φυσιολογική παραλλαγή) E4 του γονιδίου APOE. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη ενός αντιγράφου του E4 αυξάνει την πιθανότητα νόσησης 2-3 φορές, ενώ η ύπαρξη δυο αντιγράφων ισοδυναμεί με ρίσκο νόσησης 4-8 φορές παραπάνω. Σε κάποιες μορφές της AD που ευθύνονται κυρίως για την πρόωμη έναρξη της νόσου (μεταξύ 30 και 60 ετών), είναι χαρακτηριστική η ύπαρξη των μεταλλάξεων των γονιδίων της πρόδρομης αμυλοειδούς πρωτεΐνης (APP, AmyloidPrecursorProtein), της προσενιλίνης 1 (PSEN1, Presenilin-1) και της προσενιλίνης 2 (PSEN2, Presenilin-2) [5].

1.2.6 Διαγνωστικές εξετάσεις για τη νόσο

Όταν κάποιος πιθανός ασθενής διαπιστωθεί με γνωστική έκπτωση, ακολουθείται μια σειρά εξετάσεων αίματος για την παρακολούθηση παραγόντων που επηρεάζονται από τη νόσο. Οι εξετάσεις αυτές περιλαμβάνουν γενικές εξετάσεις αίματος, μέτρηση του επιπέδου της βιταμίνης B12 και έλεγχο των θυροειδικών ορμονών [5]. Φυσικά, ανάλογα με την κατάσταση του εκάστοτε ασθενή μπορεί να ζητηθούν και πιο ειδικές εξετάσεις.

Επόμενη κατηγορία εξετάσεων είναι οι απεικονιστικές. Μέσα από την διεξαγωγή τους, παρέχονται πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη μεταβολών του εγκεφάλου που να οδηγούν στην AD. Χαρακτηριστικά παραδείγματα απεικονιστικών εξετάσεων είναι η Αξονική τομογραφία (CT), η MRI τομογραφία κλπ.

Για να ληφθούν περισσότερα διαγνωστικά στοιχεία, συχνά πραγματοποιείται η εξέταση του σπινθηρογραφήματος αιματικής ροής και τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (SPECT, Single-Photon Emission Computed Tomography). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί ισότοπα που εκπέμπουν ποζιτρόνια συνδεδεμένα σε μόρια βιολογικού ενδιαφέροντος με στόχο την ποσοτική μελέτη ειδικών φυσιολογικών διεργασιών [5]. Η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το δυναμικό έλεγχο του εγκεφάλου, στο πλαίσιο παθήσεων όπως η νόσος του Αλτσχάιμερ. Τα τελευταία χρόνια, μάλιστα, έχουν ανακαλυφθεί νέα ραδιοφάρμακα για PET (Positron Emission Tomography) scans τα οποία συνδέονται με το β-αμυλοειδές και απεικονίζουν το φορτίο πλακών αμυλοειδούς στον εγκέφαλο. Ωστόσο, διευκρινίζεται πως ένα θετικό αποτέλεσμα PETscan δεν συνδέεται μονοσήμαντα με την νόσο AD, καθώς συχνά εντοπίζονται πλάκες αμυλοειδούς σε μεγάλο ποσοστό ασυμπτωματικών ατόμων (ειδικά όταν πρόκειται για πληθυσμό άνω των 65 ετών) [5].

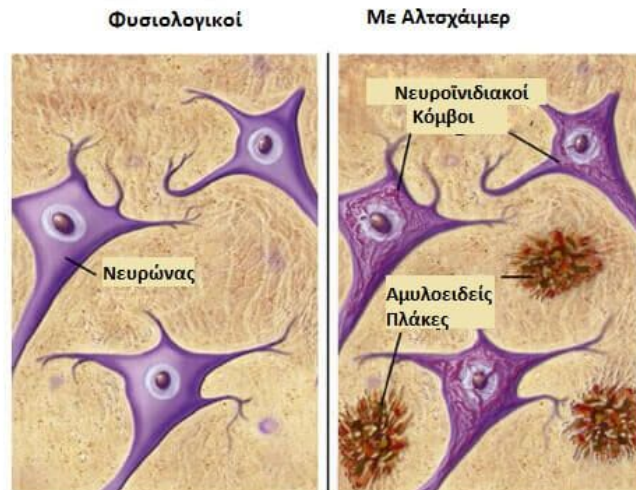
Επόμενη εξέταση είναι η Οσφυονωτιαία παρακέντηση, που πρόκειται για μια διαδικασία λήψης εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY). Η εξέταση αυτή υλοποιείται κυρίως στα πλαίσια διερεύνησης μια ταχέως εξελισσόμενης άνοιας ή όταν

πρόκειται για κάποια ασυνήθιστη αιτία. Όσον αφορά στη νόσο του Αλτσχάιμερ επισημαίνεται ότι το ENY δίνει τη δυνατότητα μέτρησης ειδικών μορίων που αυξάνουν την ακρίβεια της διάγνωσης [5].

Η τελευταία κατηγορία ειδικών εξετάσεων περιλαμβάνει τον γενετικό έλεγχο, όπου αξιολογούνται οι μεταλλάξεις σε κάποιο από τα γονίδια PSEN1, PSEN2 και APP που προκαλούν οικογενή νόσο Alzheimer, όπου σε αυτήν την περίπτωση η διάγνωση μπορεί να τεθεί με βεβαιότητα ύστερα από διεξαγωγή εξετάσεων αίματος. Η κατηγορία αυτή αποτελεί τη μοναδική έμπιστη εξέταση, η οποία, όμως, αφορά εξαιρετικά λίγες περιπτώσεις ασθενών [5].

1.2.7 Αιτιολογία της νόσου

Όπως αναφέρθηκε, η νόσος Alzheimer εμφανίζει διαφορετικά στάδια ανάπτυξης, στην πορεία των οποίων εμφανίζεται βαθιά απώλεια μνήμης και βλάβη του γνωστικού ελέγχου, σε ολοένα και μεγαλύτερο βαθμό. Μέχρι στιγμής, δεν είναι γνωστή η βασική αιτία της νόσου. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί βασικές χαρακτηριστικές δομές σε όλους τους ασθενείς με AD καθόλα τα στάδια της ασθένειας. Οι δομές αυτές είναι γνωστές ως «αμυλοειδείς πλάκες» και «νευροϊνιδιακοί κόμβοι» και σχηματίζονται σε συγκεκριμένα σημεία του εγκεφάλου (π.χ. υπόκαμπος, φλοιός κλπ) με αποτέλεσμα να δημιουργούνται φλεγμονές που καταστρέφουν τα νευρικά κύτταρα, δηλαδή οδηγούν στον εκφυλισμό αυτών. Οι αμυλοειδείς πλάκες μαζεύονται εξωτερικά των νευρικών κυττάρων, σε αντίθεση με τους νευροϊνιδιακούς κόμβους που συσσωρεύονται στο εσωτερικό τους [Εικόνα 2].



Εικόνα 2-Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά της νόσου AD σε σχέση με τη φυσιολογική κατάσταση

Το 1980 ανακαλύφθηκαν το β-αμυλοειδές (Aβ) και οι πρωτεΐνες ταυ ως στοιχεία των σχηματιζόμενων πλακών και των νευροϊνιδιακών κόμβων (NFTs, Neurofibrillary Tangles) αντίστοιχα, σε AD ασθενείς, όπως αναλύεται παρακάτω [6]. Έτσι, διατυπώθηκε για πρώτη φορά, η υπόθεση πως οι πλάκες β-αμυλοειδούς αποτελούν βασική αιτία για την ανάπτυξη της νόσου [7]. Την ίδια περίοδο, υπήρξαν αντίστοιχες μελέτες που έδειξαν ότι δεν υπάρχει τόσο ισχυρή συσχέτιση των πλακών αυτών με τη νοητική έκπτωση, όσο με τη συσσώρευση των πρωτεϊνών ταυ [8]. Ωστόσο, η συσσώρευση του Aβ προηγείται χρονικά κατά μεγάλο διάστημα σε σχέση με τις μεταβολές των NFTs [8].

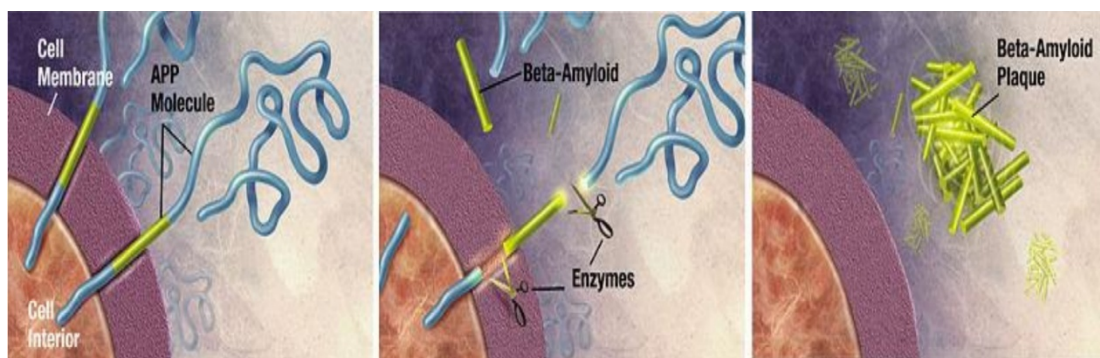
1.3 Σχηματισμός Aβ πεπτιδίου

Ο σχηματισμός αμυλοειδών πλακών είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο στον ανθρώπινο οργανισμό, το οποίο μάλιστα, ξεκινάει ήδη από την ηλικία των 20 ετών [8]. Συγκεκριμένα, στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχει η πρόδρομη αμυλοειδής πρωτεΐνη APP (*Amyloid Precursor Protein, APP*). Η πρωτεΐνη APP παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διευκόλυνση μιας σειράς βιολογικών δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της νευρωνικής ανάπτυξης, της σηματοδότησης και της ενδοκυτταρικής μεταφοράς στον εγκέφαλο [8]. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μετά τη

δράση κάποιων ενζύμων διασπάται και ακολουθεί δυο ξεχωριστά μονοπάτια, όπως εξηγείται παρακάτω.

Στην πρώτη περίπτωση, η οποία ονομάζεται «non-amyloidogenic pathway», η πρωτεΐνη APP διασπάται από το ένζυμο α -σεκρετάση και ύστερα από την γ -σεκρετάση δημιουργώντας διαλυτά N-τελικά τμήματα και συνεπώς δε σχηματίζονται αμυλοειδείς πλάκες. Ωστόσο, στο δεύτερο μονοπάτι, που ονομάζεται «amyloidogenic pathway» η πρωτεΐνη διασπάται από το ένζυμο β -σεκρετάση το οποίο δρα πιο κοντά στο N-τελικό της άκρο, και έπειτα δρα η γ -σεκρετάση. Αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι να απελευθερωθεί το πεπτίδιο της β -αμυλοειδούς πρωτεΐνης (38-42 αμινοξέα) το οποίο μετά την συσσώρευση του δημιουργεί τις αντίστοιχες αμυλοειδείς πλάκες [8] [Εικόνα 3].

Οι πλάκες που σχετίζονται με τη νόσο του AD συντίθενται κυρίως από το αμυλοειδές β -πεπτίδιο (amyloid β -peptide) [8]. Οι πρόδρομες πρωτεΐνες A β αποτελούνται από τα αμινοξέα 40 και 42 και παίρνουν την ονομασία A β 1-40 και A β 1-42, αντίστοιχα [8]. Σε ασθενείς με AD η συγκέντρωση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στο Εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) συναντάται σε χαμηλή συγκέντρωση.

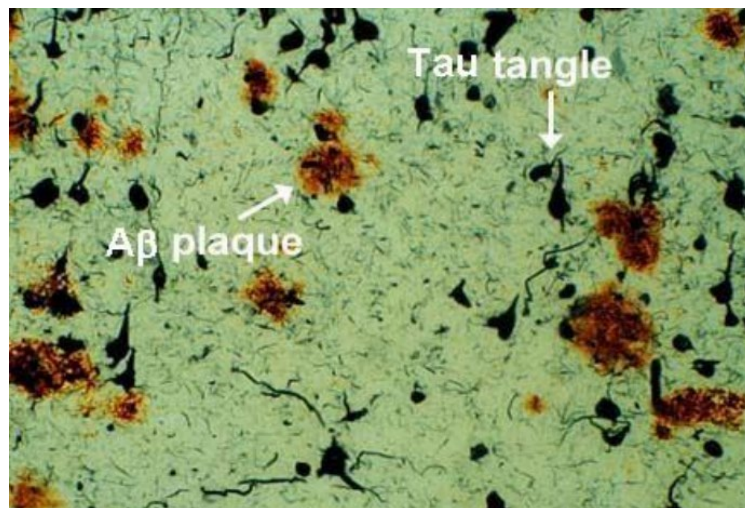


Εικόνα 3-Απεικόνιση της πρωτεΐνης APP, της διάσπασής της από τα ένζυμα και της τελικής συσσώρευσης αμυλοειδών πλακών

1.4 Σχηματισμός της πρωτεΐνης tau

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα νευροϊνιδιακά πλέγματα σχηματίζονται στο εσωτερικό των νευρώνων [Εικόνα 4]. Πιο αναλυτικά, στο εσωτερικό των νευραξόνων υπάρχουν κυτταροσκελετικές δομές, γνωστές ως μικροσωληνίσκοι,

όπου πάνω τους είναι προσκολλημένη η πρωτεΐνη tau. Σε φυσιολογική κατάσταση η πρωτεΐνη αυτή ενισχύει την ώση του νευρικού σήματος όπως, επίσης, και μεταφέρει θρεπτικά συστατικά σε όλο το μήκος του νευρικού κυττάρου, μέσω του νευράξονα [9]. Όμως, η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau από κάποια φωσφορική κινάση έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των tau-νευροϊνιδιακών κόμβων. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι να καταστρέφονται οι μικροσωληνίσκοι των νευραξόνων και συνεπώς να μη μεταφέρεται ούτε το ηλεκτρικό σήμα ούτε τα θρεπτικά συστατικά στον εγκέφαλο [9]. Έτσι, προκύπτει τελικά η νευρική απόπτωση. Όσον αφορά στην έκφραση της πρωτεΐνης σε ασθενείς με AD καταγράφεται σε αυξημένο επίπεδο συγκέντρωσης σε ό,τι αφορά την total-tau (t-tau) και την φωσφορυλιωμένη tau (p-tau).



Εικόνα 4-Ιστολογική εικόνα στη νόσο AD: αμυλοειδείς πλάκες και νευροϊνιδιακά συμπλέγματα

2 Προσδιορισμός κατάλληλου Βιοδείκτη για την ανίχνευση της νόσου του Alzheimer στο δακρυϊκό δείγμα

2.1 Βιοδείκτες

Βιοδείκτης ονομάζεται μια μεγάλη υποκατηγορία ιατρικών σημάτων, δηλαδή αντικειμενικών ενδείξεων, που αφορούν την ιατρική κατάσταση ενός ασθενή, οι οποίες μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια [10]. Διευκρινίζεται πως τα ιατρικά σήματα δε συνάδουν με τα συμπτώματα, όπου τότε γίνεται αναφορά στις ενδείξεις υγείας ή ασθένειας από τους ίδιους τους ασθενείς. Το 1998, το Εθνικό Ινστιτούτο Ορισμών για τους Βιοδείκτες υγείας (*National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group*) όρισε τον βιοδείκτη ως «ένα χαρακτηριστικό το οποίο μπορεί να μετρηθεί αντικειμενικά και να αξιολογηθεί ως ένας δείκτης φυσιολογικών ή παθολογικών βιολογικών διεργασιών ή φαρμακολογικών αποκρίσεων σε μια θεραπευτική παρέμβαση» [10]. Σύμφωνα με έναν ορισμό που δόθηκε στο Διεθνές Πρόγραμμα για τη Χημική Ασφάλεια (*International Programme on Chemical Safety*) με επικεφαλής τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) σε συνεργασία με τα Ηνωμένα Έθνη και το Διεθνή Οργανισμό Εργασίας Βιοδείκτης είναι «οποιαδήποτε ουσία, δομή ή διαδικασία που μπορεί να μετρηθεί στο σώμα ή στα παράγωγα του, η οποία μπορεί να επηρεάσει ή να προβλέψει την επίπτωση έκβασης ή ασθένειας» [10].

Μερικά παραδείγματα βιοδεικτών είναι ο καρδιακός παλμός, η αρτηριακή πίεση, διάφορες πρωτεΐνες και εν γένει διάφορες ουσίες που μπορούν να εντοπιστούν ακόμα και σε εξειδικευμένες εξετάσεις αίματος.

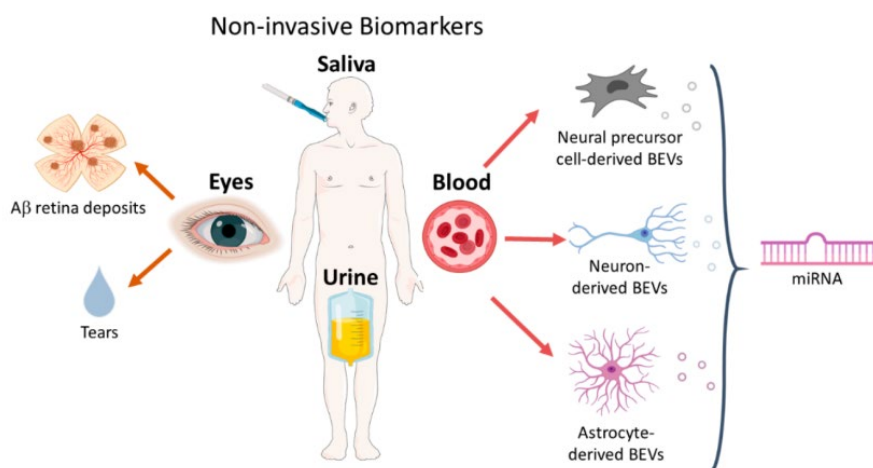
Βέβαια, για να θεωρείται μια ουσία ή μια δομή ως κατάλληλος βιοδείκτης δεν αρκεί απλώς να εμφανίζεται τροποποιημένη σε μια ασθένεια αφού πρέπει να συγκεντρώνει ορισμένα χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, ο βιοδείκτης θα πρέπει να ικανοποιεί τα παρακάτω χαρακτηριστικά [11].

1. Να είναι δυνατή η μέτρηση του με έμπιστες και πιστοποιημένες μεθόδους
2. Να παρουσιάζει υψηλό βαθμό ευαισθησίας και ειδικότητας: θα πρέπει ο βιοδείκτης να συνδέεται μονοσήμαντα με την προς μελέτη, νόσο. Οι ουσίες που παρατηρούνται τροποποιημένες σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, δεν είναι κατάλληλοι βιοδείκτης αφού προκαλούν σύγχυση ως προς το κλινικό καταληκτικό σημείο ενδιαφέροντος.
3. Να είναι αναπαραγώγιμος, δηλαδή να αφορά το σύνολο ή έστω ένα μεγάλο ποσοστό του συνόλου των ασθενών της συγκεκριμένης νόσου.
4. Η ευαισθησία ενός ιδανικού βιοδείκτη που θα διαγιγνώσκει την νόσο AD θεωρείται πως πρέπει να είναι περί του 85% ενώ η ειδικότητα σε σχέση με άλλες νόσους θα πρέπει να είναι περί του 75% [12].

2.2 Οφέλη δακρυϊκού υγρού

Η αναζήτηση κατάλληλου βιοδείκτη για την AD φέρνει σε προτεραιότητα το καθορισμό του δείγματος από το οποίο πρόκειται να εξαχθεί ο βιοδείκτης. Εστιάζοντας στα βιολογικά υγρά, το αίμα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) αποτελούν την πιο συνηθισμένη πηγή βιοδεικτών αφού τις περισσότερες φορές η συγκέντρωσή των συστατικών τους επηρεάζεται από οποιαδήποτε ασθένεια. Ωστόσο, και στις δυο αυτές περιπτώσεις πρόκειται για επίπονες διαδικασίες επιβαρύνοντας έτσι τους ασθενείς και, γενικότερα, το σύστημα υγείας [13].

Οι πρόσφατες μελέτες στρέφουν το ενδιαφέρον τους σε όχι τόσο διαδεδομένα φυσιολογικά υγρά, όπως τα δάκρυα, ο ιδρώτας, η σίελος και τα ούρα [Εικόνα 5] [13]. Η πιο ενδιαφέρουσα περίπτωση από αυτές που προαναφέρθηκαν είναι το δακρυϊκό υγρό εξαιτίας του εύκολου τρόπου που μπορεί να συλλεχθεί καθώς και τη συσχέτιση του με το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες που εκφράζονται στο ΕΝΥ, εντοπίζονται και στα δάκρυα [13]. Στην παρούσα εργασία επιλέγεται το δακρυϊκό υγρό ως το υπό εξέταση έτσι ώστε να γίνεται, αδιαμφισβήτητα, ολόκληρη τη διαδικασία πιο προσιτή στους ασθενείς αφού πρόκειται για μη επεμβατική και λιγότερο επίπονη διαδικασία. Επιπλέον, με τη χρήση των δακρύων, μειώνεται το ρίσκο και το κόστος ολόκληρης της διαδικασίας.



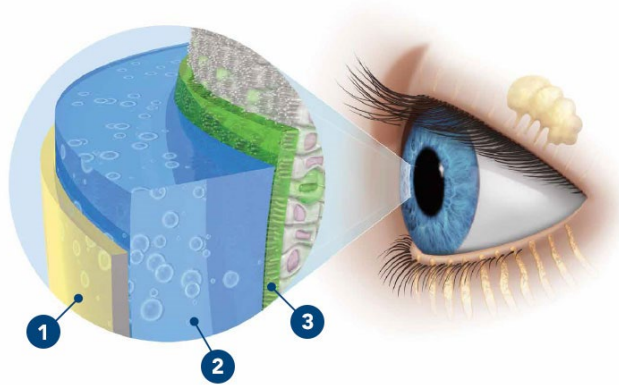
Εικόνα 5-Σχηματική αναπαράσταση των μη επεμβατικώνβιοδεικτών στα φυσιολογικά υγρά: δάκρυα, οπτικοί αδένες, σίελος, ούρα και αίμα

2.2.1 Δακρυϊκό υγρό

Μέχρι σήμερα, το δακρυϊκό υγρό έχει κατηγοριοποιηθεί σε τέσσερις τύπους δακρύων: τα βασικά δάκρυα, τα αντανακλαστικά δάκρυα, τα συναισθηματικά δάκρυα και τα δάκρυα κλειστού οφθαλμού [14]. Η πρώτη κατηγορία, τα βασικά δάκρυα διατηρούν συνεχώς υγρό τον κερατοειδή του οφθαλμού χωρίς να απαιτούν κάποια διέγερση για την εμφάνιση τους [14]. Η δεύτερη κατηγορία, τα αντανακλαστικά δάκρυα, συνήθως, προκαλούνται μέσω ενός αντανακλαστικού

μηχανισμού ο οποίος πυροδοτείται από τη διέγερση των αισθητήριων νεύρων του οφθαλμού, τα σώματα των οποίων βρίσκονται στο γάγγλιο του τρίδμου νεύρου. Το τρίδυμο νεύρο αποτελεί το πέμπτο νεύρο στην περιοχή του κρανίου και είναι υπεύθυνο για τη νεύρωση του μεγαλύτερου μέρους του προσώπου. Εν προκειμένω, τα νεύρα αυτά προβάλλονται σε κέντρα του εγκεφάλου τα οποία είναι υπεύθυνα για την δακρύρροια (ανώτερος σιελογόνος πυρήνας) και το ανοιγοκλείσιμο των ματιών (κινητήριο προσώπου) [14]. Η επόμενη κατηγορία, τα συναισθηματικά (ή ψυχικά) δάκρυα, όπως και τα αντανακλαστικά δάκρυα, προϋποθέτουν τη διέγερση του δακρυϊκού αδένα, όμως, στην περίπτωση αυτή, η νευρική είσοδος θεωρείται πως προέρχεται από τα συναισθηματικά κέντρα του εγκεφάλου. Τέλος, τα δάκρυα των κλειστών οφθαλμών αφορούν στα δάκρυα που συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια του ύπνου και έχουν ιδιαίτερη σημασία για την απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων καθώς και για τη διατήρηση της ομοιόστασης [14].

Αναφορικά με τη δομή τους, τα δάκρυα αποτελούνται εξωτερικά από ένα υδρόφοβο στρώμα λιπιδίων, ώστε να προστατεύονται από την εξάτμιση. Επίσης, διαθέτουν ένα ενδιάμεσο υδατικό στρώμα, υπεύθυνο για τη μεταφορά διάφορων θρεπτικών ουσιών στον κερατοειδή του οφθαλμού. Στο στρώμα αυτό εμπεριέχονται επίσης διάφορες πρωτεΐνες και ηλεκτρολύτες, δηλαδή, στην περιοχή αυτή εντοπίζονται πρακτικά και οι πιθανοί βιοδείκτες. Τέλος, τα δάκρυα διαθέτουν ένα βλεννώδες εσωτερικό στρώμα το οποίο εξομαλύνει την κατανομή του υδατικού στρώματος στον οφθαλμό [Εικόνα 6] [15]. Σύμφωνα με αναλύσεις του ανθρώπινου δακρυϊκού υγρού, στα δάκρυα υπάρχουν κοντά στις 1500 πρωτεΐνες, 100 μικρά μόρια μεταβολισμού και 150 είδη λιπιδίων από έξι διαφορετικές κατηγορίες. Επιπλέον, υπάρχει μια μεγάλη ποσότητα νουκλεϊκών οξέων συμπεριλαμβανομένων των miRNAs, καθιστώντας, έτσι, τα δάκρυα ένα εξαιρετικό δείγμα για την ανακάλυψη βιοδεικτών [16].



Εικόνα 6- Η δομή των δακρύων: 1) Εξωτερικό υδρόφοβο στρώμα λιπιδίων, 2) Ενδιάμεσο υδατικό στρώμα, 3) Βλεννώδες εσωτερικό στρώμα

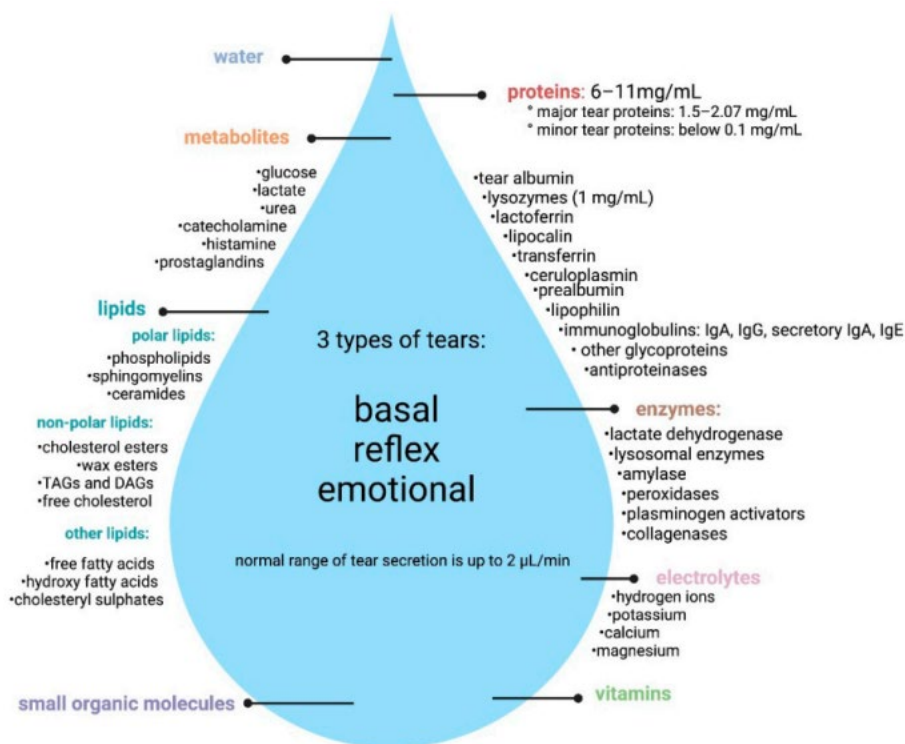
2.2.2 Σύσταση δακρύων

Όπως εξηγήθηκε παραπάνω, οι τέσσερις τύποι δακρύων συμμετέχουν σε διαφορετική μονάδα του δακρυϊκού αδένου με αποτέλεσμα η κάθε κατηγορία να έχει διαφορετική σύσταση. Η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα ανθρώπινα δάκρυα κυμαίνεται από 6 έως 11mg/ml, με τη λυσοζύμη να εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό, με συγκέντρωση περί του 1 mg/ml [14]. Επισημαίνεται, επίσης, ότι πέρα από πρωτεΐνες, τα δάκρυα αποτελούνται και από έναν μεγάλο αριθμό λιπιδίων, ηλεκτρολυτών, βιταμινών κλπ.

Συγκρίνοντας την περίπτωση των βασικών και των αντανάκλαστικών δακρύων, η διαφορά στη σύνθεσή τους οφείλεται στη συμμετοχή διαφορετικών υποδοχέων τόσο στα αισθητήρια νεύρα του κερατοειδούς όσο και στη ρύθμιση του δακρυϊκού αδένου ενώ τα συναισθηματικά δάκρυα διαφέρουν ως προς τις υπόλοιπες κατηγορίες λόγω του ότι περιέχουν διακριτά χημειο-σήματα (π.χ. φερομόνες). Αναφορικά με τα δάκρυα κλειστού οφθαλμού σημειώνεται πως έχει μειωμένο ρυθμό ανακύκλωσης δακρύων σε σχέση με τις άλλες τρεις κατηγορίες, γεγονός που επηρεάζει και τη σύστασή τους [16].

Αναλυτικότερα, στο δακρυϊκό υγρό των υγιών ανθρώπων, εντοπίζεται μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών εκ των οποίων, οι κύριες από αυτές εκκρίνονται από τον δακρυϊκό αδένου, τη δακρυϊκή λιποκαλίνη, τα λυσοσώματα και τον ορό, που

ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα της παθητικής μεταφοράς από το αίμα. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που εντοπίζονται, περιλαμβάνονται επίσης και αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, μεταλλοπρωτεΐνες μήτρας, ανοσοσφαιρίνες, ορμόνες φύλου, πρωτεάσεις και αναστολείς πρωτεάσης, πρωτεΐνες δέσμευσης ασβεστίου καθώς και γλυκοπρωτεΐνες [16]. Αναφορικά με τα λιπίδια του εξωτερικού στρώματος των δακρύων, το οποίο δρα ως διεπαφή μεταξύ της υδατικής στιβάδας και του αέρα, αποτελείται από διάφορους τύπους λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων των εστέρων χοληστερόλης (CE), κεριού (WE) και της τριακυλογλυκερόλης (TAG). Τέλος, πέραν από τις πρωτεΐνες, στο δακρυϊκό υγρό κυκλοφορούντα microRNAs (ciRNA) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα κύρια συστατικά των δακρύων [Εικόνα 7] [16].



Εικόνα 7- Σύσταση δακρυϊκού υγρού

2.3 Μέθοδοι συλλογής δακρυϊκού υγρού

Η σύσταση των δακρύων δίνει πολύτιμες πληροφορίες όχι μόνο για την υγεία των οφθαλμών αλλά και για τη σωστή λειτουργία ολόκληρου του σώματος. Έτσι, με

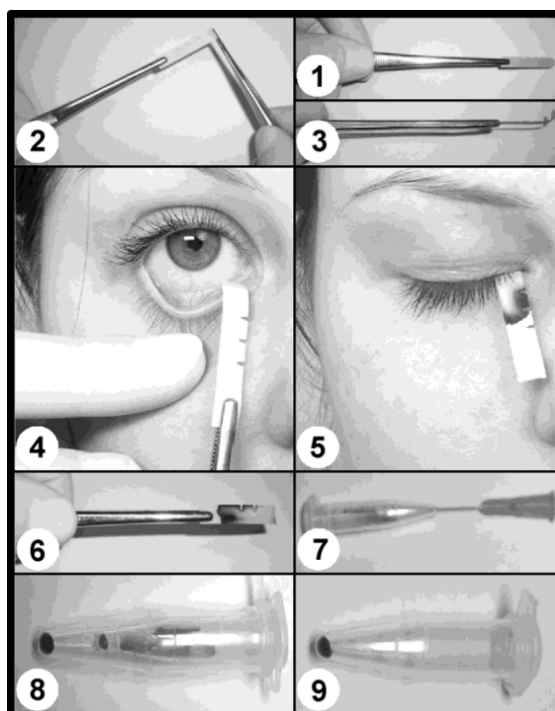
κατάλληλη αξιοποίηση, το δακρυϊκό υγρό μπορεί να είναι ένα ακόμα εργαλείο για την παρακολούθηση της υγείας, τον εντοπισμό ασθενειών ή και να αποτελέσει πηγή δεικτών ασθενείας. Επιπλέον, βασικό πλεονέκτημα είναι ότι η συλλογή του γίνεται με πιο ανώδυνο τρόπο[16]. Πιο συγκεκριμένα, σε πρόσφατη μελέτη όπου διερευνήθηκε η γνώμη 383 ασθενών σχετικά με την συλλογή αίματος μέσω προκοιλιακής φλεβικής παρακέντησης και τεστ δακτύλου σε σύγκριση με τη συλλογή δακρύων με Schirmer test, συμπληρώνοντας ένα ερωτηματολόγιο για την αξιολόγηση του πόνου στην κλίμακα του 0-10, παρατηρήθηκε ότι το 74% του πληθυσμού προτιμάει να δίνει δάκρυα έναντι των άλλων πρακτικών, επιβεβαιώνοντας ότι πρόκειται για μια μέθοδο πολύ προσιτή, που μπορεί να αξιοποιηθεί για την παρακολούθηση της υγείας των ασθενών, ειδικά όταν βρίσκονται σε πρωταρχικό στάδιο [17].

Ωστόσο, υπάρχουν δυο διαδεδομένες μέθοδοι για τη συλλογή του δακρυϊκού δείγματος, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω.

2.3.1 Schirmer test

Η πρώτη μέθοδος είναι αυτή του Schirmertest, όπου χρησιμοποιούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες του Schirmer. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τον γερμανό οφθαλμίατρο OttoSchirmer (1864-1918)[18]. Οι ταινίες που χρησιμοποιούνται είναι μικρές βαθμονομημένες λωρίδες πορώδους χαρτιού που συνήθως αξιοποιούνται κλινικά για τη μέτρηση της ροής των δακρύων. Η λωρίδα του διηθητικού αυτού χαρτιού τοποθετείται στον κάτω σάκο του επιπεφυκότα, σε άμεση επαφή με τον επιπεφυκότα, έτσι ώστε να απορροφηθεί το δακρυϊκό υγρό [Εικόνα 8][18]. Στην πράξη, αφού πραγματοποιηθεί το Schirmertest, η εκάστοτε λωρίδα μεταφέρεται σε έναν τρυπημένο σωλήνα με κάνουλα περί των 0.5 ml, ο οποίος στη συνέχεια τοποθετείται σε έναν μεγαλύτερο, περί των 1.5ml. Για τη μετατροπή σε υγρή μορφή προτείνεται η φυγοκέντρηση του σωλήνα αυτού, με μέγιστη τιμή αυτή των 13.000 ΣΑΛ και αντίστοιχο χρόνο, τα 5 λεπτά. Ο λόγος που προτείνεται αυτή η διαδικασία είναι ότι η φυγοκεντρική δύναμη «τραβάει» το

δακρυϊκό υγρό έξω από τη λωρίδα Schirmer, μέσω του κεντρικού «πόρου» και το μεταφέρει στο κάτω μέρος του μικρότερου σωλήνα και στον εξωτερικό σωλήνα των 1.5 ml. Ωστόσο, σημειώνεται πως η εφαρμογή των ταινιών Schirmer στο μάτι μπορεί να προκαλέσει, προσωρινά, ήπια ενόχληση.



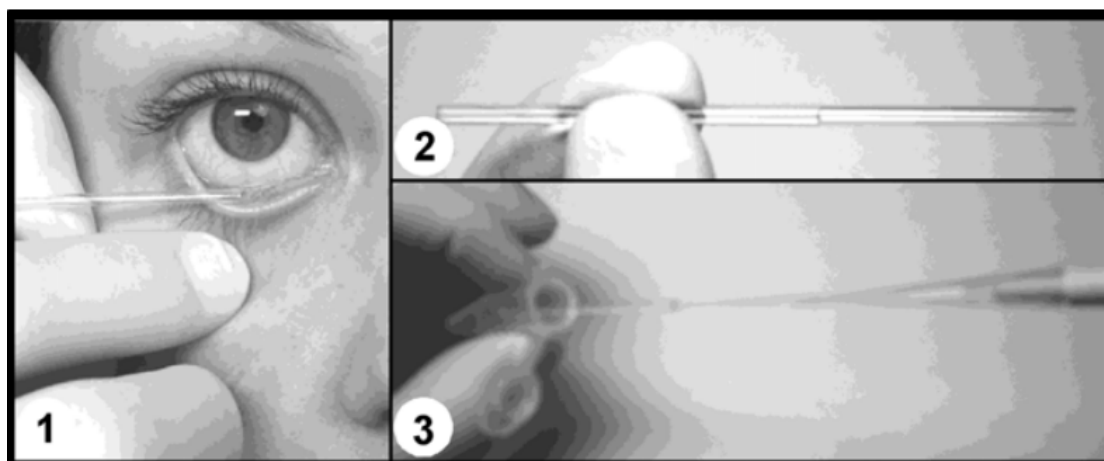
Εικόνα 8- Τεχνική Schirmertest για την συλλογή του δακρυϊκού υγρού

Σχετικά με την ποσότητα δακρύων που μπορεί να συλλεχθεί με την εφαρμογή της μεθόδου αυτής, σε πρόσφατη μελέτη, βρέθηκε ότι με χρήση λωρίδων Schirmer μήκους 20 mm δεσμεύεται δακρυϊκό υγρό, μέσου βάρους 13mg. Στη συνέχεια, η ποσότητα αυτή αφού φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 ΣΑΛ, έμεινε η ποσότητα των 10 mg στον σωλήνα που χρησιμοποιήθηκε. Δεδομένου ότι η πυκνότητα του δακρυϊκού υγρού είναι 1.005g/μl, συνεπάγεται ότι από κάθε λωρίδα Schirmer μπορούν να εξαχθούν 10μL[19].

2.3.2 Τριχοειδείς σωλήνες

Ένας δεύτερος τρόπος για τη συλλογή του δείγματος δακρύων είναι η χρήση κοίλων κυλινδρικών σωλήνων, κατασκευασμένων είτε από γυαλί είτε από πλαστικό μικροτριχοειδών [14]. Για την ανάκτηση του δακρυϊκού δείγματος χρησιμοποιείται ένας τριχοειδής σωλήνας μέσω μιας πιπέτας (περί των 200μl) το άκρο της οποίας

συγκρατείται στο άκρο τους σωλήνα [18]. Η πιπέτα αυτή εισέρχεται οριζοντίως στον σάκο του επιπεφυκότα σε μια σχετικά πλάγια θέση, όπως φαίνεται στην εικόνα[Εικόνα 9]. Στη συνέχεια το δείγμα που συλλέγεται, προτείνεται να μεταφερθεί σε ένα σωλήνα των 1.5 ml, «φυσώντας» έξω το περιεχόμενο του τριχοειδούς σωλήνα. Το βασικό πλεονέκτημα της δεύτερης μεθόδου έναντι της πρώτης, είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα συλλογής μεγαλύτερου όγκου δείγματος [18]. Όμως, η διαδικασία με σωλήνες χρειάζεται να υλοποιείται από έμπειρο προσωπικό καθώς απαιτείται να αποφεύγεται η επαφή του τριχοειδούς με τα βλέφαρα και την οφθαλμική επιφάνεια. Σαφώς, η μέθοδος των ταινιών Schirmer είναι πιο ανεκτή για τους ασθενείς, ωστόσο, υπάρχει κίνδυνος να προκληθεί μόλυνση στα επιθηλιακά κύτταρα του εκάστοτε εξεταζόμενου[14].



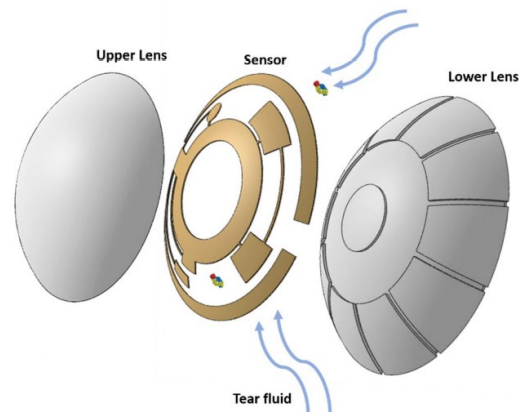
Εικόνα 9- Τεχνική τριχοειδών σωλήνων για τη συλλογή του δακρυϊκού υγρού

Κατά τη συλλογή του δακρυϊκού δείγματος, ανεξάρτητα από τη μέθοδο που επιλέγεται, πρέπει να ακολουθηθεί μια συγκεκριμένη διαδικασία όσον αφορά στην αποθήκευση του δείγματος. Συγκεκριμένα, αφού συλλεχθεί το δείγμα, θα πρέπει να μεταφερθεί σε έναν σωλήνα, τύπου Eppendorf. Οι σωλήνες τύπου Eppendorf είναι σωλήνες μίας χρήσης κατασκευασμένοι από πολυπροπυλένιο και η χρήση τους προορίζεται για την προετοιμασία, την ανάμιξη, την φυγοκέντρηση, τη μεταφορά και την αποθήκευση στερεών και υγρών δειγμάτων και αντιδραστηρίων. Επίσης, για την αποθήκευση και τη συντήρηση του δακρυϊκού δείγματος πέρα από τη χρήση

των Errendorf σωλήνων προτείνεται η φύλαξη τους στη θερμοκρασία των -20°C [18].

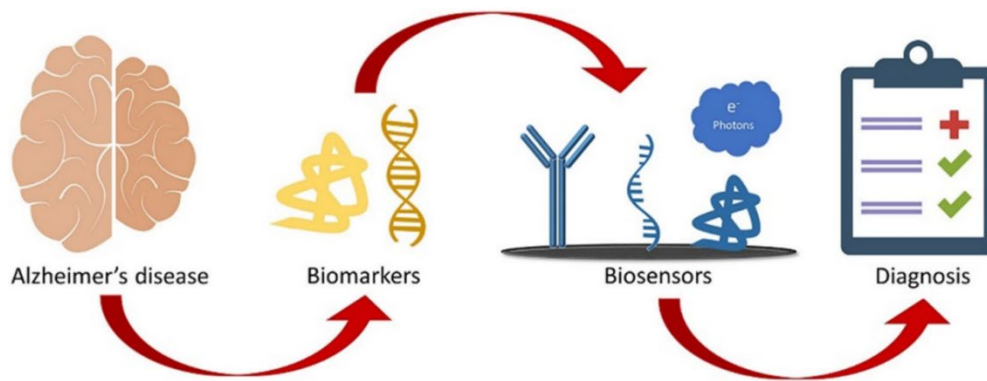
2.3.3 Φακοί επαφής

Μια ακόμη μέθοδος για την εξέταση του δακρυϊκού υγρού είναι η χρήση βιοαισθητήρων και φακών επαφής[Εικόνα 10]. Η μέθοδος αυτή προσφέρει έναν εναλλακτικό, μη επεμβατικό, ανώδυνο και οικονομικό τρόπο έναντι των πρακτικών που επικρατούν [20]. Επίσης, η πρακτική αυτή, είναι αρκετά καινοτόμα για την παρακολούθηση των αντίστοιχων βιοδεικτών που εκφράζονται στα δάκρυα, σε περιπτώσεις όπου η συγκέντρωσή τους επηρεάζεται από την πάροδο του χρόνου ή την επίδραση φαρμάκων (π.χ. παρακολούθηση της γλυκόζης στο διαβήτη) [20].



Εικόνα 10- Σχηματική αναπαράσταση αισθητήρων σε φακούς επαφής

2.4 Βιοδείκτες στοδακρυϊκό υγρό



Εικόνα 11- Σχηματική αναπαράσταση βιοαισθητήρα ανίχνευσης βιοδεικτών της AD

Όσον αφορά στους βιοδείκτες στα δάκρυα, για τον εντοπισμό της AD, υπάρχουν τέσσερις σχετικές κατηγορίες, οι οποίες εξηγούνται παρακάτω [Εικόνα 11]. Η πρώτη περίπτωση αφορά το πεπτίδιο Αβ-42 καθώς και των δομικών σχηματισμών του που εκφράζονται στα δάκρυα. Η επόμενη περίπτωση σχετίζεται με την πρωτεΐνη ταυ και κυρίως με την υπερφωσφορυλιωμένη έκφρασή της [21]. Η τρίτη περίπτωση αφορά μια προτεομική μέθοδο κατά την οποία στο δακρυϊκό υγρό των ασθενών της AD εμφανίζουν συγκεκριμένη συμπεριφορά σε τέσσερις πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, πρόκειται για τις πρωτεΐνες λιποκαλίνη-1, λυσοζύμη, λακτριτίνη και δερμικιδίνη [22]. Στην τρίτη περίπτωση, οι νοσούντες της AD εμφανίζουν αυξημένο το microRNA-200b-5p, γεγονός που το καθιστά τον πιο υποσχόμενο βιοδείκτη σε αυτήν την κατηγορία [23].

2.4.1 Το Αβ πεπτίδιο ως πιθανός βιοδείκτης της AD στα δάκρυα

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η APP είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται σε αφθονία στα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου, η οποία διασπάται μετά την δράση ορισμένων ενζύμων. Συγκεκριμένα, η β-σεκρετάση διασπάται στο καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να σχηματίζεται το καρβοξυτελικό τμήμα της. Η επόμενη διάσπαση προκαλείται από τη δράση του ενζύμου γ-σεκρετάση όπου σε αυτό το σημείο, αποδίδεται ένα πεπτιδικό θραύσμα με μήκος 39-43 αμινοξέα. Τα θραύσματα αυτά ονομάζονται πεπτίδια β-αμυλοειδούς (Αβ) και από αυτά, το Αβ-40 και το Αβ-42 βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Βασική διαφορά μεταξύ των δυο είναι ότι το Αβ-42 μπορεί να αποσυντεθεί ευκολότερα από

το Αβ-40. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα το Αβ-42 να συσσωματώνεται στο αντίστοιχο ολιγομερές πεπτιδίο και εν συνεχεία να σχηματίζονται αμυλοειδείς πλάκες στον εγκέφαλο προκαλώντας νευρωνικό θάνατο. Έτσι λοιπόν, το Αβ-42 είναι άμεσα συνδεδεμένο με την νόσο του Αλτσχάιμερ. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι η παραγωγή του Αβ πεπτιδίου σχετίζεται με την υπερφωσφορυλίωση της ταυ πρωτεΐνης (p-tau), η οποία αποτελεί επίσης κυρίαρχο βιοδείκτη για τη νόσο, όπως αναλύεται παρακάτω.

Η συγκέντρωση του Αβ πεπτιδίου και της ταυ πρωτεΐνης στο ΕΝΥ αποτελούν διαγνωστικές παραμέτρους για τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση του Αβ-40 στο ΕΝΥ των ασθενών της AD δεν διαφέρει από αυτήν των υγιών μαρτύρων, όμως, έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση κατά την αντίστοιχη σύγκριση του λόγου Αβ-42 ως προς το Αβ-40. Ο λόγος Αβ-42 προς Αβ-40 είναι πιο αξιόπιστος σε σχέση με το μεμονωμένο Αβ-42 καθώς αντισταθμίζει τις διαφορές στα επίπεδα των πεπτιδίων. Αναφορικά με την τιμή του λόγου, στους υγιείς μάρτυρες είναι 9:1 ενώ στους ασθενείς της νόσου, εξαιτίας της συσσώρευσης του Αβ-42, ο λόγος πλησιάζει την τιμή 1:1 [19].

Το οπτικό νεύρο είναι ένα από τα 12 ζευγάρια των κρανιακών νεύρων και ως εκ τούτου οι αλλαγές στον οφθαλμό αντανακλούν τις αλλαγές που συμβαίνουν στον εγκέφαλο. Έτσι, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με τους βιοδείκτες της AD, συμπεριλαμβανομένων των οπτικών αλλαγών, των οφθαλμικών κινήσεων, των αποκρίσεων της κόρης, των οφθαλμικών εικόνων και των βιοχημικών αλλαγών στα οφθαλμικά υγρά. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να δώσουν πολύτιμες πληροφορίες και να αξιοποιηθούν σχετικά με την πρόωμη ανίχνευση της AD. Ήδη έχουν καταγραφεί μελέτες σχετικά με τα επίπεδα του Αβ στον φακό και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού [19].

Επιπλέον, στην ίδια έρευνα, όπου πήραν μέρος 50 συμμετέχοντες ηλικίας 20 έως 79 ετών, μελετώντας τα επίπεδα του Αβ στα δάκρυα και στο αίμα τους, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του Αβ είναι μεγαλύτερη όταν πρόκειται για νεαρά, υγιή άτομα ανεξάρτητα από το δείγμα μέτρησης. Η παρατήρηση αυτή, αποδεικνύει ότι η

μεταφορά του Αβ από τους περιφερειακούς ιστούς προς το κεντρικό νευρικό σύστημα συμβαίνει σε όλους τους ανθρώπους ανεξάρτητα από το αν πάσχουν ή όχι από τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Ένα ακόμα συμπέρασμα της ίδιας μελέτης είναι ότι η συγκέντρωση του Αβ στα δάκρυα (10 pg/ml) είναι 10 φορές μεγαλύτερη απ' ό,τι στο αίμα (1pg/ml). Έτσι, φαίνεται ότι τα δάκρυα αποτελούν ιδανικό δείγμα για την πρώιμη ανίχνευση της νόσου του Αλτσχάιμερ [19].

Σε επόμενη μελέτη, όπου οι συμμετέχοντες χωρίζονταν σε δυο κατηγορίες, σε όσους είχαν ιστορικό της νόσου Alzheimer και σε όσους δεν είχαν, ερευνήθηκε το επίπεδο του Αβ-42 στα δάκρυα. Έτσι, προέκυψε ότι τα δείγματα των συμμετεχόντων με ιστορικό AD είναι συγκρίσιμα με θετικό μάρτυρα, ενώ, τα δείγματα των συμμετεχόντων της δεύτερης ομάδας, βρέθηκαν συγκρίσιμα με αρνητικό μάρτυρα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η ύπαρξη των πλακών στον αμφιβληστροειδή χιτώνα συνδέεται με την ύπαρξη υπολειμμάτων Αβ-42 στα δάκρυα και αντιστρόφως, όπως, επίσης και ότι η ύπαρξη των υπολειμμάτων δε συνδέεται με την εμφάνιση συμπτωμάτων στους ασθενείς. Τελικό συμπέρασμα της μελέτης είναι ότι τα υπολείμματα του Αβ-42 μπορούν να έχουν προγνωστική αξία για την ανίχνευση της νόσου του Αλτσχάιμερ [24].

Μια ακόμη ερευνητική εργασία με 65 συμμετέχοντες εκ των οποίων οι 9 ήταν υγιείς μάρτυρες και οι 56 ασθενείς διάφορων τύπων άνοιας (23 ασθενείς με υποκειμενική γνωστική διαταραχή – Subjective Cognitive Disorder/SCD, 22 ασθενείς με ήπια γνωστική διαταραχή - Mild Cognitive Impairment/MCI και 11 ασθενείς με άνοια) μελέτησαν τρία πεπτίδια του Αβ (Αβ-40, Αβ-42, Αβ-38) καθώς και τις πρωτεΐνες p-tau και t-tau στο δακρυϊκό υγρό ώστε να ελεγχθούν ως πιθανοί βιοδείκτες. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι το πεπτίδιο Αβ-40, όπως και η πρωτεΐνη t-tau, ήταν ανιχνεύσιμη σε ποσοστό μεγαλύτερο του 94% των συνολικών συμμετεχόντων, ενώ, τα πεπτίδια Αβ-38 και Αβ-42 και πρωτεΐνη p-tau βρέθηκαν σε ποσοστό μικρότερο του 23%. Ενδιαφέρον, βέβαια, παρουσιάζει το γεγονός ότι η πρωτεΐνη p-tau δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα των υγιών μαρτύρων. Επίσης, σημειώθηκε ότι το Αβ-42 είναι πιο ανιχνεύσιμο στους υγιείς μάρτυρες (78%) σε σχέση με τους ασθενείς (<18%) [25].

Σύμφωνα με την αναφορά [21] όπου σε μια μελέτη με 69 συμμετέχοντες, εκ των οποίων οι 9 ήταν υγιείς μάρτυρες και οι 60 ήταν ασθενείς από διάφορα στάδια της άνοιας, έγινε σύγκριση των δειγμάτων δακρύων και ENY σε σχέση με τη συγκέντρωσή τους στα πεπτίδια Αβ-38, Αβ-40 και Αβ-42 καθώς και στις πρωτεΐνες τ-ταυ και ρ-ταυ από την οποία εξάγονται τα εξής αποτελέσματα [21].

- Τα πεπτίδια Αβ40 και Αβ42 και η πρωτεΐνη τ-ταυ είναι ανιχνεύσιμα ενώ το Αβ38 και η ρ-ταυ εντοπίζονται μόνο στα μισά δείγματα δακρύων.
- Η πρωτεΐνη ρ-ταυ ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 46% (32/69). Σημειώνεται όμως ότι δεν ανιχνεύτηκε στα δείγματα δακρύων των μαρτύρων.
- Τα πεπτίδια Αβ40 και Αβ42 είναι ανιχνεύσιμα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% στα δακρυϊκά δείγματα.
- Η πρωτεΐνη τ-ταυ εντοπίζεται με ποσοστό 86% , όμως, με παρόμοια συγκέντρωση σε ασθενείς διάφορων νευροεκφυλιστικών νόσων με ψηλότερη τιμή από αυτήν των μαρτύρων.

Με βάση τα παραπάνω συμπεράσματα φαίνεται πως η πρωτεΐνη ρ-ταυ₁₈₁ είναι πολύ ασφαλής επιλογή βιοδείκτη δεδομένου ότι η ανίχνευσή της σε δακρυϊκό δείγμα πιθανού ασθενή συνεπάγεται ότι πράγματι πρόκειται για ασθενή της νόσου του Αλτσχάιμερ. Ωστόσο, το ποσοστό της ανίχνευσής της στους ασθενείς της AD δεν είναι αρκετά υψηλό και συνεπώς αποκλείει αρκετές περιπτώσεις ασθενών.

2.4.2 Η πρωτεΐνη ταυ ως πιθανός βιοδείκτης της AD στα δάκρυα

Η πρωτεΐνη ταυ ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τους μικροσωληνίσκους (microtubule-associated proteins-MAPs) , όπως προαναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα. Το μόριο αυτό θεωρείται απαραίτητο για τη συναρμολόγηση αλλά και τη σταθεροποίηση του μικροσωληνιακού κυτταροσκελετού. Η ταυ πρωτεΐνη θεωρείται μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους για τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η ταυ αποτελεί κύριο συστατικό των ζευγαρωμένων ελικοειδών νημάτων (Paired Helical Filaments, PHFs) που σχετίζονται άμεσα με τη δημιουργία των νευροϊνιδιακών πλεγμάτων (Neurofibrillary tangles, NFTs), δομές οι οποίες αποτελούν κύρια νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου του Αλτσχάιμερ [26].

Ειδικότερα, η υπερφωσφορυλιωμένη- τ (tau-381) πρωτεΐνη αποτελεί ένα από τα έξι ισόμορφα με μήκος που κυμαίνεται από 352 έως 441 αμινοξέα και φαίνεται πως αποτελεί ισχυρό βιοδείκτη για την διάγνωση της AD σε πρώιμο στάδιο [27].

Τα επίπεδα της τ πρωτεΐνης στο ENY αυξάνονται με την ηλικία, ενώ σύμφωνα με ορισμένες μελέτες το όριο των 4,3 pM μπορεί να διαγνώσει την νόσο του Αλτσχάιμερ με ευαισθησία 92% και ειδικότητα 89% [27].

2.4.3 Ο συνδυασμός των πρωτεϊνών LCN-1, DCD, LACRT, LYZ-Ως πιθανός βιοδείκτης της AD στα δάκρυα

Μια ακόμα ενδιαφέρουσα περίπτωση για τον εντοπισμό βιοδεικτών για τη νόσο του Αλτσχάιμερ στο δακρυϊκό υγρό είναι αυτή της αναφοράς[28] στην οποία συμμετείχαν 23 άτομα, εκ των οποίων οι 14 ήταν ασθενείς της νόσου του Αλτσχάιμερ και οι 9 υγιείς μάρτυρες, όπου παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στο ρυθμό ροής του δακρυϊκού υγρού αλλά και στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα δάκρυα, μεταξύ των δυο ομάδων. Οι διαφορές αυτές καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα [Πίνακας 1].

	Ρυθμός ροής δακρύων	Συγκέντρωση πρωτεϊνών στα δάκρυα
Υγιείς μάρτυρες	6±2 μl/min	4,4 ± 1,4 μg/ml
Ασθενείς AD	12±2 μl/min	8,8 ± 2,9 μg/ml

Πίνακας 1- Διαφορά ρυθμού ροής και συγκέντρωσης πρωτεϊνών στα δάκρυα μεταξύ υγιών μαρτύρων και ασθενών της νόσου του Αλτσχάιμερ

Στην ίδια μελέτη, οι πρωτεΐνες που εκφράζονται διαφορετικά στα δάκρυα των ασθενών του AD υποβλήθηκαν σε περαιτέρω ανάλυση προκειμένου να εξεταστεί η πιθανή χρήση τους ως μελλοντικοί βιοδείκτες. Έτσι, πραγματοποιήθηκε ανάλυση χαρακτηριστικών λειτουργικού δείκτη ROC (Receiver Operator Characteristic, ROC) ελέγχοντας και τους πιθανούς συνδυασμούς των πρωτεϊνών που οδηγούν σε έναν αποδοτικό συνδυασμό. Ο πιο ισορροπημένος συνδυασμός είναι αυτός της λιποκαλίνης-1 (lipocalin-1, LCN-1), της εξωκυτταρικής γλυκοπρωτεΐνης λακτινίνη

(lacritin, LACRT), της λυσοζύμης-C (lysozyme-C, LYZ-C) και της δερμικιδίνης (dermicidin, DCD).

Ο εν λόγω συνδυασμός των τεσσάρων αυτών πρωτεϊνών, δίνει ευαισθησία 81,2% και ειδικότητα 76,6% που σε συνδυασμό με τα δεδομένα της αναφοράς [12], όπου όπως προαναφέρθηκε η ευαισθησία και η ειδικότητα ενός ιδανικού βιοδείκτη που θα διαγιγνώσκει την νόσο AD θεωρείται πως πρέπει να είναι περί του 85% και 75%, αντίστοιχα συνεπάγεται πως αποτελεί μια ελπιδοφόρα περίπτωση.

2.4.4 Το microRNA-200b-5p ως πιθανός βιοδείκτης της AD στα δάκρυα

Τελευταία κατηγορία πιθανού βιοδείκτη στο δακρυϊκό υγρό είναι τα μικροριβονουκλεϊκό οξέα (microRNA), δηλαδή, η τάξη των 18-25 νουκλεοτιδίων μη κωδικοποιημένου RNA, όπου έχει αναδειχθεί σε εξαιρετικά υποσχόμενη περίπτωση.

Πιο συγκεκριμένα, στην μελέτη [23] χρησιμοποιήθηκε το microRNA-200b-5p, το οποίο συλλέχθηκε από το OpenArray για να επαληθευθεί ως βιοδείκτης για τη νόσου του Αλτσχάιμερ, καθώς ο συγκεκριμένος τύπος θεωρείται πως εκφράζεται στους ασθενείς της νόσου. Επιπλέον, το microRNA-200b-5p δεν έχει ανιχνευθεί στο δακρυϊκό δείγμα των υγιών συμμετεχόντων ενώ είναι διακριτό στα δάκρυα των ασθενών. Έτσι, χρησιμοποίησαν και το microRNA-106a σαν ενδογενή μάρτυρα τύπου microRNA καθώς εκφράζεται σχεδόν πανομοιότυπα τόσο στους υγιείς όσο και στους ασθενείς. Η ποσοτικοποίηση του microRNA-200b-5p επιβεβαίωσε ότι εκφράζεται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα στους ασθενείς της νόσου του Αλτσχάιμερ. Ένα ακόμα συμπέρασμα, ήταν ότι ο τύπος microRNA-16a εμφανίζεται στα ίδια επίπεδα σε όλες τις ομάδες συμμετεχόντων, επιβεβαιώνοντάς τον σαν κατάλληλο μάρτυρα για κανονικοποίηση. Τελικώς, αφού κανονικοποιήθηκε το microRNA-200b-5p στον microRNA-106a φάνηκε η σημαντική αύξησή του, όταν πρόκειται για δείγμα ασθενή.

Παρακάτω, καταγράφεται ένας συνοπτικός πίνακας των πιθανών βιοδεικτών στο δακρυϊκό δείγμα μαζί με τις αντίστοιχες αναφορές [Πίνακας 2].

Βιοδείκτης	Τύπος	Αναφορά
Aβ (Aβ-42, Aβ-40)	πεπτίδιο	[19], [24], [21], [25]
p-tau	πρωτεΐνη	[21]
LCN-1, LYZ, LCRT, DCD	πρωτεΐνες	[28]
microRNA-200b-5p	RNA	[23]

Πίνακας 2- Οι πιθανοί βιοδείκτες που εκφράζονται στο δακρυϊκό υγρό

3 Βιοαισθητήρες

3.1 Γενικά στοιχεία βιοαισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες είναι συσκευές που μετρούν βιολογικές ή χημικές αντιδράσεις, δημιουργώντας σήματα αναλογικά με την συγκέντρωση του αναλυτή της αντίδρασης [29]. Οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται κυρίως για την παρακολούθηση διάφορων ασθενειών, την ανακάλυψη νέων φαρμάκων, τον εντοπισμό μικρο-οργανισμών που σχετίζονται με ασθένειες καθώς και τον εντοπισμό βιοδεικτών στα φυσιολογικά υγρά (σείλος, δακρυϊκό υγρό, ούρα, αίμα, ιδρώτας) που σχετίζονται με διάφορες νόσους [29].

Κάθε βιοαισθητήρας αποτελείται από τα παρακάτω τμήματα, όπως απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα [Εικόνα 12 [29]].

- Αναλυτής (Analyte) : αποτελεί την δομή που πρόκειται να ανιχνευθεί από τον βιοαισθητήρα.
- Βιοϋποδοχέας (Bioreceptor): αποτελεί το μόριο το οποίο μπορεί να αναγνωρίζει με μεγάλη ειδικότητα τον αναλυτή. Οι βιοϋποδοχείς μπορεί να είναι ένζυμα, κύτταρα, απταμερή, DNA, αντισώματα κλπ. Επίσης, σημειώνεται ότι η διαδικασία δημιουργίας του σήματος (υπό τη μορφή φωτός, θερμότητας, pH, φόρτισης ή αλλαγή μάζας κλπ) κατά την αλληλεπίδραση του βιοϋποδοχέα με τον αναλυτή ονομάζεται βιο-αναγνώριση.
- Μετατροπέας (Transducer): το στοιχείο που μετατρέπει μια μορφή ενέργειας σε μια άλλη. Ο ρόλος του στην πράξη είναι να μετατρέπει το φαινόμενο της βιο-αναγνώρισης σε μετρήσιμο σήμα. Η διαδικασία της μετατροπής αυτής ονομάζεται signalization. Οι περισσότεροι μετατροπείς παράγουν, ανάλογα με την τεχνολογία που χρησιμοποιείται, είτε οπτικά είτε ηλεκτρικά σήματα που συνήθως είναι ανάλογα της ποσότητας του συνδυασμού αναλυτή-βιοϋποδοχέα.
- Ηλεκτρονικά (Electronics): στο τμήμα αυτό προωθείται το τροποποιημένο σήμα και προετοιμάζεται για απεικόνιση. Στην πράξη, στο τμήμα αυτό εκτελείται η ρύθμιση του σήματος, όπως για παράδειγμα η διαδικασία της ενίσχυσης, η μετατροπή του σήματος από αναλογική σε ψηφιακή μορφή κλπ.
- Απεικόνιση (Imaging): αποτελεί το σύστημα ερμηνείας και μπορεί να είναι είτε οθόνη είτε κάποιος εκτυπωτής. Πολύ συχνά, μάλιστα, αποτελείται από ένα συνδυασμό υλικού και λογισμικού ενώ το αποτέλεσμα στην οθόνη μπορεί να είναι αριθμητικό, γραφικό ή εικόνα ανάλογα με το σχεδιασμό του.

3.2 Χαρακτηριστικά αισθητήρων

Ο πρώτος αισθητήρας τοποθετείται χρονικά το 1906 όταν ο M.Cremer δημοσίευσε τη μελέτη του σχετικά με τη συγκέντρωση ενός οξέος σε ένα διάλυμα αφού παρατήρησε ότι το ηλεκτρικό δυναμικό είναι ανάλογο της συγκέντρωσης μεταξύ δυο αντιδιαμετρικών σημείων του υγρού μιας γυάλινης επιφάνειας [29]. Ωστόσο, ο

πρώτος «πραγματικός» αισθητήρας αναπτύχθηκε από τον Leland C. Clark Jr, το 1956. Πρόκειται για ένα αισθητήρα ανίχνευσης του οξυγόνου [29].

Ανεξάρτητα από το είδος τους, όλοι οι αισθητήρες περιγράφονται από τα παρακάτω χαρακτηριστικά, η βελτιστοποίηση των οποίων τους κάνει πιο αποδοτικούς [29].

1. Εκλεκτικότητα - Selectivity

Ο όρος εκλεκτικότητα αφορά στην ικανότητα του βιοαισθητήρα να ανιχνεύει την ουσία-στόχο αγνοώντας την όποια πιθανή άλλη πρόσμιξη. Το πιο σύνηθες παράδειγμα για την εκλεκτικότητα είναι η σχέση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος, η όποια παρομοιάζεται με τη σχέση κλειδιού και κλειδαριάς.

2. Επαναληψιμότητα – Reproducibility

Ο όρος επαναληψιμότητα αναφέρεται στην ικανότητα του αισθητήρα να παράγει το ίδιο αποτέλεσμα ανεξάρτητα από τη χρήση του όταν λειτουργεί στις ίδιες συνθήκες.

3. Ευστάθεια- stability

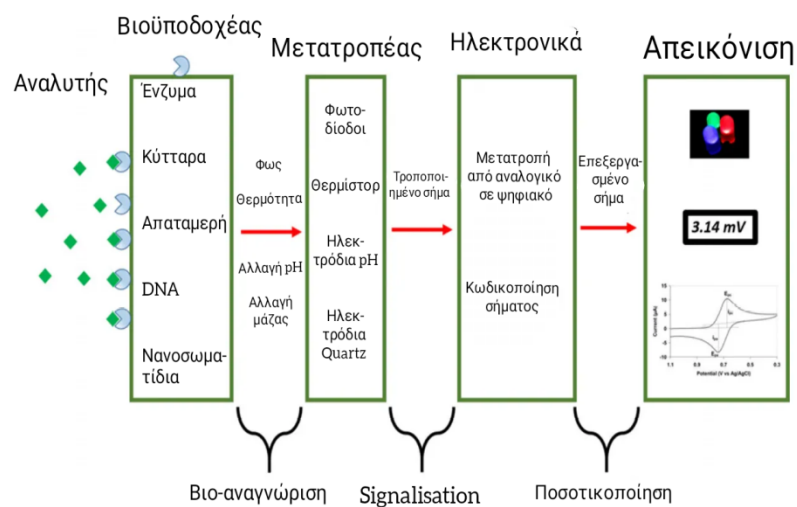
Η ευστάθεια αντανακλά την ευαισθησία του αισθητήρα στις διαταραχές που συμβαίνουν εντός και εκτός του συστήματος. Ένας αισθητήρας θεωρείται ευσταθής όταν το σήμα της εξόδου του δεν επηρεάζεται από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες εκτελείται η εκάστοτε μέτρηση. Οι διαταραχές αυτές μπορούν να έχουν κομβικό ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα καθώς μπορούν να προκαλέσουν μετατόπιση στο σήμα εξόδου, επηρεάζοντας έτσι την ακρίβεια του αισθητήρα. Περιπτώσεις διαταραχών που μπορούν να προκαλέσουν σφάλμα κατά τις μετρήσεις είναι η θερμοκρασία, η ακτινοβολία, η υγρασία κλπ.

4. Ευαισθησία - Sensitivity

Ο όρος ευαισθησία αφορά στην ελάχιστη ποσότητα του αναλυτή που μπορεί να ανιχνευθεί από τον αισθητήρα. Έτσι, καθορίζονται τα όρια ανίχνευσης- Limits Of Detection (LOD)- τα οποία στην ιδανική περίπτωση πρέπει να ανιχνεύουν ακόμα και ίχνη του αναλυτή.

5. Γραμμικότητα - Linearity

Ο όρος γραμμικότητα αναφέρεται στην ακρίβεια της απόκρισης του αισθητήρα, για μετρήσεις που εκτελούνται με διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναλυτή, ως προς το κατά πόσον προσεγγίζει μια ευθεία γραμμή. Η ευθεία αυτή, είναι της μορφής $y = m \cdot c$, όπου ο όρος m ισούται με την ευαισθησία του αισθητήρα και ο όρος c με τη συγκέντρωση του αναλυτή.



Εικόνα 12- Σχηματική αναπαράσταση λειτουργίας βιοαισθητήρων

3.3 Οπτική

Μια από τις πιο υποσχόμενες τεχνολογίες που είναι σχετικά οικονομική και εύκολο να εφαρμοστεί είναι αυτή της οπτικής, η οποία έχει προκαλέσει επιστημονικό και τεχνολογικό ενδιαφέρον, μέσω της αξιοποίησης της πληροφορίας και της ενέργειας που φέρει σε κάθε περίπτωση το φως. Η οπτική (Optics) μελετά το φως μέσα από τα φαινόμενα της διάδοσης, της αλληλεπίδρασης του με την ύλη καθώς και της δημιουργίας και ανίχνευσης του [30].

Τόσο η δημιουργία του φωτός, δηλαδή η εκπομπή του, όσο και η απορρόφησή του προκύπτουν ύστερα από την αλληλεπίδρασή του με την ύλη. Κατά το φαινόμενο της εκπομπής, μια μορφή ενέργειας μετατρέπεται σε φως, ενώ αντίθετα, κατά το

φαινόμενο της απορρόφησης, η ενέργεια των φωτονίων μετατρέπεται σε άλλη μορφή ενέργειας [30]. Στη γενική περίπτωση, αν σε ένα σύστημα είναι δυνατή η απορρόφηση, τότε είναι και η εκπομπή από αυτό, εκτός αν πρόκειται για μη-ακτινοβολικές αποδιεγέρσεις, όπου στην περίπτωση αυτή, η ενέργεια που απορροφήθηκε μετατρέπεται σε άλλη μορφή ενέργειας [30].

Η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη σχετίζεται άμεσα με τη συχνότητα. Πιο συγκεκριμένα, η ενέργεια των φωτονίων $h \cdot \nu$ είναι αυτή που θα καθορίσει τις πιθανές ενεργειακές μεταβάσεις. Με άλλα λόγια, η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη εξαρτάται από τη σχέση μεταξύ της τιμής της ενέργειας των φωτονίων με των πιθανών διαφορών των ενεργειακών σταθμών [30].

Αναφορικά με τις τιμές των οπτικών συχνοτήτων κυμαίνονται από 1,7 έως 3,5 eV, τιμές που θεωρούνται συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες τιμές των ατομικών/μοριακών ηλεκτρονικών μεταπτώσεων. Στο φάσμα της ορατής ακτινοβολίας, η απορρόφηση των φωτονίων γίνεται με τη διέγερση των ηλεκτρονίων, δηλαδή με την άνοδό τους σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες.

Ωστόσο, το ηλεκτρόνιο δε μένει στη διεγερμένη κατάσταση για μεγάλο χρονικό διάστημα. Για την αποδιέγερση του υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί. Πιο συγκεκριμένα, ένα ηλεκτρόνιο μπορεί να αποδιεγερθεί είτε με αυθόρμητη εκπομπή, όπου σε αυτή την περίπτωση εκπέμπεται φωτόνιο ίδια συχνότητας με τη διαφορά των ενεργειακών σταθμών ($h \cdot \nu = E_{n+1} - E_n$), είτε με εξαναγκασμένη εκπομπή, αν πρόκειται για ηλεκτρόνιο που συναντάει μια ήδη διεγερμένη κατάσταση, όπου τότε εκπέμπονται δυο ταυτόσημα φωτόνια.

Εναλλακτικά, η μετάπτωση μπορεί να γίνει σε ενδιάμεσες στάθμες, γεγονός που θα οδηγήσει στην εκπομπή φωτονίων μικρότερης ενέργειας. Αν η μετάπτωση γίνει μεταξύ καταστάσεων ίδιας πολλαπλότητας, τότε πρόκειται για το φαινόμενο του φθορισμού (fluorescence). Αντίθετα, αν η μετάπτωση πραγματοποιηθεί μεταξύ καταστάσεων διαφορετικής πολλαπλότητας τότε έχουμε το φαινόμενο του φωσφορισμού (phosphorescence). Πιο αναλυτικά, επειδή ο χρόνος αντίδρασης

είναι διαφορετικός, αν πρόκειται για χρονικό διάστημα μικρότερο των 10^{-8} sec τότε η εκπομπή αντιστοιχεί στο φαινόμενο του φθορισμού, ενώ στην περίπτωση όπου ο χρόνος ξεπεράσει την τιμή αυτή, τότε πρόκειται για φαινόμενο φωσφορισμού [30].

Αναλύοντας το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ φωτός και ύλης στα μικροκύματα (microwaves), δηλαδή για μήκη κύματος που ξεκινούν από 1mm έως λίγα μόνο cm και για τιμές ενέργειας που κυμαίνονται από 0,00001 έως 0,001 eV, αφορούν ενεργειακές διαφορές που αντιστοιχούν σε μοριακές στροφές ή σε στρεβλώσεις [Εικόνα 13] [30].

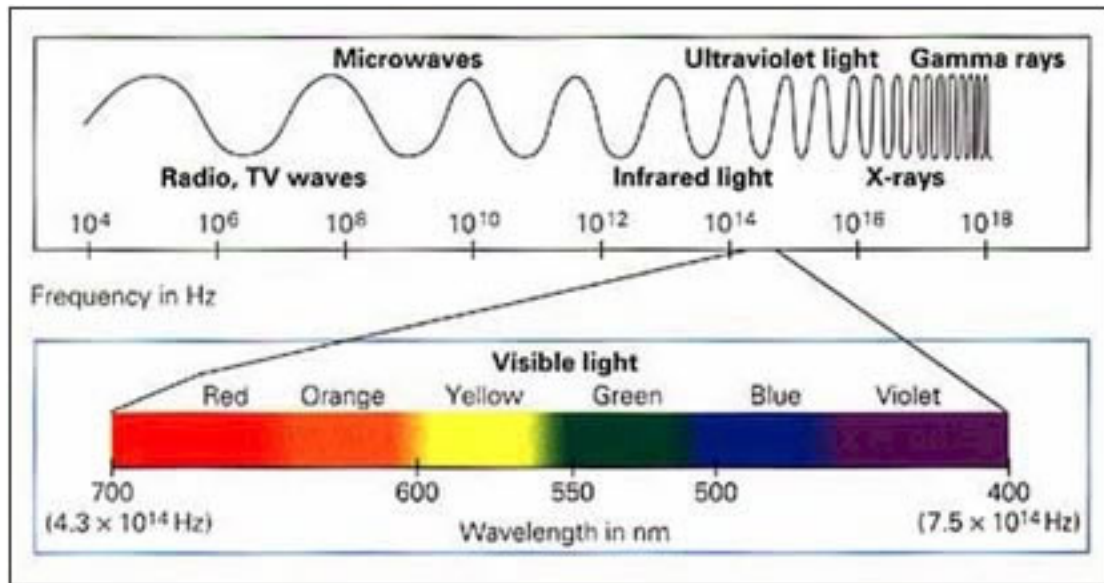
Τα μήκη κύματος που εκτείνονται από λίγα cm έως εκατοντάδες μέτρα αντιστοιχούν στα ραδιοκύματα (radiowaves) και εκπέμπονται από μεγάλα αντικείμενα (π.χ. κεραίες) [Εικόνα 13] [30].

Στην περιοχή των υπέρυθρων (infrared), δηλαδή για μήκη κύματος από μm έως μερικά mm και τιμές ενέργειας από 0,001 έως 1,7 eV πρόκειται για ενεργειακές διαφορές που αντιστοιχούν σε μοριακές ταλαντώσεις.

Για μήκη κύματος που εκτείνονται από 300 nm έως λίγα mm, δηλαδή στην περιοχή του υπεριώδους (ultraviolet), με την ενέργεια των φωτονίων να παίρνει τιμές μεταξύ 3,5 και 124 eV πρόκειται για ατομικές ηλεκτρονικές μεταπτώσεις με κύριους κβαντικούς αριθμούς από 2 μέχρι 7 αλλά και σε ιονισμό. Στις μεταβάσεις του ιονισμού, η ενέργεια του φωτονίου είναι τόση ώστε να μπορέσει το ηλεκτρόνιο να απελευθερωθεί πλήρως από τον πυρήνα [Εικόνα 13] [30].

Περνώντας στις ακτίνες X (X-rayradiation), δηλαδή σε μήκη κύματος από λίγα mm έως 0,00001 nm, όπου η ενέργεια του φωτονίου ξεπερνά τα 124 eV, συνεπάγεται ο πλήρης εξοβελισμός του εκάστοτε ηλεκτρονίου από το άτομο [Εικόνα 13] [30].

Τέλος, για μικρότερα μήκη κύματος και μεγαλύτερες συχνότητες, δηλαδή στην περιοχή των ακτινών-γ, η αλληλεπίδραση φωτός και ύλης είναι πολύ μικρή και για το λόγο αυτό είναι γνωστές για τις «διατρητικές» τους ικανότητες. Επίσης, οι μεταπτώσεις στην περιοχή αυτή πραγματοποιούνται σε επίπεδο πυρηνικών ενεργειακών σταθμών [Εικόνα 13] [30].



Εικόνα 13-Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

3.4 Ανιχνευτές

Τα τελευταία χρόνια, ο τομέας της οπτικής έχει γνωρίσει σημαντική άνοδο, με τις κλινικές δοκιμές να αυξάνονται συνεχώς σε διάφορες εφαρμογές. Σημειώνεται, πως εξ αυτών, οι εφαρμογές του NearInfraredFluorescence (NIRF) έχουν επιδείξει μεγάλη πρόοδο στις κλινικές δοκιμές αναφορικά με το θεραπευτικό αποτέλεσμα σε χειρουργικές επεμβάσεις.

Στην οπτική χρησιμοποιείται φως σε ένα ευρύ φάσμα μηκών κύματος και συγκεκριμένα, το φάσμα του ορατού, τους υπεριώδους και του υπέρυθρου φωτός. Ειδικότερα, όταν πρόκειται για φθορισμό στο υπέρυθρο (650-900nm) όπου ονομάζεται NearInfraredRadiationFluorescence (NIRF) θεωρείται ιδανική περίπτωση για τον εντοπισμό του Αβ πεπτιδίου [31]. Συγκεκριμένα, οι ανιχνευτές NIRF είναι ευνοϊκοί όσον αφορά στον εντοπισμό του Αβ σε in vivo διαδικασίες γιατί διαφέρουν από τον αυτοφθορισμό που έχουν όλα τα βιολογικά στοιχεία. Για τον ορισμό ενός ιδανικού ανιχνευτή για το Αβ, λαμβάνονται υπόψη τα παρακάτω [31].

Αρχικά, ο ανιχνευτής θα πρέπει να έχει υψηλή επιλεκτικότητα (Selectivity) και δεσμευτική συγγένεια (BindingAffinity) με τα πεπτίδια του Αβ. Επίσης, θα πρέπει να

διαθέτη υψηλή κβαντική απόδοση αλλά και σημαντική διαφορά κατά τον φθορισμό του όταν έχει ήδη συνδεθεί με το πεπτίδιο Αβ [31].

Η κβαντική απόδοση Φ (Quantum Yield) μιας φωτοχημικής διαδικασίας που προκαλείται από την ακτινοβολία είναι ο αριθμός των φορών που συμβαίνει ένα συγκεκριμένο γεγονός ανά φωτόνιο που απορροφάται από το σύστημα. Η κβαντική απόδοση αποτελεί μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους για τον καθορισμό της αποδοτικότητας μιας φωτοχημικής διεργασίας και δίνεται από τον παρακάτω τύπο (τύπος 3.1).

$$\Phi = \frac{\text{mole της ένωσης που αντιδρούν φωτοχημικά}}{\text{mole φωτονίων που απορροφούνται από το διάλυμα}} \quad (3.1)$$

Συνεχίζοντας με τα γνωρίσματα που διαθέτει ένας ιδανικός ανιχνευτής, σημειώνεται πως πρέπει να διαθέτει υψηλή μεταβολική σταθερότητα παρά την απλή του σύνθεση, ενώ, φυσικά, θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν λιγότερο τοξικός.

Αναφορικά με το φάσμα εκπομπής και την κβαντική απόδοση των φθοροφόρων, υπογραμμίζεται πως επηρεάζονται από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες δρουν, όπως το περιβάλλον αλλά και τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Συνήθως, οι φθοροφόρες ουσίες είναι πολικά μόρια που επηρεάζονται από την πολικότητα του διαλύτη, γεγονός που επηρεάζει την αλληλεπίδραση του ανιχνευτή με το μόριο-στόχο. Σημειώνεται επίσης, πως το φάσμα εκπομπής και η κβαντική απόδοση του συμπλέγματος του ανιχνευτή με το μόριο στόχο, αλλάζουν ανάλογα με το διάλυμα στο οποίο αλληλεπιδρούν, εξαιτίας της πολικότητάς του.

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί αρκετοί ανιχνευτές φθορισμού για το Αβ πεπτίδιο. Όπως εξηγήθηκε παραπάνω, αυτοί οι ανιχνευτές είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στην πολικότητα του διαλύτη και είναι μη-φθορίζοντες σε υδατικά διαλύματα. Όμως, όταν συνδεθούν με το Αβ πεπτίδιο τότε μετατρέπονται σε πολύ φθορίζουσες ουσίες. Ίδια συμπεριφορά εμφανίζουν και όταν πρόκειται να δράσουν υπό κάποιον μη-πολικό διαλύτη.

Σημειώνεται πως αυτό που πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την επιλογή του ανιχνευτή είναι ο δομικός σχηματισμός του Αβ. Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 14] το Αβ μπορεί να εκφραστεί ως μονομερές, ολιγομερές, πρωτοϊνίδιο, ινίδιο ή πλάκα [32]. Σύμφωνα με τη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία, στο δακρυϊκό υγρό εκφράζονται υπολείμματα του πεπτιδίου Αβ τα οποία όμως έχουν προγνωστική αξία [24]. Ωστόσο, οι μελέτες που αξιοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία δεν έχουν σαφείς αναφορές στην δομική μορφή του Αβ.



Εικόνα 14-Οι δομικοί σχηματισμοί του Αβ

]

Οι μέχρι σήμερα γνωστοί ανιχνευτές φθορισμού για το Αβ πεπτίδιο παρουσιάζονται στην επόμενη ενότητα [31].

3.4.1 Η θειοβλαβίνη - Thioflavin, ThT

Ο πρώτος ανιχνευτής που παράχθηκε μόλις το 1959 είναι η θειοβλαβίνη (thioflavin-T, ThT) η οποία αποτέλεσε τον χρυσό κανόνα για τον εντοπισμό των ινιδίων του Αβ πεπτιδίου χάρη στην επιλεκτική του χρώση [31]. Συγκεκριμένα, όταν η ThT συνδεθεί με ινίδια του Αβ πεπτιδίου, παρουσιάζει ενισχυμένο φθορισμό και ένα red-shift στις

μέγιστες τιμές της διέγερσης και της εκπομπής του, από τα 350 nm και 438 nm στα 450 nm και 482 nm, αντίστοιχα [31]. Το μόριο της ThT αποτελείται από μια βενζοθειαζόλη στη θέση του δέκτη και από έναν δακτύλιο βενζυλαμίνης στη θέση του δότη, ο οποίος περιστρέφεται γύρω από έναν κοινό δεσμό C-C. Το εμπόδιο στη ελεύθερη περιστροφή του δέκτη και του δότη ενισχύει την κβαντική απόδοση του φθορισμού όταν το μόριο της ThT συνδεθεί με το πεπτίδιο Αβ [31]. Όμως, το μήκος κύματος για την εκπομπή της ThT είναι μικρότερο των 650 nm, οπότε η χρήση του για ινίνο εφαρμογές είναι περιορισμένη [31]. Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί πολλά παράγωγα της θειοβλαβίνης με σκοπό να αντιμετωπιστούν οι περιορισμοί της. Ένα από αυτά είναι η θειοβλαβίνηS (ThS) η οποία μπορεί να ενωθεί με αδιάλυτα μόρια του Αβ και να παρουσιάσει φθορισμό, και μάλιστα αυξημένης έντασης, στο φάσμα εκπομπής. Όμως, στο παράγωγο αυτό, δεν εμφανίζεται το red-shift που παρουσιάζεται κατά την ένωση της ThT με το Αβ.

Επόμενος ανιχνευτής φθορισμού για το Αβ είναι η κουρκουμίνη. Η κουρκουμίνη είναι μια φυσική ένωση που έχει τη δυνατότητα να συνδέεται τόσο με το διαλυτό όσο και με το αδιάλυτο Αβ, με μήκος κύματος διέγερσης 510 nm και εκπομπής στα 560 nm [31]. Παρακάτω, καταγράφεται αναλυτικά η περίπτωση της κουρκουμίνης.

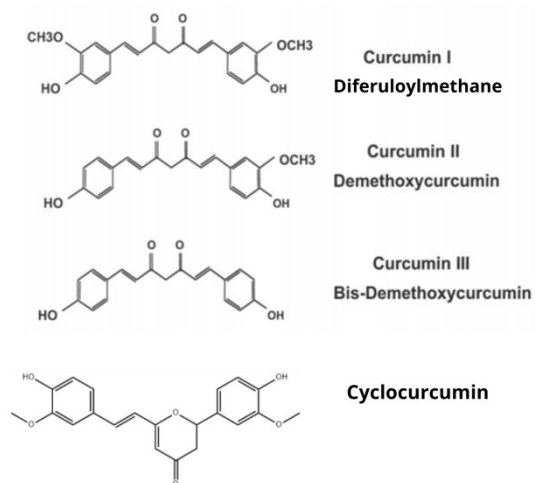
3.4.2 Η Κουρκουμίνη - Curcumin

Η κουρκουμίνη (Curcumin) είναι μια ουσία που παράγεται από το ομώνυμο φυτό *Curcuma Longa* (κουρκουμάς) και έχει ένα χρυσοκίτρινο χρώμα [Εικόνα 15]. Η κουρκουμίνη χρησιμοποιείται σε πολλούς τομείς όπως για τη θεραπεία ασθενειών, σαν συστατικό στην τροφή και ως κίτρινη βαφή στην κλωστοϋφαντουργία [33]. Πιο αναλυτικά, η κουρκουμίνη απομονώθηκε από τη ρίζα του φυτού και ορίστηκε ως μια υδρόφοβη πολυφαινόλη με τη δομή της να παίρνει το όνομα diferuloylmethane, το 1815 παρότι το φυτό της εμφανίστηκε στην Ευρώπη τον 13^ο αιώνα και πήρε το όνομα «ινδικό σαφράν» εξαιτίας του χρώματος και της γεύσης του [34].



Εικόνα 15-Το φυτό *CurcumaLonga*, η ρίζα του και το παράγωγό του, η κουρκουμίνη

Το χρυσοκίτρινο χρώμα της κουρκουμίνης προέρχεται από τα κουρκουμινοειδή που περιέχει τα οποία σχετίζονται με την κουρκουμίνη. Συγκεκριμένα, τα κύρια κουρκουμινοειδή που περιέχονται στην κουρκουμίνη του εμπορίου είναι η diferuloylmethane (κουρκουμίνη I), η demethoxycurcumin (κουρκουμίνη II), η bisdemerhoxycurcumin (κουρκουμίνη III) και η cyclocurcumin [Εικόνα 16]. Ωστόσο, στην κουρκουμίνη του εμπορίου, περιέχονται μόνο τα τρία πρώτα είδη κουρκουμινοειδών σε ποσοστό 77%, 18% και 5%, αντίστοιχα [35].



Εικόνα 16-Τα κουρκουμινοειδή που περιέχονται στην κουρκουμίνη

3.4.2.1 Η χημική σύσταση της κουρκουμίνης

Η χημική σύσταση της κουρκουμίνης ορίστηκε το 1910 από τους Lampe και Milobedeska και είναι πλέον γνωστή 1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxy phenyl)-1, 6-heptadiene-3,5-dione ή αλλιώς diferuloylmethane με χημικό τύπο $C_{21}H_{20}O_6$ [33]. Πρόκειται για μια μορφή χρυσοκίτρινης σκόνης που είναι αδιάλυτη στους υδατικούς διαλύτες ενώ όταν πρόκειται για διαλύματα αιθανόλης, μεθανόλης και ακετόνης, διαλύεται. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το φασματικό της εύρος κυμαίνεται μεταξύ 300 nm και 500 nm με το μέγιστο της απορρόφησης να είναι στα 420 nm, το σημείο τήξεώς της είναι στους 183°C, το μοριακό της βάρος είναι στα 368 g/mol ενώ η έκθεση της σε όξινες συνθήκες αλλάζει το χρώμα της σε βαθύ κόκκινο [36].

3.4.2.2 Ιδιότητες και η θεραπευτική της δράση για την νόσο του Αλτσχάιμερ

Η χρήση της κουρκουμίνης είναι ευρεία. Χρησιμοποιείται ως καρύκευμα διατροφής, σαν αρωματικός ή χρωστικός παράγοντας, σαν συντηρητικό τροφίμων, σαν καλλυντικό αλλά και στην φαρμακευτική βιομηχανία λόγω των ιδιοτήτων της, αφού έχει αποδειχθεί πως έχει αντιμικροβιακές, αντιικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδοτικές, ακόμα και αντικαρκινικές δράσεις [33], [34], [35]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η κατανάλωση κουρκουμίνης μειώνει τα επίπεδα χοληστερόλης, προστατεύει από το έμφραγμα του μυοκαρδίου, συμβάλει στην καταπολέμηση των συμπτωμάτων διαβήτη τύπου II, στην ρευματοειδή αρθρίτιδα, στη σκλήρυνση κατά πλάκας αλλά και στις νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως στη νόσο του Πάρκινσον και του Αλτσχάιμερ. Υπογραμμίζεται, επίσης, πως βρίσκει στην καταπολέμηση του ιού HIV, του πονόδοντου, των πόνων που προέρχονται από την εμμηνόρροια και την καλή λειτουργία διάφορων ζωτικών οργάνων (π.χ. νεφρούς, χολή, ήπαρ, μάτια κλπ). Ακόμα, η κουρκουμίνη θεωρείται ότι μπορεί να θεραπεύσει ορισμένες ασθένειες, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, οι κολικοί, η ψωρίαση, το άσθμα, οι αλλεργίες, ο βήχας και η ιγμορίτιδα [33], [34], [35].

Η κουρκουμίνη, έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει ορισμένες νευροπροστατευτικές ιδιότητες λόγω της αντιφλεγμονώδης και της αντιοξειδωτικής της δράσης. Συγκεκριμένα, θεωρείται ότι αποτρέπει τη συσσώρευση του Αβ πεπτιδίου στον εγκέφαλο αλλά και το να δεσμεύεται από τις αμυλοειδείς πλάκες, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τους νευρώνες. Ακόμα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η κουρκουμίνη μπορεί να δράσει κατασταλτικά στην υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau και στον λόγο $\frac{A\beta_{42}}{A\beta_{40}}$. Επίσης, η λιπόφιλη φύση της, προκαλεί μια ισχυρή υδρόφοβη αντίδραση με το Αβ, με έναν δεσμό υδρογόνου, με αποτέλεσμα να προωθείται η διαδικασία του ολιγομερισμού αποτρέποντας έτσι την δημιουργία συσσωματωμάτων Αβ. Συνεπώς, μειώνονται οι οξείες και χρόνιες φλεγμονές που προκαλούνται από τη νόσο AD [31].

4 Πειραματικές διατάξεις και ουσίες

4.1 Σκοπός Πειραματικής μελέτης

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη για τον σχεδιασμό βιοαισθητήρα εντοπισμού του Αβ πεπτιδίου στο δακρυϊκό δείγμα για την πρόωπη διάγνωση της νόσου του Αλτσχάιμερ. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής του Αβ η κουρκουμίνη. Έτσι, το σύμπλοκο Αβ-κουρκουμίνη μελετήθηκε ως προς την απορρόφηση και τον φθορισμό.

Συγκεκριμένα, ο σκοπός περιλαμβάνει τις ακόλουθες μελέτες του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη.

- Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διάλυμα PBS σε σχέση με το χρόνο
- Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού σε διάλυμα PBS σε σχέση με το χρόνο

4.2 Πειραματικές Διατάξεις

4.2.1 Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης

Για την καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε ένα φασματοφωτόμετρο απορρόφησης και συγκεκριμένα το μοντέλο Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin-Elmer που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 17] [37]. Το συγκεκριμένο μοντέλο λαμβάνει και καταγράφει φάσματα απορρόφησης ενώ η λειτουργία του είναι για τα μήκη κύματος του υπεριώδους και του ορατού φάσματος.



Εικόνα 17-Το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης, Lambda35, UV,VIS Spectrometer, Perkin-Elmer

Στη συνέχεια παρουσιάζεται η πλήρης λειτουργία του φασματοφωτομέτρου απορρόφησης μαζί με το Block διαγράμμα του συγκεκριμένου μοντέλου [Εικόνα 18]

[37]. Αρχικά, το παρόν φασματοφωτόμετρο για την ακτινοβολήση έχει δυο πηγές, μια λάμπα δευτερίου για μήκη κύματος από 200nm έως 400nm, δηλαδή εκπέμπει στην υπεριώδη περιοχή, και μια λάμπα αλογόνου με λειτουργία από 350nm έως 900nm, δηλαδή για την εκπομπή στην υπέρυθρη περιοχή.

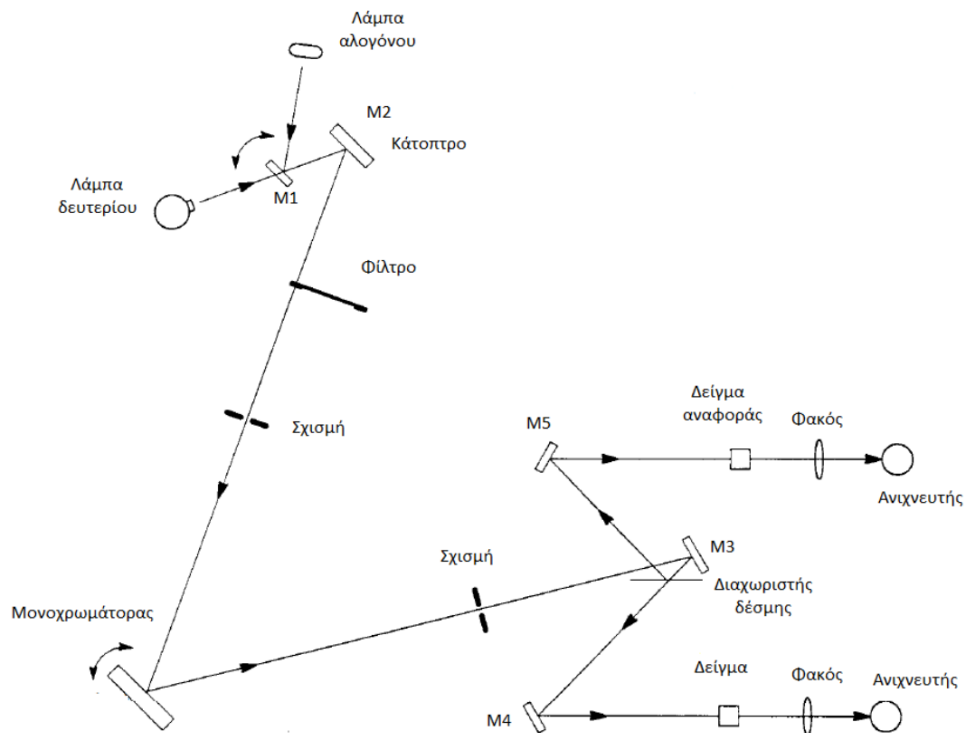
Για τη λειτουργία του στο ορατό φως, περιλαμβάνει ακόμα 5 κάτοπτρα (M1, M2, M3, M4, M5) η λειτουργία των οποίων περιγράφεται παρακάτω [37].

- Κάτοπτρα M1 και M2: Το κάτοπτρο M1 χρησιμεύει στην ανάκλαση της ακτινοβολίας της λάμπας αλογόνου ώστε να οδηγηθεί στο κάτοπτρο M2. Ταυτόχρονα, η θέση του εμποδίζει την ανάκλαση της ακτινοβολίας που προέρχεται από τη δεύτερη πηγή, τη λάμπα δευτερίου. Για να λειτουργήσει η λάμπα δευτερίου, δηλαδή για ακτινοβολήση στην υπεριώδη περιοχή, το κάτοπτρο M1 ανυψώνεται και έτσι επιτρέπεται η διέλευση της δέσμης της ακτινοβολίας στο κάτοπτρο M2. Για την εναλλαγή της πηγής ακτινοβολήσης, δεν απαιτείται χειροκίνητη αλλαγή, καθώς πραγματοποιείται αυτόματα με την περιστροφή του μονοχρωμάτορα.

Στη συνέχεια, η ακτινοβολία οδηγείται σε έναν τροχό φίλτρου όπου ανάλογα με το αν πρόκειται για υπέρυθρη ή υπεριώδη ακτινοβολία, παρεμβάλλει και το κατάλληλο φίλτρο. Ο τροχός αυτός, οδηγείται από έναν βηματικό κινητήρα ο οποίος βρίσκεται σε συμφωνία με τις αλλαγές του μονοχρωμάτορα. Η χρήση του φίλτρου εξυπηρετεί στο να φιλτραριστεί η δέσμη μέσω της σχισμής του μονοχρωμάτορα, πριν εισέλθει σε αυτόν, μετατρέποντας την τελικά σε μια σχεδόν μονοχρωματική δέσμη.

- Κάτοπτρο M3: Όταν η ακτινοβολία φτάσει στο κάτοπτρο M3, τότε ανακλάται σε έναν διαχωριστή δέσμης, ο οποίος στέλνει το 50% στο κάτοπτρο M4 και το υπόλοιπο ποσοστό στο κάτοπτρο M5.
- Κάτοπτρο M4: Το κάτοπτρο M4 εστιάζει την ακτινοβολία στο υπό εξέταση δείγμα και με τη χρήση ενός κυρτού φακού επιτρέπει στη δέσμη να περάσει στον ανιχνευτή (φωτοδίοδο).

- Κάτοπτρο M5: Το κάτοπτρο M5 εστιάζει την ακτινοβολία στο δείγμα αναφοράς και με τη χρήση ενός κυρτού φακού επιτρέπει στη δέσμη να περάσει στον ανιχνευτή (φωτοδίοδο).



Εικόνα 18-Blockδιάγραμμα του φασματοφωτομέτρου απορρόφησης Lambda 35,UV,VISspectrometer, Perkin-Elmer

Σημειώνεται πως τα δυο δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές υποδοχές που διαθέτει η συσκευή, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 19].Επίσης, ο χειρισμός του φασματοφωμέτρου γίνεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή και χρήσης του λογισμικού UVWinLab [37]. Έτσι, επιτρέπεται ο έλεγχος των βασικών παραμέτρων της συσκευής. Αρχικά, μέσω του λογισμικού μπορεί να οριστεί το εύρος του μήκους κύματος στο οποίο θα εξαχθεί το φάσμα απορρόφησης όπως, επίσης, και η ταχύτητα σάρωσης και το πλάτος της σχισμής του μονοχρωμάτορα. Πολύ σημαντική, είναι η λειτουργία αφαίρεσης του θορύβου τόσο από την ίδια τη συσκευή όσο και από το διαλύτη, επιτρέποντας έτσι την ακριβέστερη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος προσθέτοντας ακόμα την απαραίτητη εξομάλυνση στο σήμα. Τέλος, ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία που προσφέρονται είναι η δυνατότητα επεξεργασίας των φασμάτων που εξάγονται από τις μετρήσεις [37].

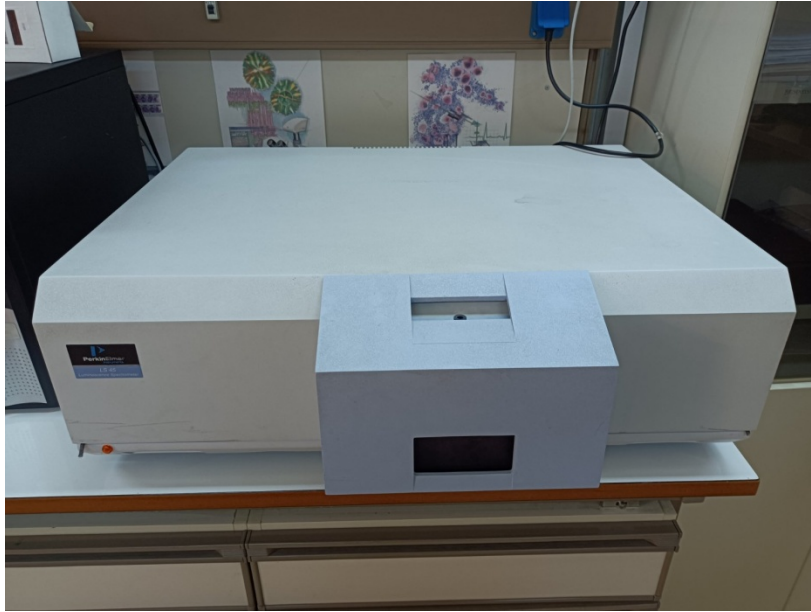


Εικόνα 19-Οι θέσεις τοποθέτησης των διαλυμάτων δείγματος και αναφοράς στο φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Lambda 35,UV/VISSpectrometer, Perkin-Elmer

4.2.2 Φασματοφωτόμετρο φθορισμού

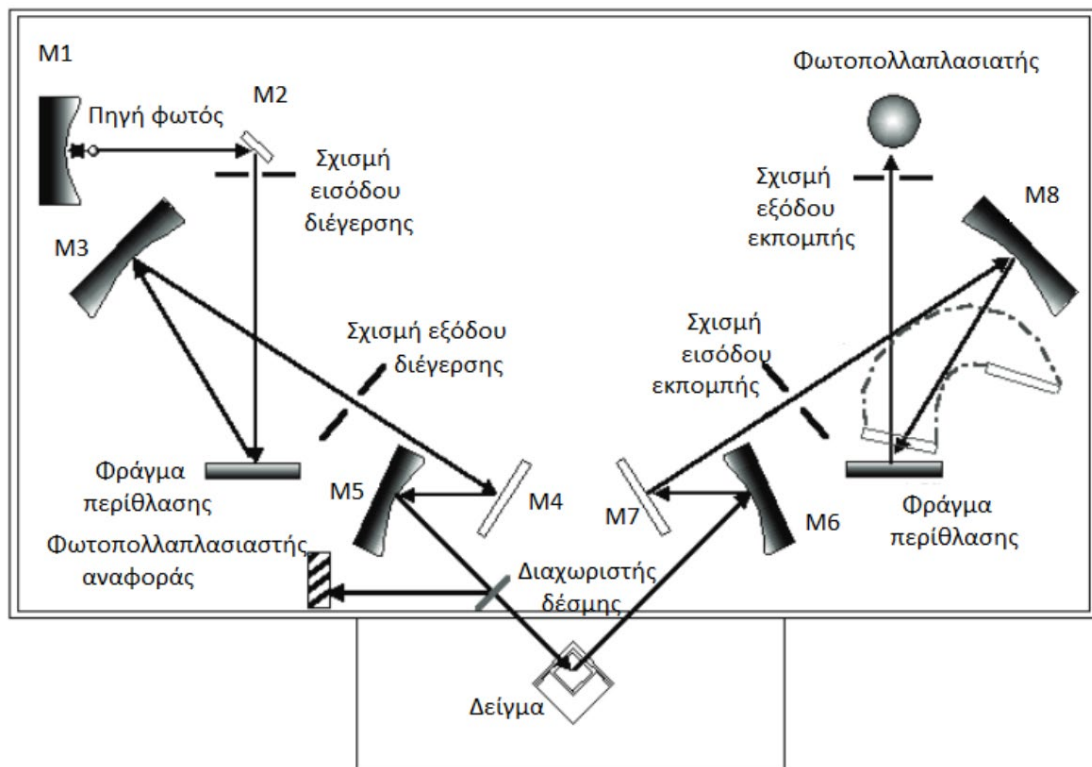
Για την καταγραφή των φασμάτων φθορισμού χρησιμοποιήθηκε ένα φασματοφωτόμετρο απορρόφησης και συγκεκριμένα το μοντέλο Perkin - Elmer LS 45 LuminescenceSpectrometerπου φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 20][38].Το συγκεκριμένο μοντέλο λαμβάνει και καταγράφει φθορισμού, φωσφορισμού, χημειοφωταύγειας και βιοφωταύγεια ενώ η λειτουργία του μπορεί να γίνει είτε με συνεχή σάρωση σε όλο το εύρος των μηκών κύματος που διαθέτει το όργανο, είτε να οριστεί σε συγκεκριμένη μπάνκα του εύρους.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται η πλήρης λειτουργία του φασματοφωτομέρου φθορισμού μαζί με το Block διάγραμμα του συγκεκριμένου μοντέλου [Εικόνα 21]. Αρχικά, το παρόν φασματοφωτόμετρο διαθέτει για πηγή διέγερσης μια λυχνία Ξένου (Xenon flash tube) μεγάλης έντασης και μικρής διάρκειας [38].



Εικόνα 20-Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού, Perkin-ElmerLS 45 LuminescenceSpectrometer

Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία περιγράφεται από το παρακάτω block διάγραμμα (Σχήμα). Όπως φαίνεται, διαθέτει 8 κάτοπτρα, η λειτουργία των οποίων περιγράφεται παρακάτω [38].



Εικόνα 21-Block διάγραμμα του φασματοφωτομέτρου φθορισμού Perkin-ElmerLS 45 LuminescenceSpectrometer

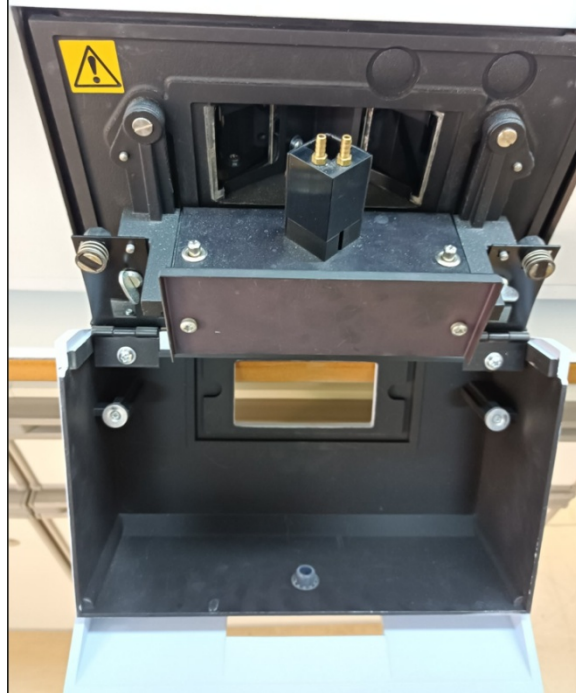
Η ακτινοβολία της λυχνίας κατευθύνεται αρχικά στο ελλειψοειδές κάτοπτρο M1 ώστε να εσιαστεί και στη συνέχεια οδηγείται στο κάτοπτρο M2 που βρίσκεται στην είσοδο του μονοχρωμάτορα διέγερσης. Ο μονοχρωμάτορας περιλαμβάνει τη σχισμή εισόδου, το φράγμα περίθλασης, ένα σφαιρικό κάτοπτρο M3 και τη σχισμή εξόδου, από την οποία περνάει η μονοχρωματική ακτινοβολία με μήκος κύματος καθορισμένο από τη θέση που βρίσκεται το φράγμα περίθλασης. Η θέση αυτή (του φράγματος) ελέγχεται μέσω βηματικού κινητήρα.

Η προσπίπτουσα δέσμη όμως, δεν κατευθύνεται εξολοκλήρου στο υπό εξέταση δείγμα. Συγκεκριμένα, το μεγαλύτερο ποσοστό της δέσμης προσπίπτει στο δείγμα, ενώ, η υπολειπόμενη ποσότητα οδηγείται στον φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς. Ο φωτοπολλαπλασιαστής αναφοράς έχει αποθηκευμένη μια καμπύλη ροδαμίνης ώστε να απορροφώνται τα μήκη κύματος εύρους από 230 nm έως 630 nm. Η αντίστοιχη εκπομπή είναι στα 650 nm ενώ η κβαντική της απόδοση θεωρείται σταθερή [38].

Όσον αφορά στο φθορισμό που εκπέμπεται από το δείγμα, χρησιμοποιείται το κάτοπτρο M6 που βρίσκεται στην είσοδο του μονοχρωμάτορα εκπομπής. Ο συγκεκριμένος μονοχρωμάτορας διαθέτει τη σχισμή εισόδου, ένα σφαιρικό κάτοπτρο M8, ένα φράγμα περίθλασης και στη σχισμή εξόδου, από την οποία περνάει η μονοχρωματική ακτινοβολία με μήκος κύματος καθορισμένο από τη θέση που βρίσκεται το φράγμα περίθλασης ώστε να οδηγηθεί τελικά στον φωτοπολλαπλασιαστή. Η θέση αυτή (του φράγματος) ελέγχεται μέσω βηματικού κινητήρα [38].

Σχετικά με τη λειτουργία των δυο μονοχρωματόρων διέγερσης και εκπομπής μπορεί να είναι είτε συγχρονισμένη είτε ανεξάρτητη, ενώ, το φασματικό τους εύρος είναι από 200 nm έως 800 nm και από 200 nm έως 900 nm, αντίστοιχα.

Σημειώνεται το υπό εξέταση δείγμα τοποθετείται στην ειδική υποδοχή που διαθέτει η συσκευή, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 22]. Στην πράξη, η θέση αυτή βρίσκεται σε γεωμετρία 90° από την πηγή φωτός και τον φωτοπολλαπλασιαστή. Επίσης, ο χειρισμός του συγκεκριμένου φασματοφωμέτρου γίνεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή και χρήσης του λογισμικού FLWinLab [38]. Έτσι, επιτρέπεται ο έλεγχος των βασικών παραμέτρων της συσκευής. Αρχικά, μπορεί να ρυθμιστεί το μήκος κύματος της διέγερσης όπως και το εύρος στο οποίο θα εξαχθεί τελικά το φάσμα φθορισμού. Πολύ χρήσιμο εργαλείο είναι η δυνατότητα της συσκευής να μηδενίζει το σήμα που προέρχεται είτε από τον διαλύτη είτε από κάποιον ενδεχόμενο θόρυβο του οργάνου, επιτρέποντας έτσι την ακριβέστερη μέτρηση του φθορισμού του υπό εξέταση δείγματος. Τέλος, μετά τη μέτρηση, δίνεται η δυνατότητα επεξεργασίας των εξαγόμενων φασμάτων [38].



Εικόνα 22-Η θέση τοποθέτησης του υπό εξέταση δείγματος στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-ElmerLS 45 Luminescence

4.3 Ουσίες

4.3.1 Αβ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως βιοδείκτης το Αβ-42 πεπτίδιο. Το Αβ προκύπτει από την διάσπαση της πρόδρομης αμυλοειδούς πρωτεΐνηςAPP ύστερα από την δράση των ενζύμων β-σεκρετάση και γ-σεκρετάση [8]. Όπως αναλύθηκε παραπάνω, η έκφρασή του παρουσιάζεται τόσο στον ΕΝΥ όσο και στα δάκρυα ενώ η συσχέτισή του με τη νόσο του Αλτσχάιμερ είναι μεγάλη και ακόμα και η ύπαρξη μικρής ποσότητας στα δάκρυα θεωρείται πως έχει προγνωστική αξία [14].

Σημειώνεται πως ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον εντοπισμό του Αβ είναι ότι ανάλογα με το δομικό σχηματισμό του διαφοροποιείται και ο πιθανός ανιχνευτής.

4.3.2 Κουρκουμίνη

Η κουρκουμίνη είναι στην πράξη μια χρυσοκίτρινη σκόνη που έχει την ιδιότητα να παραμένει αδιάλυτη στους υδατικούς διαλύτες. Το φασματικό της εύρος κυμαίνεται από 300 nm και 500 nm ενώ το μέγιστο της απορρόφησής της να είναι στα 420 nm [36].

Υπενθυμίζεται ότι η κουρκουμίνη έχει θεραπευτική δράση, δηλαδή συμβάλει στον ολιγομερισμό του Αβ με αποτέλεσμα να μην εξελίσσεται η διαδικασία για τον σχηματισμό ινιδίων και συσσωματωμάτων Αβ [31].

4.3.3 PBS

Το PBS (PhosphateBufferedSaline, PBS) είναι ένα αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά ιόντα που χρησιμοποιείται ευρέως βιολογικές εφαρμογές , όπως για παράδειγμα το πλύσιμο κυττάρων [39]. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το PBS καθώς έχει τυπική συγκέντρωση αλάτων και τιμή pH παρόμοιες με αυτές των ανθρώπινων δακρύων [40].

5 Κεφάλαιο Πειραματικές Μέθοδοι

5.1 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης

Πρώτο βήμα για τη μελέτη εντοπισμού του Αβ πεπτιδίου ήταν να δημιουργηθεί ένα διάλυμα μέσα στο οποίο το διαλυτό Αβ θα μπορούσε να αναπτυχθεί σε μορφή συσσωματωμάτων και ινιδίων. Όπως εξηγήθηκε στο θεωρητικό κομμάτι της παρούσας εργασίας, τα μονομερή του Αβ με το πέρασμα του χρόνου περνάνε στη μορφή ολιγομερών και στη συνέχεια αναπτύσσονται σε ινίδια [32]. Η διαδικασία αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς η κουρκουμίνη που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής του Αβ εμφανίζει σημαντικές διαφορές στις οπτικές της ιδιότητες όταν ενώνεται με τα συσσωματώματα και τα ινίδιά του, όπως αποδεικνύεται στο επόμενο κεφάλαιο. Έτσι, το διάλυμα του Αβ διαλύθηκε σε PBS προσομοιώνοντας το δακρυϊκό δείγμα πιθανού ασθενή.

Το Αβ αραιώθηκε στο PBSδιάλυμα, δημιουργώντας έτσι κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξή του. Το διάλυμα αυτό έμεινε σε θερμοκρασία δωματίου, με ελαφριά ανάδευση για 5 μέρες, αφού, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αυτός είναι ο απαραίτητος χρόνος για το σχηματισμό των συσσωματωμάτων και ινιδίων του Αβ [32]. Στο τελικό διάλυμα, όπου έγιναν οι μετρήσεις, συμπληρώθηκε το διάλυμα της κουρκουμίνης και πάρθηκαν τα φάσματα απορρόφησης του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη. Σημειώνεται πως η κουρκουμίνη προστέθηκε πριν ξεκινήσουν οι μετρήσεις, και όχι από την αρχή, έτσι ώστε να μην εμποδίσει τη διαδικασία της δημιουργίας των συσσωματωμάτων και των ινιδίων. Φυσικά, πριν τη λήψη των φασμάτων έγινε ο απαραίτητος μηδενισμός του σήματος έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι η μέτρηση δε θα περιλαμβάνει σφάλματα από το θόρυβο της συσκευής.

Τα φάσματα απορρόφησης μετρήθηκαν από το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Lambda 35, UV/VISspectrometer, Perkin-Elmer για μήκη κύματος από 250 nm έως 650 nm.

5.2 Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού

Για τη φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνης χρησιμοποιήθηκε και πάλι διάλυμα PBS, μέσα στο οποίο προστέθηκε το διάλυμα του Αβ και αυτό της κουρκουμίνης, και έπειτα πάρθηκαν μετρήσεις για διάφορες ποσότητες του. Όπως και στην περίπτωση των φασμάτων απορρόφησης, η κουρκουμίνη δεν προστέθηκε από την αρχή στο διάλυμα για να μην εμποδίσει την ανάπτυξη του Αβ σε άλλους δομικούς σχηματισμούς.

Για τις μετρήσεις του φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το Perkin - Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer. Η διέγερση του φθορισμού προτιμήθηκε να γίνει σε δυο μήκη κύματος, στις τιμές 446 nm και 344nm. Οι τιμές αυτές επιλέχθηκαν με βάση τις κορυφές απορρόφησης που προέκυψαν στο πρώτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε η διέγερση στα 446 nm καθώς είναι το αρχικό μέγιστο κατά μέρα 0, δηλαδή τη μέρα όπου το διάλυμα του PBS με το αραιωμένο Αβ αναμίχθηκε με το διάλυμα της κουρκουμίνης, και στα 344 nm, δηλαδή στην θέση της νεοεμφανιζόμενης, κατά την 5^η μέρα, κορυφής. Πριν από τη λήψη των φασμάτων φθορισμού προηγήθηκε ο μηδενισμός του σήματος έτσι ώστε να μην συμπεριληφθεί στη μέτρηση κάποιος πιθανός θόρυβος που θα οδηγήσει σε σφάλμα.

6 Αποτελέσματα

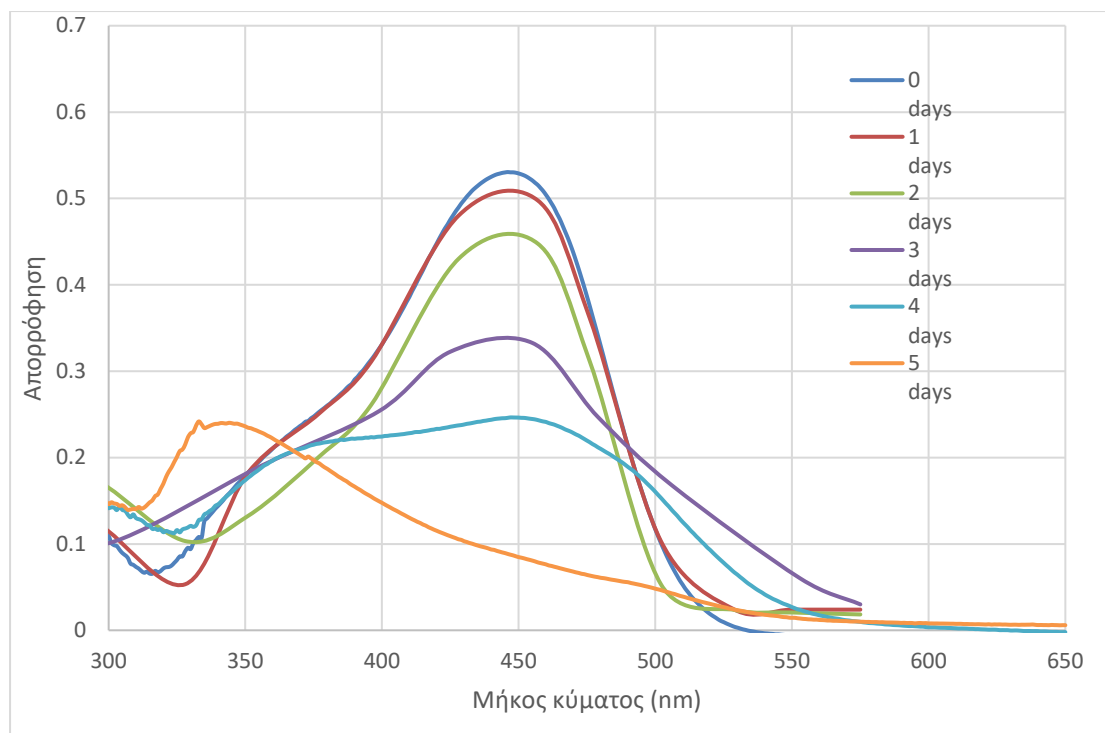
6.1 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνης

Όπως αναλύθηκε στο 5^ο κεφάλαιο, το τελικό διάλυμα, στο οποίο έγιναν οι μετρήσεις, αποτελούνταν από το διάλυμα Αβ, αραιωμένο σε διάλυμα PBS και το διάλυμα της κουρκουμίνης. Έτσι, από το τελικό διάλυμα συλλέχθηκαν τα φάσματα απορρόφησης για διάφορες ποσότητες του τελικού διαλύματος. Η μέτρηση των φασμάτων έγινε σε διάστημα 5 ημερών, όπου κάθε μέρα γινόταν λήψη των μετρήσεων.

Για τη λήψη των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε το Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin-Elmer με τα μήκη κύματος να παίρνουν τιμές από 250 nm έως 650 nm.

6.1.1 Αποτελέσματα

Στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 23] παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνης για μήκη κύματος από 300nm έως 650nm. Συγκεκριμένα, καταγράφονται έξι φάσματα, που αντιστοιχούν στις μέρες 0 έως 5.

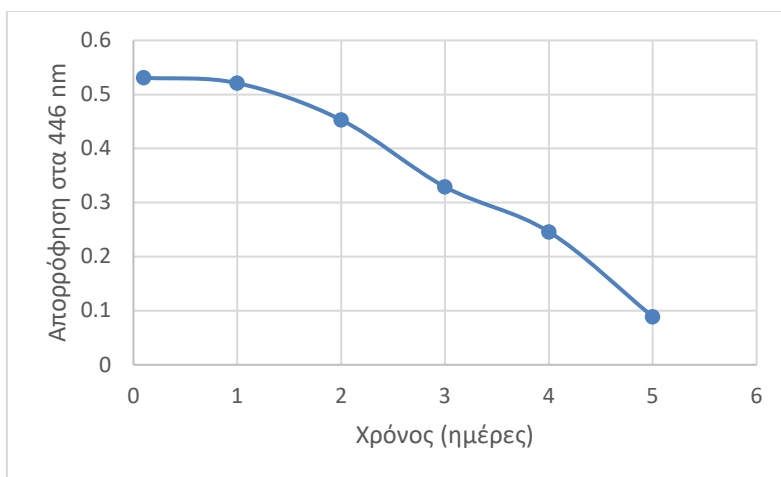


Εικόνα 23-Φάσματα απορρόφησης του σύμπλοκουΑβ-κουρκουμίνη για κάθε μια από τις μέρες των μετρήσεων

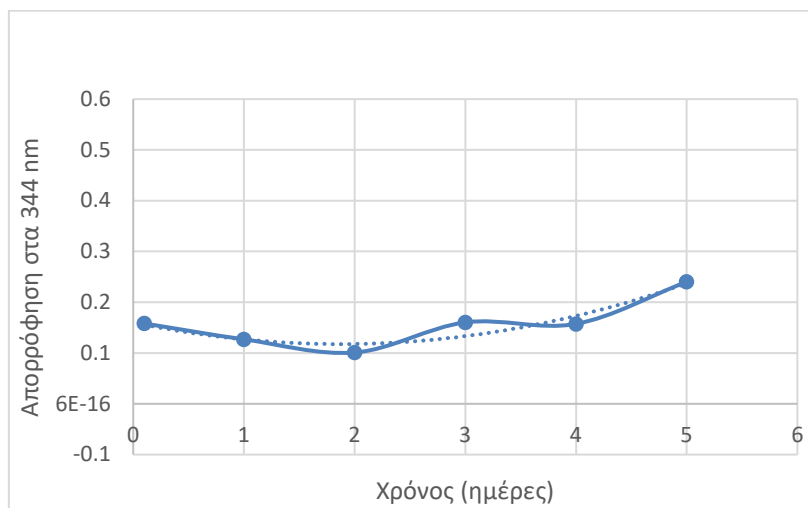
Παρακάτω, παρουσιάζονται τα διαγράμματα μεταβολής της απορρόφησης του σύμπλοκουΑβ-κουρκουμίνη σε σχέση με την πάροδο των ημερών, για τα 446 nm[Εικόνα 24] και 344nm[Εικόνα 25] καθώς και ένας πίνακας με τις αντίστοιχες τιμές (Πίνακας 3).

Ημέρα	Απορρόφηση στα 446 nm	Απορρόφηση στα 344nm
0	0,531	0,15819
1	0,521	0,127
2	0,453	0,101
3	0,329	0,1604
4	0,246	0,15744
5	0,089	0,24023

Πίνακας 3-Πίνακας σύγκρισης των μέγιστων τιμών απορρόφησης του σύμπλοκουΑβ-κουρκουμίνη ανά μέρα στα 446 nm και 344 nm



Εικόνα 24-Διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης με το χρόνο, για το σύμπλοκοΑβ-κουρκουμίνη στα 446 nm



Εικόνα 25-Διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης με το χρόνο, για το σύμπλοκοΑβ-κουρκουμίνη στα 344nm

6.1.2 Συμπεράσματα

Από τα διαγράμματα προκύπτει ότι η μέγιστη απορρόφηση του σύμπλοκουΑβ-κουρκουμίνη μεταβάλλεται με το πέρασμα του χρόνου με βάση την παρακάτω γραμμική εξίσωση (6.1) Στην πράξη, η μεταβολή αυτή αφορά στο σχηματισμό των συσσωματωμάτων και των ινιδίων του Αβ.

$$y = -0,091x + 0,592 \mu\epsilon R^2 = 0,949(6.1)$$

Επίσης, εξετάζοντας το διάγραμμα απορρόφησης, παρατηρείται ότι με την πάροδο του χρόνου, η κορυφή απορρόφησης μειώνεται και μετατοπίζεται προς τα αριστερά. Πιο αναλυτικά, η αρχική κορυφή απορρόφησης του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνης είναι στα 446 nm (μέρα 0), ενώ, μετά το πέρασμα των 5 ημερών, προκύπτει μια νεοεμφανιζόμενη κορυφή στα 344 nm (μέρα 5).

6.2 Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνης

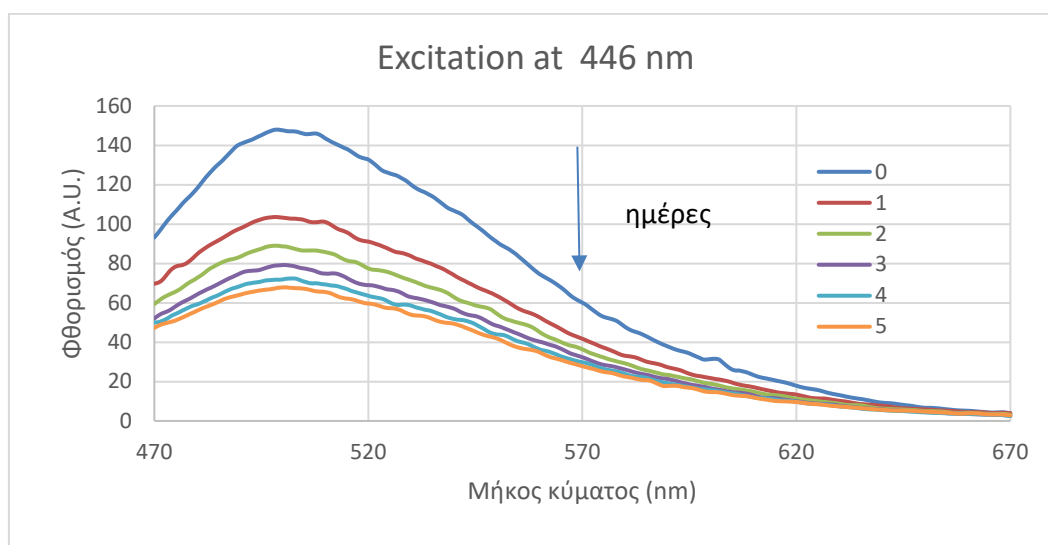
Όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, το διάλυμα από το οποίο πάρθηκαν οι μετρήσεις αποτελούνταν από διάλυμα PBS με αραιωμένο διαλυτό Αβ, στο οποίο μετά το πέρασμα των 5 ημερών είχαν δημιουργηθεί συσσωματώματα και ινίδια, και το διάλυμα της κουρκουμίνης. Έτσι, από το τελικό διάλυμα συλλέχθηκαν τα φάσματα φθορισμού για διάφορες ποσότητες του τελικού διαλύματος. Η μέτρηση των φασμάτων έγινε σε διάστημα 5 ημερών, όπου κάθε μέρα γινόταν λήψη των μετρήσεων.

Για τη λήψη των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin - Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer. Η διέγερση που επιλέχθηκε ήταν στα 446 nm και 334 nm, δηλαδή στα μήκη κύματος των δυο κορυφών που προέκυψαν από τη φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης κατά τη μέρα 0 και τη μέρα 5, αντίστοιχα.

6.2.1 Αποτελέσματα

Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα φθορισμού του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνης για τιμή διέγερσης στα 446 nm για κάθε μια από τις μέρες 0 έως 5 που πάρθηκαν οι μετρήσεις [Εικόνα 26]. Η μέρα 0 αφορά στη μέτρηση του φάσματος του φθορισμού του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνης, τη στιγμή που τα δυο διαλύματα αναμιχθηκαν. Σημειώνεται πως για τις μετρήσεις στα 446 nm καταγράφονται τα φάσματα και για τις 5 μέρες των μετρήσεων ενώ για τα 334 nm έχουν καταγραφεί μόνο για την μέρα 0, τη μέρα 3 και τη μέρα 5, αφού από το φάσμα απορρόφησης φαίνεται πως από την τρίτη μέρα αρχίζει να διαφοροποιείται σημαντικά το αποτέλεσμα. Η αλλαγή

αυτή οφείλεται στην έναρξη μετασχηματισμού της δομικής μορφής του διαλυτού Αβ σε συσσωματώματα και ινίδια.



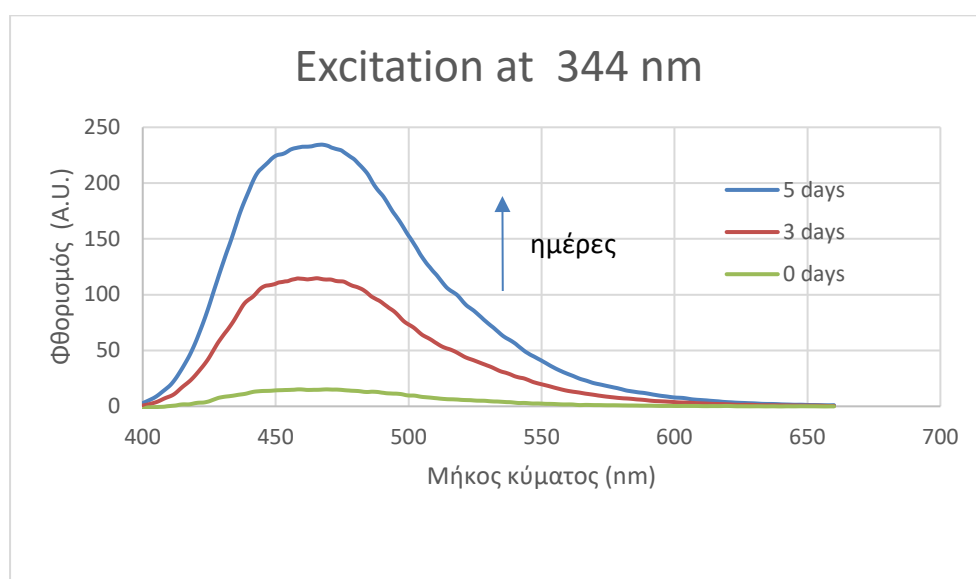
Εικόνα 26-Φάσματα φθορισμού του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη για κάθε μια από τις μέρες των μετρήσεων, με διέγερση στα 446 nm

Στη συνέχεια παρουσιάζεται ένας πίνακας με τις μέγιστες τιμές του φθορισμού για κάθε μια από τις μέρες των μετρήσεων καθώς και το μήκος κύματος που αντιστοιχούν [Πίνακας].

Ημέρα/ Διέγερση στα 446 nm	Μέγιστη τιμή φθορισμού	Μήκος κύματος (nm)
0	147,962	498,5
1	103,577	498,5
2	88,9999	498
3	79,2051	500,5
4	72,3735	502,5
5	67,8601	500,5

Πίνακας 4- Πίνακας καταγραφής των μέγιστων τιμών φθορισμού του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη για διέγερση στα 446 nm , για κάθε μια από τις μέρες των μετρήσεων

Το παρακάτω διάγραμμα [Εικόνα 27] αφορά στα φάσματα φθορισμού του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη για διέγερση στα 344 nm. Υπενθυμίζεται πως οι μετρήσεις φθορισμού για διέγερση στα 344 nm έχουν καταγραφεί μόνο για τη μέρα 0, τη μέρα 3 και τη μέρα 5 καθώς τότε αναμένεται η διαφοροποίηση στην ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού, σύμφωνα με τις μετρήσεις απορρόφησης που προηγήθηκαν.



Εικόνα 27-Φάσματα φθορισμού του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη για κάθε μια από τις μέρες 0,3 και 5, με διέγερση στα 344 nm

Στη συνέχεια παρουσιάζεται ένας πίνακας με τις μέγιστες τιμές του φθορισμού για κάθε μια τις μέρες των μετρήσεων 0,3 και 5 καθώς και το αντίστοιχο μήκος κύματος [Πίνακας 5].

Ημέρα/ Διέγερση στα 344 nm	Μέγιστη τιμή φθορισμού	Μήκος κύματος (nm)
0	15,1921	458,5
3	114,7485	465,5
5	234,4623	467,5

Πίνακας 5-Πίνακας καταγραφής των μέγιστων τιμών φθορισμού του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη για διέγερση στα 344 nm, για τις μέρες των μετρήσεων 0,3 και 5

6.2.2 Συμπεράσματα

Η φασματοσκοπική μελέτη του φθορισμού έγινε με τη διέγερση του συστήματος για δυο τιμές, στα 446 nm και 344 nm. Οι τιμές αυτές επιλέχθηκαν με βάση τις αντίστοιχες κορυφές

που προέκυψαν από τις μετρήσεις απορρόφησης του σύμπλοκου ΑΒ-κουρκουμίνη. Η μέγιστη τιμή του εκπεμπόμενου φθορισμού προκύπτει ύστερα από τη διέγερση του συστήματος με μήκος κύματος στα 344nm, με τη θέση του να τοποθετείται στα 467,5 nm. Στην περίπτωση διέγερσης των 446 nm, η μέγιστη τιμή του εκπεμπόμενου φθορισμού εμφανίζεται στα 498,5 nm. Συγκρίνοντας τα εξαγόμενα φάσματα φθορισμού, φαίνεται ότι με την πάροδο του χρόνου οι τιμές του εκπεμπόμενου φθορισμού μειώνονται στην περίπτωση διέγερσης με 446 nm ενώ αυξάνεται όταν πρόκειται για διέγερση στα 344nm.

7 Επίλογος

7.1 Συμπεράσματα

Η νόσος του Αλτσχάιμεραποτελεί τη συχνότερη νευροεκφυλιστική νόσο και θεωρείται και χαρακτηρίζεται ως η επιδημία του 21^{ου} αιώνα. Η αύξηση του προσδόκιμου ζωής οδηγεί μοιραία σε όλο ένα και περισσότερες περιπτώσεις ασθενών στο φάσμα της άνοιας ανά τον κόσμο, με συνέπειες που πλήττουν τόσο το υγειονομικό σύστημα όσο και την κοινωνικο-οικονομική κατάσταση των χωρών. Η καθιέρωση ευαίσθητων και ειδικών τεχνικών για την έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση της νόσου του Αλτσχάιμερ είναι απαραίτητη καθώς όσο νωρίτερα ξεκινήσει η θεραπευτική διαδικασία τόσο πιο αποτελεσματική θα είναι, αλλά, και παράλληλα μειώνεται το κόστος διάγνωσης, αποφεύγοντας τις περιττές εξετάσεις. Η σημασία των μη-επεμβατικών διαδικασιών έχει κερδίσει έδαφος, στοχεύοντας σε λιγότερο επώδυνες διαγνωστικές μεθόδους που θα είναι περισσότερο προσιτές στον κοινό. Η αναζήτηση αποδοτικών βιοδεικτών στρέφει το ενδιαφέρον της σταφυσιολογικά υγρά, όπως τα δάκρυα, ο ιδρώτας, η σίελος και τα ούρα.

Το δακρυϊκό υγρό, ως υπό εξέταση δείγμα, φαίνεται να αποτελεί μια εναλλακτική λύση για τον εντοπισμό βιοδεικτών που σχετίζονται με τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Βιβλιογραφικά, οι βιοδείκτες αυτοί χωρίζονται σε τέσσερις περιπτώσεις, αυτή του

Αβ πεπτιδίου, της πρωτεΐνης tau, του συνδυασμού των πρωτεϊνών LCN-1, DCD, LACRT, LYZ και του microRNA-200b-5p.

Στην παρούσα εργασία γίνεται μια πρώτη μελέτη για τη δυνατότητα εντοπισμού του Αβ πεπτιδίου στο δακρυϊκό δείγμα. Για το σκοπό αυτό, ως ανιχνευτής του Αβ χρησιμοποιήθηκε η κουρκουμίνη και μελετήθηκαν οι οπτικές της ιδιότητες, όσον αφορά στην απορρόφηση και στο φθορισμό, όταν ενώνεται με τα συσσωματώματα και τα ινίδια του πεπτιδίου.

Επιβεβαιώθηκε πως μετά των σχηματισμό των ινιδίων του Αβ, προκύπτει μια νεοεμφανιζόμενη κορυφή απορρόφησης σε διαφορετικό μήκος κύματος από αυτό της αρχικής ημέρας των μετρήσεων, όπως, επίσης, και διαφορετική συμπεριφορά κατά τον εκπεμπόμενο φθορισμό για διαφορετικές διεγέρσεις. Οι αλλαγές αυτές αξιοποιούνται στην επόμενη παράγραφο που προτείνεται ο σχεδιασμός δυο βιοαισθητήρων που εκμεταλλεύονται αυτές τις διαφοροποιήσεις των οπτικών ιδιοτήτων του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη, κατά των σχηματισμό συσσωματωμάτων και ινιδίων Αβ.

7.2 Προτεινόμενος σχεδιασμός βιοαισθητήρα

Με βάση όσα μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, προκύπτουν αισιόδοξα συμπεράσματα που επιτρέπουν τον αρχικό σχεδιασμό βιοαισθητήρων ανίχνευσης του πεπτιδίου Αβ στο δακρυϊκό υγρό. Η ιδέα των συγκεκριμένων αισθητήρων βασίζεται σε όσα προέκυψαν από την φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης και φθορισμού του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη σε σχέση με την πάροδο του χρόνου. Τα κομβικά σημεία της πειραματικής διαδικασίας, είναι πως με το πέρασμα των ημερών επιβεβαιώνεται το γεγονός ότι το διαλυτό Αβ παίρνει τη μορφή συσσωματωμάτων και ινιδίων, γεγονός που οδηγεί στη μετατόπιση της κορυφής απορρόφησης από τα 446nm στα 344nm αλλά και στη μείωσή της. Επιπλέον, αναφορικά με τον εκπεμπόμενο φθορισμό, υπενθυμίζεται πως με διέγερση στα 446nm, η έντασή του μειώνεται, ενώ, η ελάττωση της διέγερσης στα 334nm προκαλεί την αύξησή του, στη μελέτη του ως προς το χρόνο.

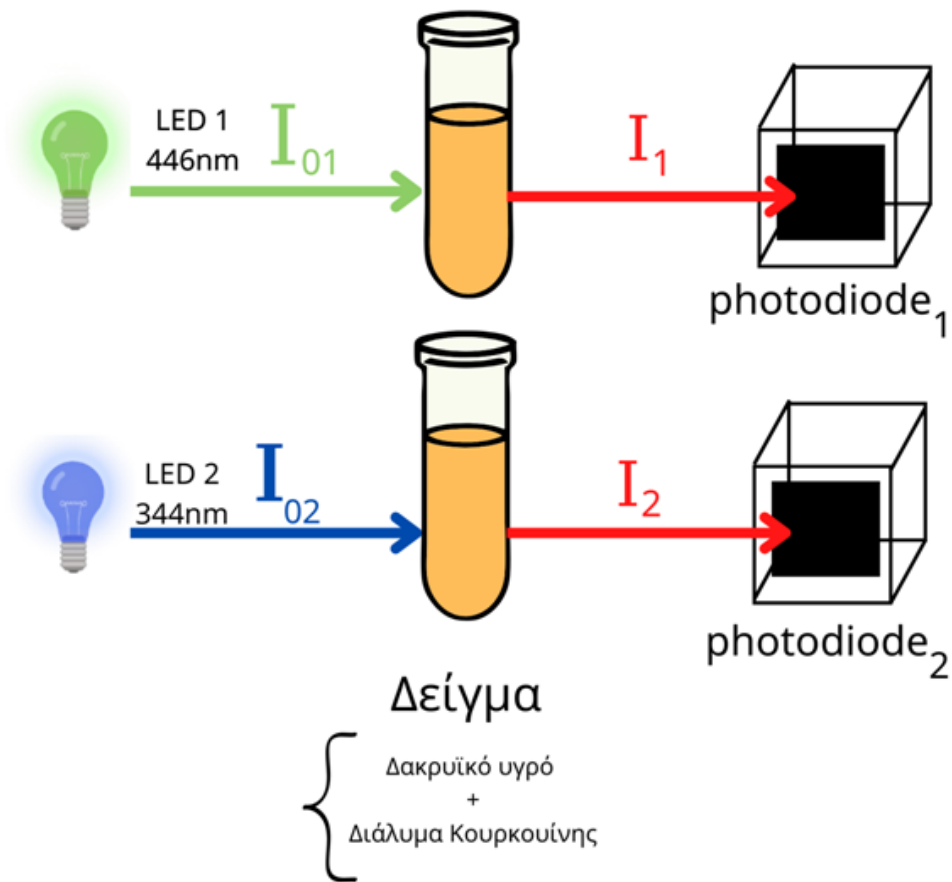
Ανάλογα με την φασματοσκοπική προσέγγιση που επιλέγεται, δηλαδή αν πρόκειται για απορρόφηση ή φθορισμό, προτείνονται οι δυο παρακάτω ιδέες σχεδιασμού του αντίστοιχου αισθητήρα.

7.2.1 Αισθητήρας απορρόφησης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που εξάχθηκαν από την πειραματική διαδικασία, ήδη από την τρίτη μέρα των μετρήσεων παρατηρείται μια πτώση της κορυφής απορρόφησης του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη, σε σχέση με την αρχική κορυφή στα 446 nm. Τελικά, την πέμπτη μέρα όπου ολοκληρώνεται ο σχηματισμός των ινιδίων προκύπτει μια νεοεμφανιζόμενη κορυφή στα 344 nm.

Ο σχεδιασμός ενός οπτικού αισθητήρα εντοπισμού του Αβ, μπορεί να εκμεταλλευτεί αυτές τις δυο κορυφές ώστε να μπορεί να καταδείξει την ύπαρξη ή όχι του πεπτιδίου Αβ στα υδατικά στο δακρυϊκό δείγμα.

Έτσι, επιλέγονται δυο φωτεινές φωτοεκπέμπουσες δίοδοι LED (Light Emitting Diode, LED) στα επιθυμητά μήκη κύματος, δηλαδή ένα LED στα 344 nm και ένα δεύτερο LED και 446 nm ως πηγές ακτινοβολίας του υπό εξέταση δείγματος, οι οποίες ενεργοποιούνται σειριακά, ώστε να μετρηθούν οι αντίστοιχες τιμές απορρόφησης από τις φωτοδιόδους (Σχήμα).



Εικόνα 28-Προτεινόμενη διάταξη αισθητήρα απορρόφησης

Η σχέση που συνδέει την απορρόφηση με την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και την ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας περιγράφεται από την παρακάτω σχέση(Νόμος των Lambert – Beer)(7.1).

$$A = \log \frac{I_0}{I} (7.1)$$

όπου A η απορρόφηση, I_0 η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και I η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας.

Ο θεωρητικός υπολογισμός της απορρόφησης A δίνεται από τη εξής σχέση (7.2).

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c (7.2)$$

όπου ϵ η μοριακή απορροφητικότητα, b το πάχος της κυβέτας και c η συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας

Για λόγους πληρότητας, σημειώνεται πως ο λόγος $T = \frac{I_0}{I}$ ονομάζεται διαπερατότητα.

Συνεπώς ισχύει η σχέση (7.3).

$$A = \log T \Rightarrow \frac{I_0}{I} = 10^{-A} \quad (7.3)$$

Έτσι, για κάθε ένα από τα LEDακτινοβολήσης προκύπτει η αντίστοιχη τιμή του A .

Άρα θα είναι

$$A_1 = \log \frac{I_{01}}{I} \quad (7.4)$$

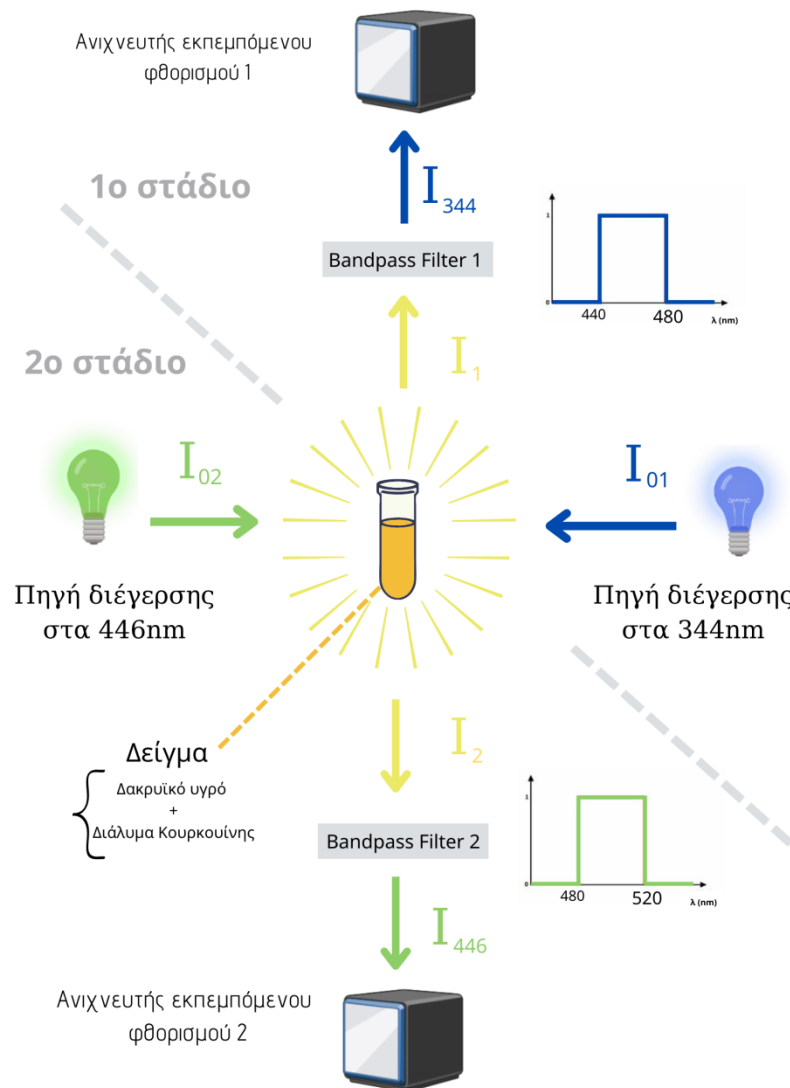
$$A_2 = \log \frac{I_{02}}{I} \quad (7.5)$$

Με το πέρας των μετρήσεων της απορρόφησης A_1 και A_2 η διαδικασία ολοκληρώνεται με τον υπολογισμό του λόγου $\frac{A_1}{A_2}$. Με την πρακτική αυτή προωθείται ο καθορισμός της τιμής ενός κατωφλίου (threshold) ώστε να μπορεί να αποδειχθεί η παρουσία ή η απουσία των πεπτιδίων του Αβ στο υπό εξέταση δείγμα. Στην περίπτωση όπου η τιμή του λόγου $\frac{A_1}{A_2}$ είναι μεγάλη συνεπάγεται πως στο δακρυϊκό δείγμα δεν υπάρχουν ινίδια του Αβ ενώ όταν η τιμή του γίνει μικρή τότε αποδεικνύεται η ύπαρξη ινιδίων και συσσωματωμάτων Αβ στο δείγμα.

7.2.2 Αισθητήρας φθορισμού

Στην περίπτωση αυτή, ο προτεινόμενος αισθητήρας στηρίζεται στην τυπική διαδικασία των μετρήσεων φθορισμού. Συγκεκριμένα, προτείνεται η επιλογή δυο πηγών διέγερσης στα μήκη κύματος 446 nm και 344nm, αντίστοιχα. Η επιλογή των τιμών αυτών προέκυψε από τα μήκη κύματος των κορυφών απορρόφησης του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη κατά την αρχική και τελική ημέρα των μετρήσεων, αντίστοιχα. Οι δυο αυτές φωτεινές πηγές τοποθετούνται σε γωνία 90° σε σχέση με τον ανιχνευτή του εκπεμπόμενου φθορισμού. Η διάταξη αυτή, είναι απαραίτητο να υλοποιηθεί με αυτή την παράμετρο, έτσι ώστε, ο ανιχνευτής να μην καταγράφει την

ένταση της ακτινοβολίας των πηγών διέγερσης. Το φαινόμενο του φθορισμού είναι ισοτροπικό, συνεπώς, ο ανιχνευτής έχοντας τη θέση αυτή, θα μπορεί να συλλέξει το εκπεμπόμενο σήμα. Στο παρακάτω σχήμα παρατίθεται η προτεινόμενη πειραματική διάταξη [Εικόνα 29].



Εικόνα 29-Προτεινόμενη διάταξη αισθητήρα φθορισμού

Πιο αναλυτικά, οι μετρήσεις του αισθητήρα αυτού, προβλέπεται να γίνονται σε δυο στάδια και σημειώνεται ότι το υπό εξέταση δείγμα, τοποθετείται στο κέντρο της συνολικής διάταξης. Κατά το πρώτο στάδιο θα είναι ενεργή μια μόνο φωτεινή πηγή. Χωρίς βλάβη της γενικότητας, θεωρείται ότι αρχικά ενεργοποιείται η πηγή ακτινοβολίας των 344 nm που βρίσκεται σε γωνία 0° σε σχέση με το σημείο τοποθέτησης του δείγματος. Επόμενο βήμα, είναι η μέτρηση του εκπεμπόμενου

φθορισμού από το υπό εξέταση δείγμα του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη από τον ανιχνευτή που βρίσκεται σε γωνία 90° σε σχέση με δείγμα και την πηγή. Πριν τον ανιχνευτή τοποθετείται ένα ζωνοπερατό φίλτρο (bandpassfilter). Το εύρος του, επιλέγεται να είναι από τα 440 nm έως τα 480 nm. Η επιλογή αυτή κρίνεται κατάλληλη αφού σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας, η μέγιστη τιμή του εκπεμπόμενου φθορισμού αναμένεται να είναι στα 467,5 nm.

Στο δεύτερο στάδιο, προτείνεται η υλοποίηση μιας πανομοιότυπης διάταξης. Στην περίπτωση αυτή ενεργοποιείται η φωτεινή πηγή των 446 nm που βρίσκεται σε γωνία 180° και ο ανιχνευτής του εκπεμπόμενου φθορισμού σε γωνία -90° σε σχέση με το δείγμα. Τώρα, το ζωνοπερατό φίλτρο επιλέγεται με εύρος από 480 nm έως 520 nm καθώς σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας, η μέγιστη τιμή του εκπεμπόμενου φθορισμού αναμένεται να είναι στα 498,5 nm.

Με το πέρας των μετρήσεων των δυο τιμών έντασης του φθορισμού, I_{446} και I_{344} , η διαδικασία ολοκληρώνεται με τον υπολογισμό του λόγου των εντάσεων $\frac{I_{446}}{I_{344}}$. Η συγκεκριμένη πρακτική βοηθά στο να οριστεί ένα ενδεικτικό κατώφλι για την ύπαρξη του Αβ πεπτιδίου στο υπό εξέταση δείγμα. Η τιμή του λόγου $\frac{I_{446}}{I_{344}}$ αναμένεται να έχει μικρή τιμή όταν στο διάλυμα εμπεριέχεται Αβ αφού με την πάροδο των ημερών, όπου ολοκληρώνεται ο προβλεπόμενος χρόνος για τον σχηματισμό των ινιδίων του Αβ, η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού I_{446} μειώνεται ενώ η I_{344} αυξάνεται, όπως έχει προκύψει από την πειραματική μελέτη της εργασίας. Επιπλέον, με τον υπολογισμό του $\frac{I_{446}}{I_{344}}$ απαλείφεται το ποσοστό του πιθανού θορύβου ή της ενίσχυσης που προέρχεται από τον χρησιμοποιούμενο εξοπλισμό, οδηγώντας, τελικά, σε ένα πιο αξιόπιστο συμπέρασμα.

7.3 Συζήτηση-Μελλοντικές προοπτικές

Τα αποτελέσματα που εξάγονται στην παρούσα μελέτη δίνουν έδαφος για περαιτέρω έρευνα σχετικά με την αναζήτηση νέων μεθόδων για την πρόληψη διάγνωση της νόσου του Αλτσχάιμερ. Η επιλογή του δακρυϊκού υγρού ως το υπό

εξέταση δείγμα φαίνεται να είναι αρκετά αποδοτική, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που εξάχθηκαν από τη φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης και φθορισμού του σύμπλοκου Αβ-κουρκουμίνη σε υδατικά διαλύματα.

Φυσικά, είναι εξέχουσας σημασίας να διερευνηθεί το κατά πόσο τελικά το πεπτίδιο Αβ αποτελεί έναν αποδοτικό βιοδείκτη και δη η έκφραση του στο δακρυϊκό υγρό, με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα. Υπογραμμίζεται ξανά, πως για τη νόσο του Αλτσχάιμερ, οι βιοδείκτες χρειάζεται να έχουν ευαισθησία περί του 85% και ειδικότητα περί του 75% σε σχέση με τις άλλες νόσους.

Περνώντας στο σχολιασμό των προτεινόμενων αισθητήρων, και στις δυο περιπτώσεις, υπάρχουν ανοιχτά ερωτήματα τα οποία είναι απαραίτητο να διευκρινιστούν πριν τις εν λόγω κατασκευές. Συγκεκριμένα, το πρώτο θέμα που προκύπτει αφορά το βιολογικό δείγμα, το οποίο έχει επιλεγεί να είναι τα δάκρυα. Είναι κομβικής σημασίας ζήτημα να οριστεί ο ελάχιστος όγκος δακρυϊκού υγρού για τον οποίο μπορούν να υλοποιηθούν οι μετρήσεις απορρόφησης και φθορισμού.

Επόμενη πτυχή που χρήζει αποσαφήνισης είναι ο ορισμός των τιμών των κατωφλίων. Οι περιορισμένες μετρήσεις της παρούσας εργασίας δεν επιτρέπουν το καθορισμό των τιμών αυτών αλλά μόνο τον ποιοτικό τους σχολιασμό.

Φυσικά, όλων τα παραπάνω, συμπεριλαμβανομένων και της μελέτης των τεχνικών χαρακτηριστικών που προκύπτουν από τους προτεινόμενους αισθητήρες, προηγείται η εξαγωγή των αντίστοιχων φασματοσκοπικών μετρήσεων απορρόφησης και φθορισμού σε δακρυϊκό υγρό ασθενών και μαρτύρων ώστε να καταγραφούν λεπτομερώς οι διαφορές στα φάσματά τους.

Βιβλιογραφία

- [1] S. Liu, S. Liu, W. Cai, S. Pujol, R. Kikinis, and D. Feng, “Early diagnosis of Alzheimer’s disease with deep learning,” in *2014 IEEE 11th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*, Apr. 2014, pp. 1015–1018. doi: [10.1109/ISBI.2014.6868045](https://doi.org/10.1109/ISBI.2014.6868045).
- [2] L. M. T. Phan *et al.*, “Nanomaterial-based Optical and Electrochemical Biosensors for Amyloid beta and Tau: Potential for early diagnosis of Alzheimer’s Disease,” *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 21, no. 2, pp. 175–193, Feb. 2021, doi: [10.1080/14737159.2021.1887732](https://doi.org/10.1080/14737159.2021.1887732)
- [3] “Η άνοια και η νόσος Αλτσχάιμερ: Η επιδημία του 21ου αιώνα.,” *AlzheimerAthens*. <https://alzheimerathens.gr/i-ania-ke-i-nosos-alzheimer-i-epidimia-tou-21ou-eona/> (accessed Oct. 20, 2021).
- [4] ‘Νόσος Alzheimer (Αλτσχάιμερ): συμπτώματα, στάδια, αίτια, θεραπεία’, *Ανδρέας Μούστρης Νευρολόγος, MSc - Neurologos.gr*. <https://neurologos.gr/alzheimer-symptomata-stadia-aitia-therapeia/> (ημερομηνία πρόσβασης 13 Νοέμβριος 2022).
- [5] Α. Μούστρης, “Νόσος Alzheimer (Αλτσχάιμερ): συμπτώματα, στάδια, αίτια, θεραπεία – Neurologos.gr.” <https://neurologos.gr/alzheimer-symptomata-stadia-aitia-therapeia/> (accessed Oct. 18, 2021).
- [6] Y. Ihara, N. Nukina, R. Miura, and M. Ogawara, “Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer’s disease,” *J Biochem*, vol. 99, no. 6, pp. 1807–1810, Jun. 1986, doi: [10.1093/oxfordjournals.ibchem.a135662](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.ibchem.a135662)
- [7] K. Stott, J. M. Blackburn, P. J. Butler, and M. Perutz, “Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: implications for neurodegenerative diseases.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, no. 14, pp. 6509–6513, Jul. 1995.
- [8] J. Näslund *et al.*, “Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline,” *JAMA*, vol. 283, no. 12, pp. 1571–1577, Mar. 2000, doi: [10.1001/jama.283.12.1571](https://doi.org/10.1001/jama.283.12.1571)

- [9] H. Zetterberg, 'Review: Tau in biofluids – relation to pathology, imaging and clinical features', *Neuropathology and Applied Neurobiology*, τ. 43, τχ. 3, σσ. 194–199, 2017, doi: [10.1111/nan.12378](https://doi.org/10.1111/nan.12378).
- [10] K. Strimbu and J. A. Tavel, "What are Biomarkers?," *Curr Opin HIV AIDS*, vol. 5, no. 6, pp. 463–466, Nov. 2010, doi: [10.1097/COH.0b013e32833ed177](https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177)
- [11] C. R. Jack *et al.*, "Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease," *Alzheimers Dement*, vol. 7, no. 3, pp. 257–262, May 2011, doi: [10.1016/j.jalz.2011.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.004)
- [12] H. Hampel, K. Bürger, S. J. Teipel, A. L. W. Bokde, H. Zetterberg, and K. Blennow, "Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease," *Alzheimers Dement*, vol. 4, no. 1, pp. 38–48, Jan. 2008, doi: [10.1016/j.jalz.2007.08.006](https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.08.006)
- [13] E. Ausó, V. Gómez-Vicente, και G. Esquivá, 'Biomarkers for Alzheimer's Disease Early Diagnosis', *Journal of Personalized Medicine*, τ. 10, τχ. 3, Art. τχ. 3, Σεπτεμβρίου 2020, doi: [10.3390/jpm10030114](https://doi.org/10.3390/jpm10030114).
- [14] [16] M. C. Edman *et al.*, "Tears – more to them than meets the eye: why tears are a good source of biomarkers in Parkinson's disease," *Biomarkers in Medicine*, vol. 14, no. 2, pp. 151–163, Feb. 2020, doi: [10.2217/bmm-2019-0364](https://doi.org/10.2217/bmm-2019-0364)
- [15] A. H. Rantamäki, T. Seppänen-Laakso, M. Oresic, M. Jauhiainen, and J. M. Holopainen, "Human Tear Fluid Lipidome: From Composition to Function," *PLOS ONE*, vol. 6, no. 5, p. e19553, 2011, doi: [10.1371/journal.pone.0019553](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019553)
- [16] A. Król-Grzymała, E. Sienkiewicz-Szłapka, E. Fiedorowicz, D. Rozmus, A. Cieślińska, και A. Grzybowski, 'Tear Biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's Diseases, and Multiple Sclerosis: Implications for Diagnosis (Systematic Review)', *Int J Mol Sci*, τ. 23, τχ. 17, σ. 10123, Σεπτεμβρίου 2022, doi: [10.3390/ijms231710123](https://doi.org/10.3390/ijms231710123).

- [17] J. H. M. Quah, L. Tong, και S. Barbier, 'Patient Acceptability of Tear Collection in the Primary Healthcare Setting', *Optom Vis Sci*, τ. 91, τχ. 4, σσ. 452–458, Απριλίου 2014, doi: [10.1097/OPX.000000000000188](https://doi.org/10.1097/OPX.000000000000188)
- [18] A. Posa, L. Bräuer, M. Schicht, F. Garreis, S. Beileke, και F. Paulsen, 'Schirmer strip vs. capillary tube method: Non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid', *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, τ. 195, τχ. 2, σσ. 137–142, Μαρτίου 2013, doi: [10.1016/j.aanat.2012.10.001](https://doi.org/10.1016/j.aanat.2012.10.001).
- [19] Y.-R. Wang κ.ά., 'High-Sensitivity and Trace-Amount Specimen Electrochemical Sensors for Exploring the Levels of β -Amyloid in Human Blood and Tears', *Analytical Chemistry*, Δεκεμβρίου 2021, doi: [10.1021/acs.analchem.0c04980](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04980).
- [20] R. C. Tseng, C.-C. Chen, S.-M. Hsu, και H.-S. Chuang, 'Contact-Lens Biosensors', *Sensors*, τ. 18, τχ. 8, Art. τχ. 8, Αυγούστου 2018, doi: [10.3390/s18082651](https://doi.org/10.3390/s18082651).
- [21] M. Gijs *et al.*, "Detection of amyloid-beta and tau in tear fluid of patients with Alzheimer's disease," In Review, preprint, Jun. 2020. doi: [10.21203/rs.3.rs-36499/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-36499/v1)
- [22] A. F. Bălașa, C. Chircov, and A. M. Grumezescu, "Body Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease—An Up-To-Date Overview," *Biomedicines*, vol. 8, no. 10, p. 421, Oct. 2020, doi: [10.3390/biomedicines8100421](https://doi.org/10.3390/biomedicines8100421)
- [23] A. Kenny *et al.*, "Proteins and microRNAs are differentially expressed in tear fluid from patients with Alzheimer's disease," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 15437, Oct. 2019, doi: [10.1038/s41598-019-51837-y](https://doi.org/10.1038/s41598-019-51837-y)
- [24] S. Del Prete κ.ά., 'Tear Liquid for Predictive Diagnosis of Alzheimer's Disease', *Reports*, τ. 4, τχ. 3, Art. τχ. 3, Σεπτεμβρίου 2021, doi: [10.3390/reports4030026](https://doi.org/10.3390/reports4030026).
- [25] M. Gijs κ.ά., 'Association of tear fluid amyloid and tau levels with disease severity and neurodegeneration', *Sci Rep*, τ. 11, τχ. 1, Art. τχ. 1, Νοεμβρίου 2021, doi: [10.1038/s41598-021-01993-x](https://doi.org/10.1038/s41598-021-01993-x).
- [26] B. Nizynski, W. Dzwolak, και K. Nieznanski, 'Amyloidogenesis of Tau protein', *Protein Science*, τ. 26, τχ. 11, σσ. 2126–2150, 2017, doi: [10.1002/pro.3275](https://doi.org/10.1002/pro.3275).

- [27] B. Shui, D. Tao, J. Cheng, Y. Mei, N. Jaffrezic-Renault, και Z. Guo, 'A novel electrochemical aptamer–antibody sandwich assay for the detection of tau-381 in human serum', *Analyst*, τ. 143, τχ. 15, σσ. 3549–3554, 2018, doi: [10.1039/C8AN00527C](https://doi.org/10.1039/C8AN00527C).
- [28] G. Kallók.ά., 'Changes in the Chemical Barrier Composition of Tears in Alzheimer's Disease Reveal Potential Tear Diagnostic Biomarkers', *PLOS ONE*, τ. 11, τχ. 6, σ. e0158000, Μαΐου 2016, doi: [10.1371/journal.pone.0158000](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158000).
- [29] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, και P. Estrela, 'Introduction to biosensors', *Essays Biochem*, τ. 60, τχ. 1, σσ. 1–8, Ιουνίου 2016, doi: [10.1042/EBC20150001](https://doi.org/10.1042/EBC20150001).
- [30] Γ.Ασημέλλης, Μαθήματα Οπτικής, Σύγχρονη γνώση, 2006
- [31] M. Xu, W. Ren, X. Tang, Y. Hu, και H. Zhang, 'Advances in development of fluorescent probes for detecting amyloid-β aggregates', *Acta Pharmacol Sin*, τ. 37, τχ. 6, Art. τχ. 6, Ιουνίου 2016, doi: [10.1038/aps.2015.155](https://doi.org/10.1038/aps.2015.155).
- [32] L. Wang και X. Mao, 'Role of Retinal Amyloid-β in Neurodegenerative Diseases: Overlapping Mechanisms and Emerging Clinical Applications', *International Journal of Molecular Sciences*, τ. 22, τχ. 5, Art. τχ. 5, Ιανουαρίου 2021, doi: [10.3390/ijms22052360](https://doi.org/10.3390/ijms22052360).
- [33] A. Goel, A. B. Kunnumakkara, και B. B. Aggarwal, 'Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic', *Biochemical Pharmacology*, τ. 75, τχ. 4, σσ. 787–809, Φεβρουαρίου 2008, doi: [10.1016/j.bcp.2007.08.016](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.08.016).
- [34] P. Anand, A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman, και B. B. Aggarwal, 'Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises', *Mol. Pharmaceutics*, τ. 4, τχ. 6, σσ. 807–818, Δεκεμβρίου 2007, doi: [10.1021/mp700113r](https://doi.org/10.1021/mp700113r).
- [35] B. B. Aggarwal, C. Sundaram, N. Malani and H. Ichikawa, «CURCUMIN: THE INDIAN SOLID GOLD,» ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, vol. 595, pp. 1- 75, 2007.

- [36] B. Aggarwal, A. Kumar, και A. Bharti, ‘Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies’, *Anticancer research*, τ. 23, σσ. 363–98, Νοεμβρίου 2002.
- [37] ‘PerkinElmer_Lambda35_manual_EN.’ [Ηλεκτρονικό] Available: https://people.bath.ac.uk/gp304/uv/PerkinElmer_Lambda35_manual_EN.pdf (ημερομηνία πρόσβασης 14 Νοέμβριος 2022).
- [38] ‘Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer User’s Guide ‘ [Ηλεκτρονικό] Available: <https://www.s4science.at/wordpress/wp-content/uploads/2019/04/LS-45-Users-Guide.pdf> (ημερομηνία πρόσβασης 14 Νοέμβριος 2022).
- [39] ‘PBS (Phosphate Buffered Saline) (1X, pH 7.4) Preparation and Recipe | AAT Bioquest’. <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/pbs-phosphate-buffered-saline> (ημερομηνία πρόσβασης 14 Νοέμβριος 2022).
- [40] S. M. Gouveia και J. M. Tiffany, ‘Human tear viscosity: An interactive role for proteins and lipids’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, τ. 1753, τχ. 2, σσ. 155–163, Δεκεμβρίου 2005, doi: [10.1016/j.bbapap.2005.08.023](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.023).