



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ

ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ & ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ

**ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ & ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ**

Μέτρηση οπτικών ιδιοτήτων υγιών και καρκινικών επιδερμικών κυττάρων

Θεώνη Ε. Πρασίνου

Επιβλέπων Καθηγητής: Ευάγγελος Β. Χριστοφόρου

Αθήνα, Ιούλιος 2024



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ

ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ & ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ

**ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ & ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ**

Μέτρηση οπτικών ιδιοτήτων υγιών και καρκινικών επιδερμικών κυττάρων

Θεώνη Ε. Πρασίνου

Επιβλέπων Καθηγητής: Ευάγγελος Β. Χριστοφόρου

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή στις

.....
Ευάγγελος Χριστοφόρου
Καθηγητής ΕΜΠ

.....
Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος
Καθηγητής ΕΜΠ

.....
Ελένη Αλεξανδράτου,
ΕΔΙΠ Α΄

Αθήνα, 11 Ιουλίου 2024

.....

Θεώνη Ε. Πρασίνου

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

Copyright © Θεώνη Πρασίνου, 2024.

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.

Ευχαριστίες

Αρχικά ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Ευάγγελο Χριστοφόρου για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα ανοίγοντας μου νέα πεδία μελέτης. Όπως και την κα Ελένη Αλεξανδράτου για την πολύτιμη βοήθεια, στήριξη και υπομονή της καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Εξίσου θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα, Φίλιππο Παντελεάκη, για την καθοδήγησή του και την διάθεση που είχε να με βοηθήσει πάντοτε. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την ολόπλευρη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Αθήνα, Ιούνιος 2024

Θεώνη Πρασίνου

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των οπτικών ιδιοτήτων, συγκεκριμένα της απορρόφησης και του αυτοφθορισμού, υγιών και καρκινικών επιδερμικών κυττάρων. Από τη μελέτη αυτή αναμένεται να εντοπιστούν διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα δύο είδη κυττάρων οι οποίες στη συνέχεια να αξιοποιηθούν για διαγνωστικούς σκοπούς. Η προτεινόμενη μεθοδολογία αποτελεί μία γρήγορη και μη επεμβατική τεχνική η οποία αναμένεται να βελτιώσει την ποιότητα ζωής των ασθενών και να μειώσει την χρονική και οικονομική επιβάρυνση του συστήματος υγείας.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 2 ειδικά κατασκευασμένα φασματοφωτόμετρα απορρόφησης και φθορισμού τα οποία έχουν αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικών Αισθητηρίων. Το πρώτο φασματοφωτόμετρο μπορεί να συλλέξει τόσο φάσμα απορρόφησης (415 nm – 680 nm) όσο και φθορισμού για διέγερση στα 405 nm, ενώ το δεύτερο μπορεί να συλλέξει αναλυτικό φάσμα φθορισμού για διέγερση στα 260 και 270 nm. Εκτός από την πραγματοποίηση των κυτταρικών μετρήσεων, τα δύο φασματοφωτόμετρα αξιολογήθηκαν ως προς την επαναληψιμότητα τους και κρίθηκαν αρκετά αξιόπιστα.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις των υγιών με τα καρκινικά επιδερμικά κύτταρα τόσο ως προς την απορρόφηση όσο και ως προς το φθορισμό. Οι διαφοροποιήσεις εντοπίζονται σε διαφορετικό φασματικό περιεχόμενο αλλά και διαφορετικές εντάσεις απορρόφησης και φθορισμού.

Συγκεκριμένα, η απορρόφηση των καρκινικών κυττάρων είναι πενταπλάσια αυτής των υγιών στα 555nm. Όσο για τον φθορισμό για διέγερση στα 405nm τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αυτοφθορισμό με μέγιστη τιμή στα 590nm ενώ για τα υγιή η μέτρηση δεν μπορεί να ληφθεί υπόψιν καθώς οι τιμές φθορισμού είναι ασθενείς και συγκρίσιμες με τον θόρυβο του οργάνου, γεγονός που αποτελεί ένδειξη διαφοροποίησης μεταξύ των υγιών με τα καρκινικά κύτταρα για την συγκεκριμένη διέγερση.

Για τις μετρήσεις με το δεύτερο φασματοφωτόμετρο, για διέγερση στα 260nm παρατηρήθηκε διπλάσιος φθορισμός των υγιών σε σχέση με τα καρκινικά κύτταρα στα 305nm όπου μεγιστοποιείται ο φθορισμός και για τα δύο είδη κυττάρων. Ενώ το φάσμα είναι στενό, στα 55nm, για τα καρκινικά και διπλάσιο, στα 100nm, για τα υγιή. Για διέγερση στα 270nm ο φθορισμός των υγιών πενταπλασιάζεται σε σχέση με τον φθορισμό των καρκινικών ενώ και εδώ το φάσμα φθορισμού είναι εντοπισμένο για τα καρκινικά κύτταρα, με εύρος 60nm, και για τα υγιή είναι στα 80nm.

Από τις μετρήσεις αυτές μπορούν να εξαχθούν σημαντικοί βιοδείκτες για τη γρήγορη οικονομική και μη επεμβατική διάγνωση δερματικού καρκίνου.

Λέξεις-κλειδιά: αυτοφθορισμός, απορρόφηση, καρκινικά κύτταρα, επιδερμικά κύτταρα

Abstract

The purpose of this thesis is to study the optical properties, specifically absorption and autofluorescence, of healthy and cancerous epidermal cells. This study is expected to identify differences between these two types of cells which can then be used for diagnostic purposes. The proposed methodology is a fast and non-invasive technique which is expected to improve the quality of life of patients and reduce the time and financial burden of the health system.

In the present study, two custom-made absorption and fluorescence spectrophotometers, which developed in the Electronic Sensors' Laboratory, were used. The first spectrophotometer can collect both absorption (415 nm – 680 nm) and fluorescence spectra for excitation at 405 nm, while the second one can collect analytical fluorescence spectra for excitation at 260 and 270 nm. In addition, the two spectrophotometers were evaluated for their repeatability and found to be quite reliable.

The results of the measurements showed significant differences between healthy and cancerous epidermal cells both in terms of absorbance and fluorescence. The differences are found both in spectral content but also at absorption and fluorescence intensities.

In particular, the absorption of cancer cells is five times more intense than that of healthy cells at 555nm. As for fluorescence, for excitation at 405nm, cancer cells show autofluorescence with a maximum value at 590nm, while for healthy cells the measurement cannot be taken into account as the fluorescence values are comparable to the noise of the instrument, which is an indication of differentiation between healthy and cancer cells.

For measurements conducted with the second spectrophotometer, for excitation at 260nm, the fluorescence of healthy cells is double compared to fluorescence of cancer cells. While the spectrum is narrow, at 55nm, for cancerous cells and twice as long, at 100nm, for healthy ones. For excitation at 270nm, the fluorescence of healthy cells increases fivefold compared to the fluorescence of cancer cells, while again the fluorescence spectrum is narrow for cancer cells, with a range of 60nm, and for healthy cells it is at 80nm.

Considering the above, important biomarkers can be derived from these measurements leading to economic and non-invasive diagnosis of skin cancer.

Keywords: autofluorescence, absorption, cancer cells, epidermal cells

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	7
Θεωρητικό μέρος	10
1.1 Απορρόφηση.....	11
1.2 Διάγραμμα Jablonski.....	12
1.3 Φθορισμός.....	14
1.4 Οπτικές ιδιότητες καρκινικών και υγιών κυττάρων.....	22
1.5 Ιδανικό φασματοφωτόμετρο φθορισμού.....	30
Πειραματικό μέρος	39
2.1 Οργανολογία μέτρησης.....	40
2.1.1 Ειδικά κατασκευασμένο φασματοφωτόμετρο εργαστηρίου (Pi-Lab).....	41
2.1.2 Ειδικά κατασκευασμένο αναλυτικό Φασματομέτρο φθορισμού με διέγερση στα 260 και 270nm με τη χρήση LED.....	45
2.2 Δείγματα.....	47
2.2.1 Υγιή κύτταρα.....	47
2.2.2 Καρκινικά κύτταρα.....	47
Αποτελέσματα-Συμπεράσματα	49
3.1 Αποτελέσματα για μετρήσεις μέσω Pi-Lab.....	50
3.1.1 Απορρόφηση.....	50
3.1.2 Φθορισμός με διέγερση στα 405nm.....	53
3.2 Αποτελέσματα για μετρήσεις μέσω του LED Φασματοφωτόμετρου 260-270nm.....	56
3.2.1 Φασματικές μετρήσεις φθορισμού υγιών και καρκινικών κυττάρων για διέγερση στα 260nm.....	56
3.2.2 Φασματικές μετρήσεις φθορισμού υγιών και καρκινικών κυττάρων για διέγερση στα 270nm.....	60
Προεκτάσεις/Μελλοντική έρευνα	65

Θεωρητικό μέρος

1.1 Απορρόφηση

Η απορρόφηση είναι η διαδικασία όπου ένα υλικό, στην προκειμένη περίπτωση τα κύτταρα, απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Δηλαδή δεσμεύει και μετασχηματίζει ενέργεια. Όταν το φως διέρχεται από ένα μέσο, τα μόρια και τα άτομα του μέσου επιδρούν με αυτό. Τα μόρια και άτομα μπορούν να απορροφήσουν φωτόνια συγκεκριμένων ενεργειών που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος και αυτό εξαρτάται από τη χημική δομή και την κατανομή των ενεργειακών σταθμών αυτών των μορίων και ατόμων. [1]

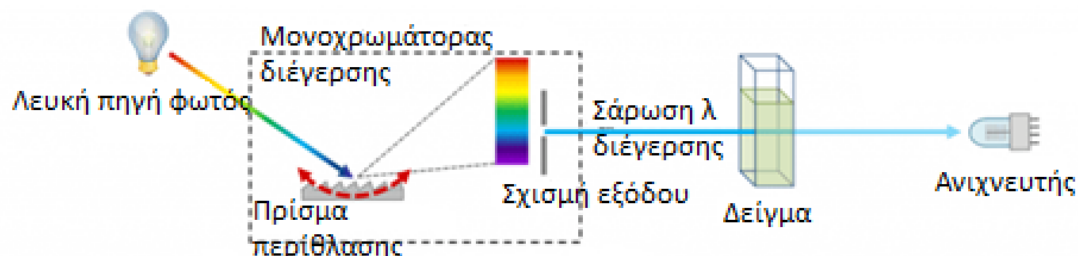
Χρήσιμο χαρακτηριστικό ενός υλικού, εδώ των κυττάρων, είναι το φάσμα απορρόφησής του. Το φάσμα απορρόφησης δείχνει την κατανομή της πιθανότητας να συμβεί το φαινόμενο της απορρόφησης στα διαφορετικά μήκη κύματος για το υπό εξέταση δείγμα. Το πόσο απορροφά ένα υλικό διέπεται από τον νόμο του Beer-Lambert, όπου φαίνεται ότι η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των απορροφόντων μορίων του υλικού, του μήκους του οπτικού δρόμου και της απορροφητικότητάς του σε δεδομένο μήκος κύματος [2]. Η εξίσωση είναι η ακόλουθη:

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon l C,$$

όπου:

- A , η απορρόφηση
- I_0 , η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας
- I , η ένταση της διερχόμενης ακτινοβολίας
- ϵ , ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης ή εξασθένησης του μέσου
- l , το μήκος του οπτικού δρόμου
- C , η συγκέντρωση των απορροφόντων μορίων στο μέσο

Το φάσμα απορρόφησης μετράται μεταβάλλοντας το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός χρησιμοποιώντας έναν μονοχρωμάτορα (βλεπε και το τελευταίο μέρος της παρούσας ενότητας) και καταγράφοντας την ένταση του διερχόμενου φωτός με έναν ανιχνευτή. Το παρακάτω σχήμα απεικονίζει αυτή την διαδικασία.



Εικόνα 1: Μέτρηση φάσματος απορρόφησης με την χρήση φασματοφωτόμετρου [3]

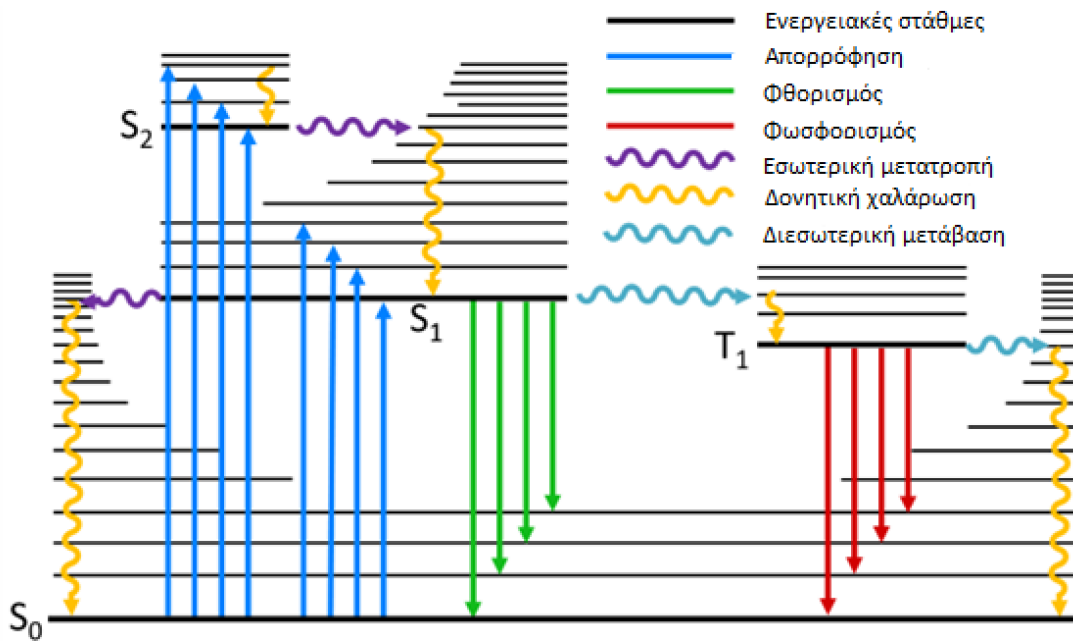
Εδώ είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα μόρια έχουν κβαντισμένες ενεργειακές στάθμες και όταν ένα φωτόνιο προσπίπτει στο μόριο μπορεί να προκαλέσει την μετάβαση ενός ηλεκτρονίου του από μια χαμηλή ενεργειακή στάθμη σε μία υψηλότερη. Όμως για να γίνει αυτή η μετάβαση δυνατή πρέπει η ενέργεια του φωτονίου να ισούται με την διαφορά ενέργειας μεταξύ αυτών των ενεργειακών στάθμων. Για αυτό τα μόρια δεν απορροφούν σε όλα τα μήκη κύματος αλλά αυτό διαφέρει ανάλογα με την επιθυμητή ενέργεια που θα τα κάνει να μεταβούν σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη [4]. Αυτό γίνεται πιο κατανοητό από το διάγραμμα Jablonski.

1.2 Διάγραμμα Jablonski

Το **διάγραμμα Jablonski** αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την οπτικοποίηση όλων των πιθανών μεταβάσεων που μπορούν να συμβούν μετά την απορρόφηση και συνεπώς τη φωτοδιέγερση ενός μορίου σε ψηλότερη ενεργειακή στάθμη. Τα μπλε βέλη στο παρακάτω διάγραμμα υποδεικνύουν την απορρόφηση και οι μαύρες οριζόντιες γραμμές απεικονίζουν τις ενεργειακές στάθμες. Η ενέργεια αυξάνεται κατά μήκος του κατακόρυφου άξονα με την βασική κατάσταση ηρεμίας του μορίου να ονομάζεται S_0 . Η έντονη μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει το χαμηλότερο επίπεδο δόνησης της εκάστοτε ενεργειακής στάθμης ενώ οι πιο αχνές μαύρες αντιπροσωπεύουν τα υψηλότερα επίπεδα δόνησης της ενεργειακής στάθμης. [4] [5] [6]

Με S συμβολίζονται οι ενεργειακές καταστάσεις όπου η συνολική γωνιακή ορμή spin των ηλεκτρονίων του μορίου ισούται με μηδέν και χαρακτηρίζονται ως μονήρεις (Singlet, S) και με T συμβολίζονται οι ενεργειακές καταστάσεις όπου το spin των ηλεκτρονίων της εξωτερικής στοιβάδας ισούται με 1 και χαρακτηρίζονται ως τριπλές (Triplet, T).

Απορρόφηση είναι η μετάβαση από μια χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση σε μια υψηλότερη. Η ενέργεια του φωτονίου μετατρέπεται σε εσωτερική ενέργεια του μορίου. Η απορρόφηση είναι η ταχύτερη μετάβαση στο διάγραμμα Jablonski και συμβαίνει σε χρόνο της τάξης των 10^{-15} s. Συνήθως η απορρόφηση ξεκινά από το χαμηλότερο επίπεδο δόνησης της βασικής κατάστασης S_0 καθώς αυτή είναι η κατάσταση ηρεμίας για ένα μόριο και η κατάσταση που βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου. Η απορρόφηση οδηγεί το μόριο να μεταβεί σε κάποιες από τις καταστάσεις S_1, S_2, \dots, S_n ανάλογα με την ενέργεια που απορροφήθηκε. Η απευθείας μετάβαση σε κάποια τριπλή ενεργειακή κατάσταση δεν είναι δυνατή εξαιτίας της διατήρησης της γωνιακής ορμής.



Εικόνα 2: Διάγραμμα Jablonski [7]

Καθώς το μόριο είναι ασταθές σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες, «προσπαθεί» να επιστρέψει στην αρχική κατάσταση ηρεμίας S_0 . Όπως φαίνεται στο παραπάνω (Εικόνα 2) διάγραμμα μετά την απορρόφηση ενέργειας του μορίου και της μετάβασης σε ανώτερη ενεργειακή στάθμη υπάρχουν πολλοί πιθανοί τρόποι αποδιέγερσης, δηλαδή πιθανές μεταβάσεις επιστροφής στη βασική στάθμη ηρεμίας.

Μια από τις πιο πιθανές μεταβάσεις, που στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται με το πορτοκαλί βέλος, είναι η **δονητική χαλάρωση** και αποτελεί μια μετάβαση που δεν παράγει ακτινοβολία και αφορά την μετάβαση σε χαμηλότερο επίπεδο δόνησης εντός της ίδιας ενεργειακής κατάστασης. Αυτή η μετάβαση γίνεται σε πικοδευτερόλεπτα (ps) ή και λιγότερο και συμβαίνει λόγω απώλειας ενέργειας ελλείψει ακτινοβολίας. Η περίσσεια δονητική ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα η οποία χάνεται σε καταστάσεις δόνησης εντός του ίδιου ή γειτονικών μορίων έως ότου επιτευχθεί το χαμηλότερο επίπεδο δόνησης της εκάστοτε ενεργειακής κατάστασης.

Η **εσωτερική μετατροπή (internal conversion)**, που στο διάγραμμα απεικονίζεται με τα μωβ βέλη, αποτελεί μια επίσης μη ακτινοβολητική μετάβαση ανάμεσα σε δύο διαφορετικές ενεργειακές καταστάσεις της ίδιας πολλαπλότητας spin. Την εσωτερική μετατροπή ακολουθεί η δονητική χαλάρωση στο χαμηλότερο επίπεδο δόνησης αυτής της ενεργειακής κατάστασης που μετέβη μετά την εσωτερική μετατροπή. Ο ρυθμός της εσωτερικής μετατροπής είναι ανάλογος της διαφοράς ενέργειας ανάμεσα στις δυο καταστάσεις. Έτσι η μετάβαση ανάμεσα σε υψηλότερες ενεργειακές καταστάσεις ($S_3 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_1$) γίνεται σε κλίμακα των 10^{-11} με 10^{-9} δευτερολέπτων. Ενώ για την μετάβαση από την κατάσταση S_1 στην βασική κατάσταση S_0 η διαφορά ενέργειας είναι μεγαλύτερη

έτσι η εσωτερική μετατροπή γίνεται με πιο αργό ρυθμό σε χρόνο που μπορεί να συγκριθεί με τον χρόνο άλλων μετατροπών, όπως του φθορισμού ή της **δισωωτερικής μετάβασης** (*intersystem crossing*) που θα αναφερθούμε παρακάτω.

Η **δισωωτερική μετάβαση** (*intersystem crossing*) απεικονίζεται με το γαλάζιο βέλος στο διάγραμμά μας, και αποτελεί μια μετάβαση που δεν συνοδεύεται από ακτινοβολία και συμβαίνει ανάμεσα σε δύο ισοενεργειακά επίπεδα δόνησης που ανήκουν σε ηλεκτρονικές καταστάσεις διαφορετικής πολλαπλότητας spin (για παράδειγμα της μονήρους S και της τριπλής T). Αυτή η μετάβαση είναι σπάνιο να συμβεί, ωστόσο αν γίνει οδηγούμαστε σε δύο ενδεχόμενα, είτε σε φωσφορισμό είτε σε επαναφορά στην απλή διεγερμένη κατάσταση και στην συνέχεια σε καθυστερημένο φθορισμό.

Ο **φωσφορισμός**, που απεικονίζεται με το κόκκινο βέλος, είναι εκπομπή φωτονίων κατά τη μετάβαση από την τριπλή T_1 στην απλή βασική κατάσταση S_0 . Ο φωσφορισμός είναι μια βραδεία μετάβαση σε σχέση με τον φθορισμό με τυπικούς χρόνους φωσφορισμού στην περιοχή από 10^{-6} έως 10 δευτερόλεπτα.

Τέλος, ο **φθορισμός**, απεικονίζεται με τα πράσινα βέλη, όπου αποτελεί μια μετάβαση από την απλή διεγερμένη κατάσταση S_1 στην βασική S_0 και συνοδεύεται από την εκπομπή φωτονίου ενώ συμβαίνει σε χρονική κλίμακα των 10^{-10} έως 10^{-7} δευτερολέπτων. Πιο αναλυτικά θα μιλήσουμε παρακάτω για τον φθορισμό.

1.3 Φθορισμός

Φθορισμός είναι η ιδιότητα κάποιων ουσιών να εκπέμπουν, σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, την απορροφούσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. [6]

Ο μηχανισμός έχει ως εξής, η προσπίπτουσα ακτινοβολία διεγείρει τα άτομα με την απορρόφηση της ακτινοβολίας οδηγώντας σε μετάβαση σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη. Στην συνέχεια σε διάστημα που διαρκεί κάποια νανοδευτερόλεπτα το άτομο επιστρέφει στην αρχική του βασική κατάσταση. Όλες οι πιθανές μεταβάσεις μέχρι να επιστρέψει το άτομο στην αρχική του κατάσταση είναι μη ακτινοβολητικές, εκτός από το φθορισμό και το φωσφορισμό που είναι ακτινοβολητικές.

Ειδικότερα εάν το μόριο μεταβεί από την πρώτη μονήρη διεγερμένη στάθμη στην βασική μονήρη στάθμη ($S_1 \rightarrow S_0$) με εκπομπή φωτονίων, η μετάβαση ονομάζεται φθορισμός.

Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία είναι σε μεγαλύτερο μήκος κύματος σε σχέση με την ακτινοβολία διέγερσης, εξαιτίας κάποιων απωλειών ενέργειας κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη στάθμη.

Ο φθορισμός μπορεί να διακριθεί σε τρία διαφορετικά συμβάντα τα οποία συντελούνται σε χρονικές κλίμακες που διαφέρουν τάξεις μεγέθους μεταξύ τους. Το πρώτο συμβάν είναι η διέγερση του ατόμου από μια πηγή φωτός που συντελείται σε χρόνο της τάξης

των 10^{-15} s. Στην επόμενη φάση, έχουμε την δονητική χαλάρωση των διεγερμένων ατόμων σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο που είναι πιο αργή διαδικασία, της τάξης των 10^{-12} s. Τέλος, έχουμε την εκπομπή φωτονίου σε μεγαλύτερο μήκος κύματος και την επιστροφή του διεγερμένου ατόμου στην βασική ενεργειακή κατάσταση S_0 η οποία συμβαίνει στην χρονική κλίμακα των 10^{-9} s [8].

Ο λόγος για τον οποίο το φωτόνιο εκπέμπεται σε υψηλότερο μήκος κύματος εξαιτίας της απώλειας ενέργειας μπορεί πιο εύκολα να γίνει αντιληπτό από την παρακάτω εξίσωση [9]:

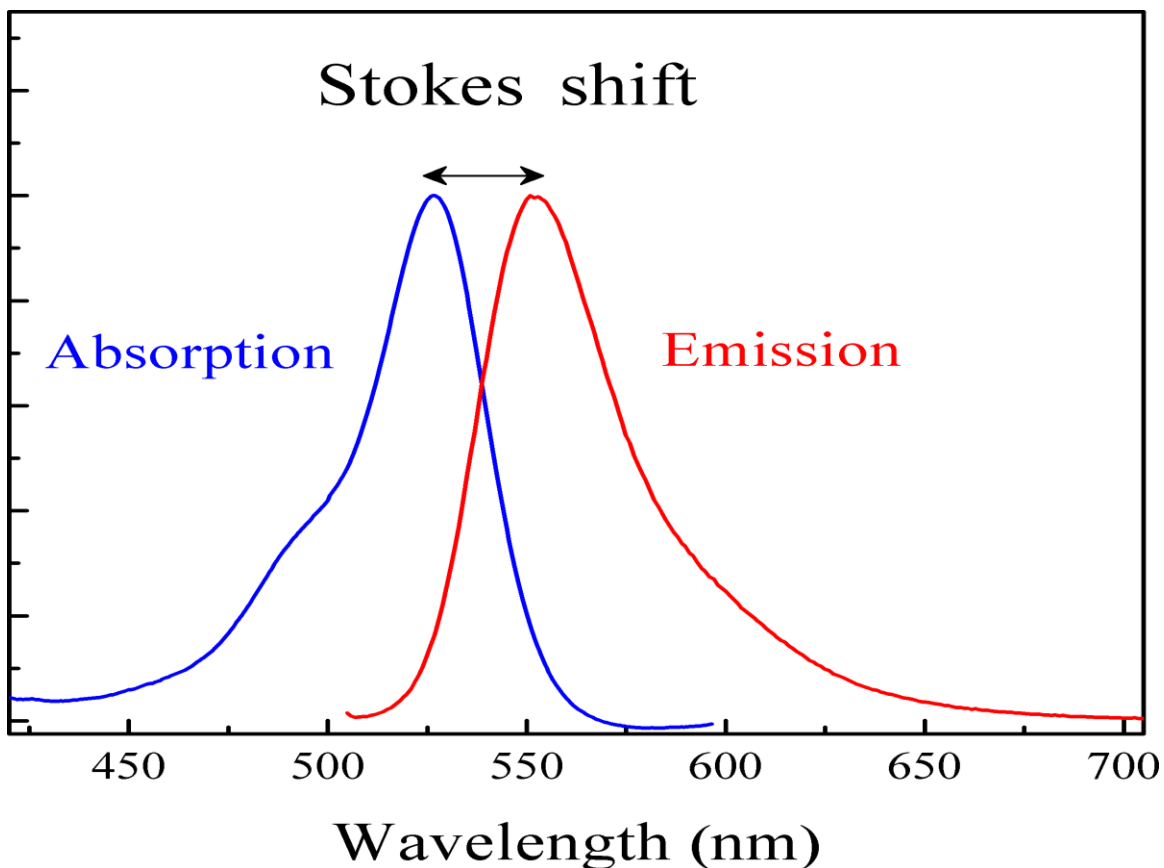
$$E=hf=hc/\lambda,$$

όπου

- E, η ενέργεια του φωτονίου
- h, η σταθερά Planck
- ν, η συχνότητα του ηλεκτρομαγνητικού κύματος
- u, η ταχύτητα του φωτός
- λ, το μήκος κύματος

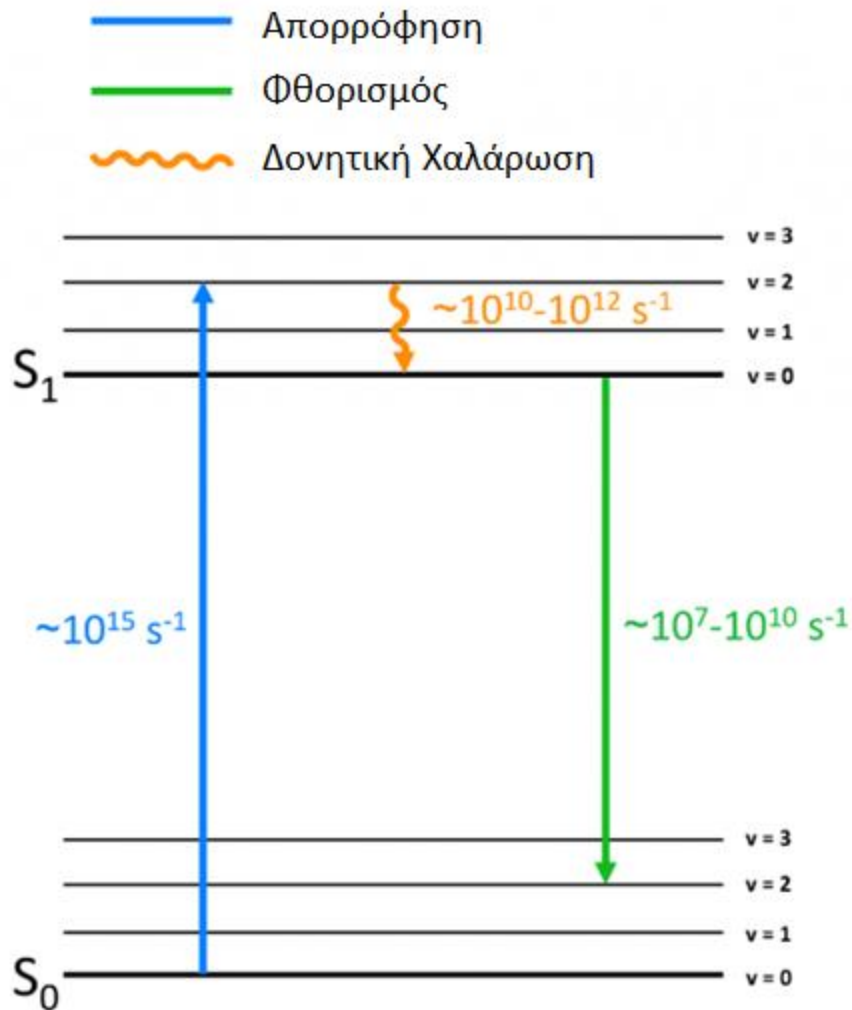
Έτσι, από την παραπάνω εξίσωση επιβεβαιώνεται ότι η ενέργεια του φωτονίου είναι αντιστρόφως ανάλογη του μήκους κύματος. Άρα μικρότερη ενέργεια λόγω απωλειών συνεπάγεται μετατόπιση του φάσματος σε υψηλότερα μήκη κύματος.

Θα περίμενε κανείς να υπάρχει πλήρης επικάλυψη ανάμεσα στο φάσμα απορρόφησης και στο φάσμα εκπομπής, ωστόσο κάτι τέτοιο συμβαίνει πολύ σπάνια γεγονός που οφείλεται στην απώλεια ενέργειας από την αλληλεπίδραση του διεγερμένου ατόμου με το περιβάλλον του. Έτσι το φάσμα εκπομπής παρουσιάζεται μετατοπισμένο σε σχέση με το φάσμα απορρόφησης, σε μεγαλύτερα μήκη κύματος που συνεπάγονται λιγότερη εκπεμπόμενη ενέργεια εξαιτίας των απωλειών. Αυτή η διαφορά ανάμεσα στις τιμές των μηκών κύματος, εκεί που μεγιστοποιούνται τα φάσματα, ονομάζεται **μετατόπιση Stokes** [10]. Αυτό γίνεται περισσότερο κατανοητό στο παρακάτω διάγραμμα.



Εικόνα 3: Μετατόπιση Stokes [11]

Μια από τις βασικές αιτίες της μετατόπισης του Stokes είναι η μετάπτωση των διεγερμένων ηλεκτρονίων στην χαμηλότερη δονητική κατάσταση της ενεργειακής κατάστασης S_1 (πορτοκαλί βέλος στο διάγραμμα). Μια ακόμη αιτία είναι η μετάβαση από την S_1 σε υψηλότερη δονητική κατάσταση της βασικής κατάστασης S_0 (πράσινο βέλος στο διάγραμμα). Πρόσθετοι λόγοι μπορεί να είναι οι αντιδράσεις κατά την διάρκεια της διεγερμένης κατάστασης, η μεταφορά ενέργειας και γενικώς η μετατροπή σε θερμότητα στο μόριο εξαιτίας της δονητικής χαλάρωσης. Αυτά γίνονται περισσότερο κατανοητά από το παρακάτω διάγραμμα που ονομάζεται Perrin-Jablonski [10].



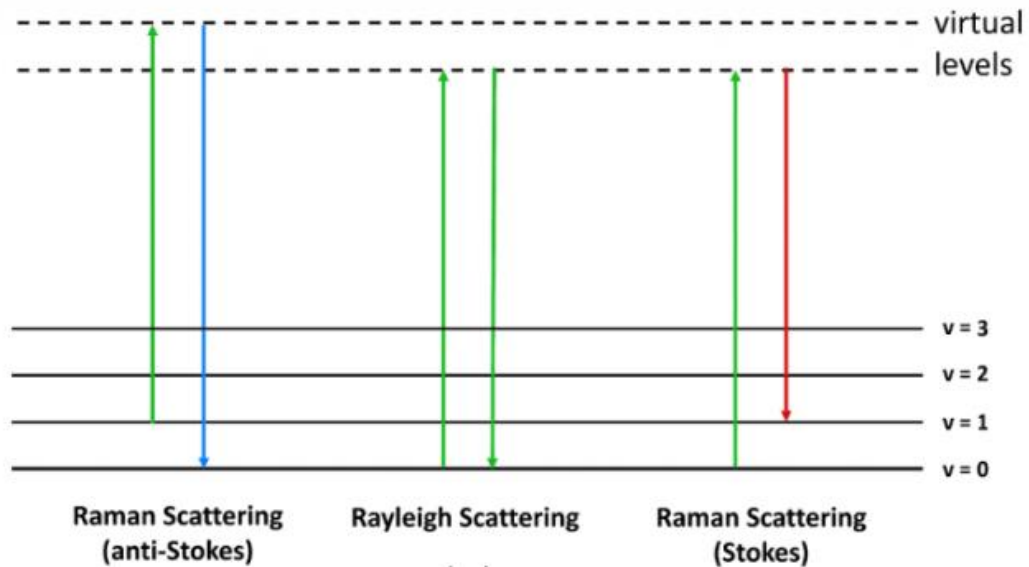
Εικόνα 4: Διάγραμμα Perrin-Jablonski [12]

Ένα ακόμη διάγραμμα που απεικονίζει την μετατόπιση Stokes μαζί με άλλα πιθανά σενάρια κατά την διαδικασία της διέγερσης ενός μορίου είναι το παρακάτω, το οποίο ανήκει στο Raman και τον Krishnan και αναπτύχθηκε 25 χρόνια μετά τον θάνατο του Stokes.

Στην μεσαία περίπτωση, την σκέδαση Rayleigh, δεν παρατηρείται αλλαγή στην δονητική ενέργεια του μορίου καθώς ενώ η ακτινοβολία σκεδάζεται, τα φωτόνια διασκορπίζονται ελαστικά. Σε αυτή την περίπτωση το μόριο μετά την ακτινοβολία που δέχεται μεταβαίνει από την απλή βασική κατάσταση $S_0, v=0$ στην απλή διεγερμένη $S_1, v=0$. Έτσι δεν παρατηρείται η μετατόπιση Stokes καθώς οι μεταβάσεις είναι ισοενεργειακές.

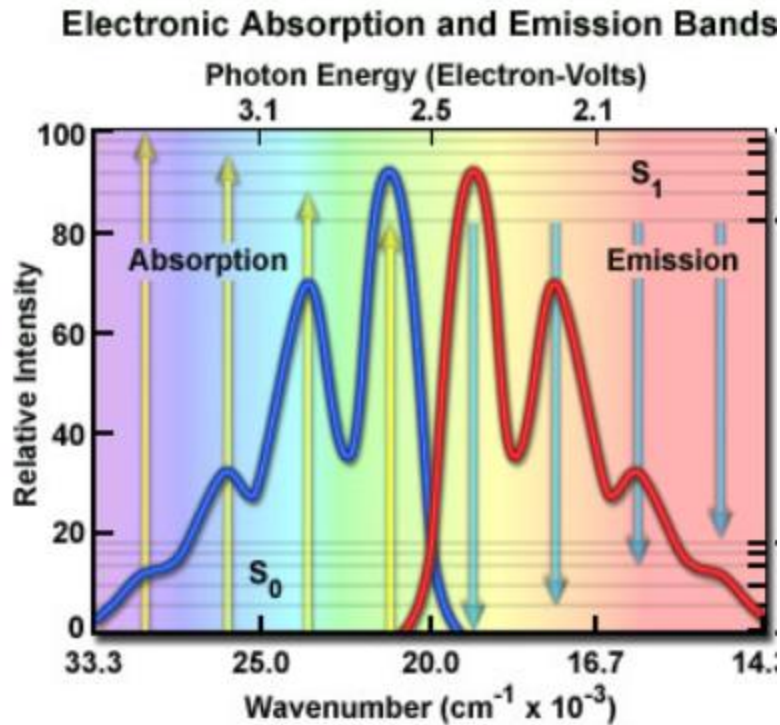
Στην περίπτωση της σκέδασης Raman-Stokes το μόριο αποκτά ένα κβάντο δονητικής ενέργειας κατά την διαδικασία της σκέδασης και έτσι εμφανίζει μεγαλύτερο μήκος κύματος από την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Το αντίστροφο συμβαίνει κατά την

σκέδαση anti-Stokes όπου κατά την διαδικασία της σκέδασης το μόριο χάνει ένα κβάντο δονητικής ενέργειας και έτσι παρουσιάζει μικρότερο μήκος κύματος από το προσπίπτον.



Εικόνα 5: Σκέδαση Raman [13]

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό που αξίζει να αναφερθεί είναι η **κατοπτρικότητα** ανάμεσα στο φάσμα απορρόφησης και το φάσμα εκπομπής, όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα. Αυτό σημαίνει ότι το φάσμα εκπομπής είναι καθρέφτισμα του φάσματος απορρόφησης σε υψηλότερα μήκη κύματος και αυτό υποδηλώνει ότι η πιθανότητα για ένα διεγερμένο ηλεκτρόνιο να επιστρέψει σε ένα συγκεκριμένο δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης είναι παρόμοια με την πιθανότητα να βρίσκεται σε αυτό το σημείο το ηλεκτρόνιο πριν την διέγερσή του [9].



Εικόνα 6: Απεικόνιση της κατοπτρικότητας ανάμεσα στο φάσμα απορρόφησης και το φάσμα εκπομπής [14]

Συντελεστής εξασθένισης ή συντελεστής μοριακής απορρόφησης

Ένα από τα πιο βασικά μεγέθη που χρειάζεται να αναφερθεί είναι ο **συντελεστής εξασθένισης**, ο οποίος είναι γνωστός και με τον όρο συντελεστής μοριακής απορρόφησης που έχει αναφερθεί και παραπάνω, στην εξίσωση του νόμου Beer-Lambert. Αυτό το μέγεθος μας δίνει πληροφορία σχετικά με την ικανότητα μιας ουσίας να απορροφήσει φως σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Συνήθως υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον συντελεστή εξασθένισης και τον φθορισμό αφού ουσίες με υψηλό συντελεστή μοριακής απορρόφησης έχουν υψηλότερη πιθανότητα εκπομπής φθορισμού. Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης μιας ουσίας υπολογίζεται μετρώντας την απορρόφηση σε ένα μήκος κύματος αναφοράς με συγκέντρωση της ουσίας ενός mol σε ένα λίτρο σε μια κυβέτα με μήκος διαδρομής του ενός εκατοστού. Το μήκος κύματος αναφοράς είναι το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης στο φάσμα του υπεριώδους ή του ορατού. Μονάδα μέτρησης είναι το L, δηλαδή $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. [9]

Κβαντική απόδοση φθορισμού

Ένα ακόμη μέγεθος που προσφέρει χρήσιμα συμπεράσματα για τον φθορισμό μιας ουσίας είναι η **κβαντική απόδοση** η οποία μετρά την αποδοτικότητα της εκπομπής φθορισμού. Ορίζεται ως ο λόγος των φωτονίων που εκπέμπονται προς τα φωτόνια που απορροφώνται και είναι ένα αδιάστατο μέγεθος. Με άλλα λόγια η κβαντική απόδοση εκφράζει την πιθανότητα ένα διεγερμένο άτομο να εκπέμψει φως, δηλαδή φθορισμό και

κυμαίνεται ανάμεσα στο μηδέν (μη φθορίζουσες ουσίες) και την μονάδα (έντονα φθορίζουσες ουσίες). Η κβαντική απόδοση μιας ουσίας επηρεάζεται έντονα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η θερμοκρασία, το pH, η συγκέντρωση, η πολικότητα του διαλύτη. [9]

Διάρκεια ζωής φθορισμού

Μια ακόμη χαρακτηριστική τιμή είναι η **διάρκεια ζωής φθορισμού**, που είναι ο χρόνος που ένα μόριο παραμένει στην διεγερμένη κατάσταση πριν επιστρέψει στην αρχική βασική κατάσταση. Τυπικά, ως διάρκεια ζωής φθορισμού ορίζεται ο χρόνος κατά τον οποίο η ένταση φθορισμού ενός ατόμου γίνεται ίση με το $1/e$ (περίπου 37%) της αρχικής έντασης φθορισμού. Συνήθως η διάρκεια ζωής φθορισμού μετράται σε νανοδευτερόλεπτα ωστόσο αυτό ποικίλει ανάλογα το περιβάλλον. [9],

Απόσβεση

Μια επίσης σημαντική πτυχή του φθορισμού είναι η **απόσβεση** ([6]). Η ένταση του φθορισμού μπορεί να μειωθεί από μια σειρά παράγοντες. Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι η απόσβεση λόγω συγκρούσεων όπου συντελούνται ανάμεσα στο διεγερμένο μόριο με κάποιο άλλο μη-φθορίζον μόριο σε διάλυμα που οδηγεί σε απενεργοποίηση του διεγερμένου μορίου και επιστροφή στην βασική κατάσταση. Δεν συντελείται κάποια χημική μετατροπή μέσω αυτής της διαδικασίας. Για αυτού του τύπου την απόσβεση η μείωση στην ένταση εκφράζεται από την εξίσωση Stern-Volmer ([1]):

$$F_0/F = 1 + K[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

όπου:

- K η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer
- k_q η διμοριακή σταθερά απόσβεσης
- τ_0 η μη αποσβενιμένη διάρκεια ζωής
- Q η συγκέντρωση απόσβεσης

Μια μεγάλη ποικιλία μορίων μπορούν να λειτουργήσουν ως μόρια απόσβεσης, όπως για παράδειγμα το οξυγόνο, οι αμίνες, τα αλογόνα. Ο μηχανισμός απόσβεσης εξαρτάται και από το ζεύγος μορίου απόσβεσης-διεγερμένου μορίου.

Ένας ακόμη μηχανισμός απόσβεσης είναι η στατική, η οποία προκύπτει από την σύμπλεξη που σχηματίζεται ανάμεσα στα μόρια απόσβεσης και τα άτομα δημιουργώντας μη φθορίζουσες συμπλέξεις. Έτσι περιορίζεται η απορρόφηση και συνεπώς το πλήθος των διεγερμένων μορίων.

Φωτολεύκανση (Photobleaching)

Ένα ακόμη ενδεχόμενο που είναι πιθανό να συντελεστεί κατά την διαδικασία του φθορισμού είναι η **φωτολεύκανση** όπου το μόριο χάνει την ικανότητά του να φθορίζει

λόγω χημικής βλάβης που προκαλείται από τα φωτόνια ή λόγω ομοιοπολικών τροποποιήσεων. Κατά την διάρκεια της μετάβασης από την απλή διεγερμένη κατάσταση στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση είναι πιθανό τα άτομα να αλληλεπιδράσουν με άλλα μόρια προκαλώντας μη αναστρέψιμες ομοιοπολικές τροποποιήσεις. Στην τριπλή κατάσταση εξάλλου ο χρόνος ζωής του ατόμου είναι μεγαλύτερος σε σχέση με την απλή επιτρέποντας μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για τα διεγερμένα μόρια να αλληλοεπιδράσουν με μόρια του περιβάλλοντός τους. [9]

Ένας τρόπος να μειωθεί η πιθανότητα φωτολεύκανσης είναι η έκθεση για λιγότερο χρόνο του δείγματος στο φως ή η μείωση της ενέργειας διέγερσης [11]. Ωστόσο και τα δύο αυτά μέτρα οδηγούν σε μείωση της ενέργειας φθορισμού. Σε ορισμένες περιπτώσεις σαν μέθοδος χρησιμοποιείται η αποξυγονοποίηση του ατόμου κάτι που δεν είναι εφικτό στην δική μας περίπτωση καθώς έχουμε να κάνουμε με ζωντανό βιολογικό δείγμα. Ίσως η πιο αποδοτική λύση είναι η μείωση της έκθεσης του υπό εξέταση δείγματος σε έντονο φωτισμό αξιοποιώντας και τα κατάλληλα φίλτρα [6].

Ανισοτροπία φθορισμού

Ένα σημαντικό μέγεθος για την εξέταση του φθορισμού είναι η **ανισοτροπία φθορισμού**. Αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την μελέτη του φθορισμού των κυττάρων καθώς μπορούμε να εξάγουμε πολύτιμα συμπεράσματα για την δομή, την λειτουργία και την συμπεριφορά τους. Μια ακόμη χρήσιμη ιδιότητα της ανισοτροπίας είναι ότι εκφράζει μια γενική ιδιότητα των μορίων και δεν υπόκειται σε περιβαλλοντικές αλληλεπιδράσεις όπως γίνεται με την ένταση του φθορισμού. ([9],[16])

Η ανισοτροπία βασίζεται στις ιδιότητες πόλωσης του εκπεμπόμενου φωτός. Όταν ένα μόριο διεγείρεται από πολωμένο φως, τότε το εκπεμπόμενο φως είναι και αυτό μερικώς πολωμένο, που σημαίνει ότι εκπέμπει σε μια συγκεκριμένη κατεύθυνση. Ο βαθμός πόλωσης εξαρτάται από την περιστροφική κίνηση του διεγερμένου μορίου. Αν αυτό περιστρέφεται ελεύθερα τότε το εκπεμπόμενο φως αποπολώνεται, ενώ αν είναι πιο περιορισμένο στις κινήσεις του το φως θα είναι πιο πολωμένο.

Οι μετρήσεις της ανισοτροπίας βασίζονται στην αρχή της φωτοεκλεκτικής διέγερσης των ατόμων από το πολωμένο φως. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι τα άτομα απορροφούν φωτόνια των οποίων το ηλεκτρικό πεδίο είναι παράλληλο της μεταβατικής διπολικής ροπής του ατόμου, η οποία ροπή βρίσκεται σε συνάρτηση με τους μοριακούς άξονες. Σε ένα ισότροπο διάλυμα τα άτομα έχουν τυχαίους προσανατολισμούς. Έτσι όταν διεγείρονται από το πολωμένο φως, αυτό γίνεται επιλεκτικά, μόνο για τα μόρια όπου η διπολική ροπή τους είναι παράλληλη της διεύθυνσης του ηλεκτρικού πεδίου. Διέγερση και εκπομπή φωτονίων μπορεί να συμβεί και με το φως πολωμένο κατά μήκος ενός σταθερού άξονα στο άτομο [6].

1.4 Οπτικές ιδιότητες καρκινικών και υγιών κυττάρων

Οι οπτικές ιδιότητες των υγιών και των καρκινικών κυττάρων μπορούν να βοηθήσουν στην διάκριση μεταξύ των δύο εφόσον τα διαφορετικά τους γνωρίσματα μπορούν να αξιοποιηθούν για διαγνωστικούς σκοπούς. Οι οπτικές ιδιότητες των κυττάρων αποτελούν θεμελιώδη τους χαρακτηριστικά εκφράζοντας τον τρόπο με τον οποίο αλληλοεπιδρούν με το φως, η κατανόηση των οποίων έχουν εφαρμογή στην βιολογία, την ιατρική και την βιοτεχνολογία ενώ μπορούν να βοηθήσουν στον εντοπισμό, την διάγνωση και την θεραπεία καρκίνου.

Υγιή κύτταρα

Ορισμένα από τα οπτικά χαρακτηριστικά που εξετάζονται για τα υγιή κύτταρα είναι η απορρόφηση, η σκέδαση, η διαπερατότητα, ο φθορισμός, η διάθλαση, η πολικότητα. Αυτές οι οπτικές ιδιότητες των υγιών κυττάρων είναι απαραίτητες για την κατανόηση της κυτταρικής δομής, λειτουργίας και συμπεριφοράς. Χρησιμοποιούνται σε διάφορες τεχνικές οπτικής απεικόνισης, όπως η μικροσκοπία, η φασματοσκοπία και η κυτταρομετρία ροής, για τη μελέτη των κυττάρων τόσο σε ερευνητικά όσο και σε κλινικά περιβάλλοντα. Επιπλέον, οι αποκλίσεις από αυτές τις οπτικές ιδιότητες μπορεί να υποδεικνύουν κυτταρικές ανωμαλίες ή ασθένειες, καθιστώντας τις πολύτιμους βιοδείκτες για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. [18]

Όσο αφορά την **απορρόφηση**, τα υγιή κύτταρα απορροφούν φως σε διάφορα μήκη κύματος ανάλογα με τη βιοχημική τους σύνθεση και την περιεκτικότητα σε μόρια που απορροφούν το φως, όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και χρωστικές ουσίες. Τα φάσματα απορρόφησης μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την παρουσία και τη συγκέντρωση συγκεκριμένων μορίων μέσα στα κύτταρα.

Σχετικά με την **διαπερατότητα**, τα υγιή κύτταρα έχουν έναν ορισμένο βαθμό διαφάνειας, επιτρέποντας στο φως να περάσει μέσα από αυτά με ελάχιστη απορρόφηση ή διασπορά. Η μετάδοση του φωτός μέσω των υγιών κυττάρων εξαρτάται από παράγοντες όπως το μέγεθος των κυττάρων, η μορφολογία και ο δείκτης διάθλασης.

Όταν το φως αλληλεπιδρά με υγιή κύτταρα, υφίσταται **σκέδαση**, η οποία είναι η διαδικασία κατά την οποία το φως ανακατευθύνεται προς διάφορες κατευθύνσεις λόγω των αλληλεπιδράσεων με τις κυτταρικές δομές και τα οργανίδια. Οι ιδιότητες σκέδασης επηρεάζονται από το μέγεθος, το σχήμα, τον δείκτη διάθλασης και την εσωτερική δομή των κυττάρων. Ο δείκτης διάθλασης των υγιών κυττάρων καθορίζει τον τρόπο με τον οποίο το φως κάμπτεται ή διαθλάται καθώς περνά μέσα από τα κύτταρα.

Τα υγιή κύτταρα διασκορπίζουν το φως με ελαστικό τρόπο, που σημαίνει ότι το μήκος κύματος του σκεδαζόμενου φωτός παραμένει αμετάβλητο. Η **ελαστική σκέδαση** φωτός

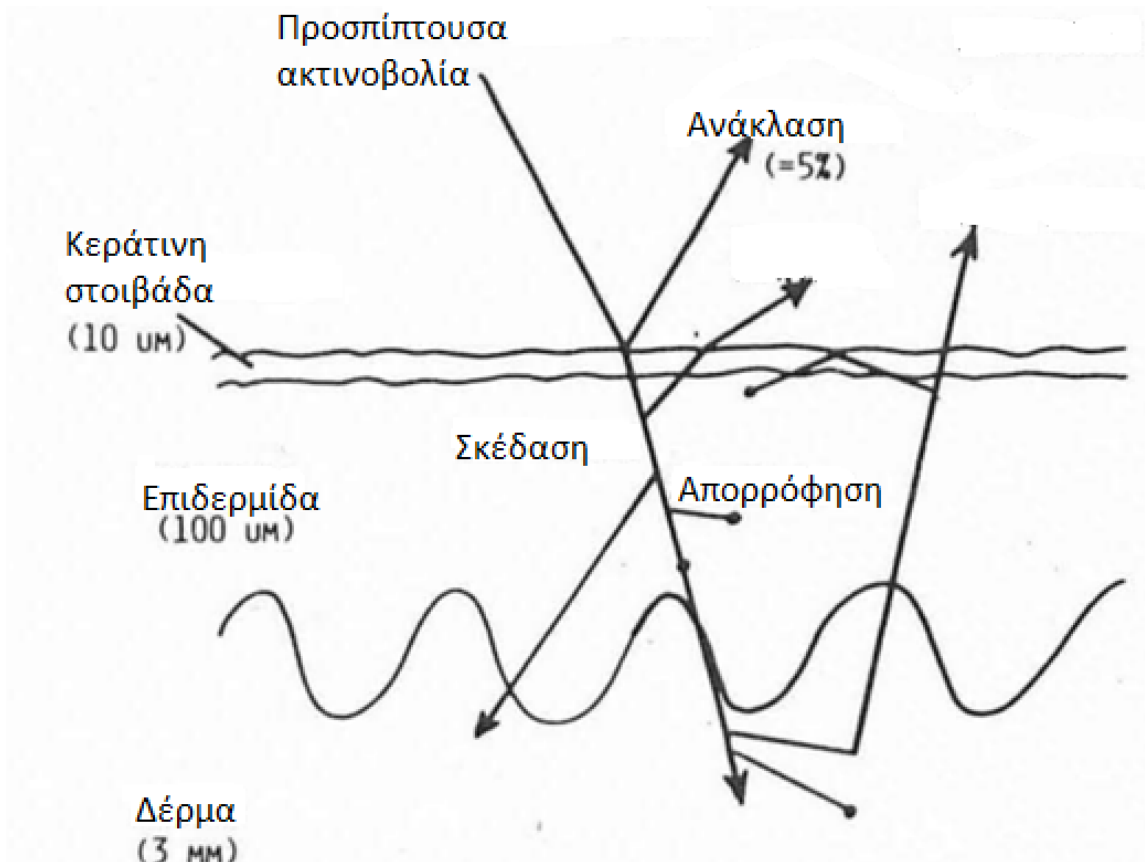
μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της κυτταρικής μορφολογίας, του μεγέθους και της δομής χωρίς την ανάγκη για εξωγενείς ετικέτες.

Τα υγιή κύτταρα μπορεί να εμφανίζουν **εγγενή φθορισμό** (αυτοφθορισμό) λόγω της παρουσίας ενδογενών φθοροφόρων όπως το NADH, οι φλαβίνες και οι λιπογόνες ουσίες. Οι ιδιότητες φθορισμού μπορούν να παρέχουν πληροφορίες για τον κυτταρικό μεταβολισμό, τη λειτουργία και την κατάσταση της υγείας. [18]

Τα υγιή κύτταρα μπορεί να παρουσιάζουν ιδιότητες **πόλωσης** όταν εκτίθενται σε πολωμένο φως. Οι μετρήσεις πόλωσης μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κυτταρική οργάνωση, την ανισοτροπία και τα δομικά χαρακτηριστικά.

Ορισμένα υγιή κύτταρα, ιδιαίτερα εκείνα με διατεταγμένες εσωτερικές δομές όπως μυϊκά κύτταρα και νευρικές ίνες, παρουσιάζουν **διπλοθλαστικότητα**, που σημαίνει ότι έχουν διαφορετικούς δείκτες διάθλασης κατά μήκος διαφορετικών αξόνων. Η διπλοθλαστικότητα μπορεί να παρατηρηθεί χρησιμοποιώντας μικροσκοπία πολωμένου φωτός και είναι χρήσιμη για τη μελέτη της κυτταρικής οργάνωσης και της δομικής ακεραιότητας. [18]

Παρακάτω απεικονίζονται όσο περιεγράφηκαν παραπάνω σχετικά με τις οπτικές ιδιότητες των (επιδερμικών) κυττάρων μετά την πρόσπτωση φωτός πάνω τους. Στη συνέχεια, θα επικεντρωθούμε κυρίως στα επιδερμικά κύτταρα που αποτελεί και το θέμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας.



Εικόνα 7: Σχηματικό διάγραμμα οπτικών οδών στο δέρμα [19]

Σύμφωνα με σχετικές έρευνες, η κεράτινη στιβάδα και η επιδερμίδα δημιουργούν ένα οπτικό φράγμα κυρίως μέσω της απορρόφησης ακτινοβολίας, και σε μικρότερο βαθμό, μέσω της οπτικής σκέδασης. Στην υπεριώδη περιοχή, μικρότερη των 300 nm, τα αρωματικά αμινοξέα, τα νουκλεϊκά οξέα, ουροκανικό οξύ και η μελανίνη μπορεί να θεωρηθούν ως κύριοι επιδερμικοί φορείς απορρόφησης. [19]

Η υπερπλασία, η μελανογένεση, και ίσως η σύνθεση του ουροκανικού οξέος, σχηματίζουν ένα φωτοπροστατευτικό σύστημα. Αυτοί οι προστατευτικοί παράγοντες εξαρτώνται από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός. Για την περιοχή μεταξύ των 350 και 1200 nm, η μελανίνη είναι ο κύριος απορροφητής της ακτινοβολίας στην επιδερμίδα, ειδικά στα μικρότερα μήκη κύματος.

Σύμφωνα και με το παραπάνω σχήμα όταν το φως προσπίπτει στην επιδερμίδα ένα μέρος του ανακλάται εξαιτίας της μεταβολής του ανακλαστικού δείκτη μεταξύ του αέρα (ισούται με την μονάδα) και της κεράτινης στιβάδας (που είναι περίπου ίσος με 1.55). Για τα υγιή δερματικά κύτταρα το ποσοστό της ανάκλασης κυμαίνεται ανάμεσα στο 4% με 7% της προσπίπτουσας ακτινοβολίας για μήκος κύματος από 250nm μέχρι 3000nm. Η ανάκλαση μπορεί να αξιοποιηθεί για κλινικούς σκοπούς αφού η ανάκλαση σε υγιείς

δερματικούς ιστούς διαφέρει από αυτήν παθογόνων. Για παράδειγμα σε περίπτωση ψωρίασης το δέρμα είναι πιο τραχύ με αποτέλεσμα η ανάκλαση να είναι πιο έντονη.

Η υπόλοιπη, 93% με 96%, προσπίπτουσα ακτινοβολία που δεν ανακλάται μπορεί είτε να απορροφηθεί είτε να σκεδαστεί. Αυτές οι δύο διαδικασίες είναι που θα καθορίσουν και τον βαθμό διείσδυσης της ακτινοβολίας στο δέρμα όπως και την μετάδοση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Η σκέδαση προκύπτει από ανομοιογένειες στον δείκτη διάθλασης ενός μέσου, που αντιστοιχούν σε φυσικές ανομοιογένειες. Η χωρική κατανομή και η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα των ανομοιογενειών σε σχέση με το μήκος κύματος και στη διαφορά στο δείκτη διάθλασης μεταξύ του μέσου και των ανομοιογενειών. [19]

Η σκέδαση μπορεί να θεωρηθεί ιστροπική (αλλά και πιο ασθενής), δηλαδή εξίσου κατανομημένη στον χώρο, όπως και πολωμένη, όταν οι διαστάσεις των μορίων είναι περίπου στο 1/10 του μήκους κύματος της ακτινοβολίας. Ενώ όταν τα μόρια έχουν διαστάσεις συγκρίσιμες με το μήκος κύματος ακτινοβολίας η διασπορά είναι πιο προσανατολισμένη και ισχυρή. Τέλος, όταν οι διαστάσεις των μορίων είναι μεγαλύτερες του μήκους κύματος η διασπορά πάλι μειώνεται παραμένοντας όμως προσανατολισμένη. Όλα αυτά τα είδη διασποράς συντελούνται στο δέρμα όταν προσπίπτει φως αλλά κυριαρχεί η διασπορά από δομές με διαστάσεις ίσες ή μεγαλύτερες των μηκών κύματος στο φάσμα του ορατού. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η διασπορά από ίνες κολλαγόνου είναι μείζονος σημασίας για τον προσδιορισμό της διείσδυσης της ακτινοβολίας (στο φάσμα του ορατού) στο δέρμα.

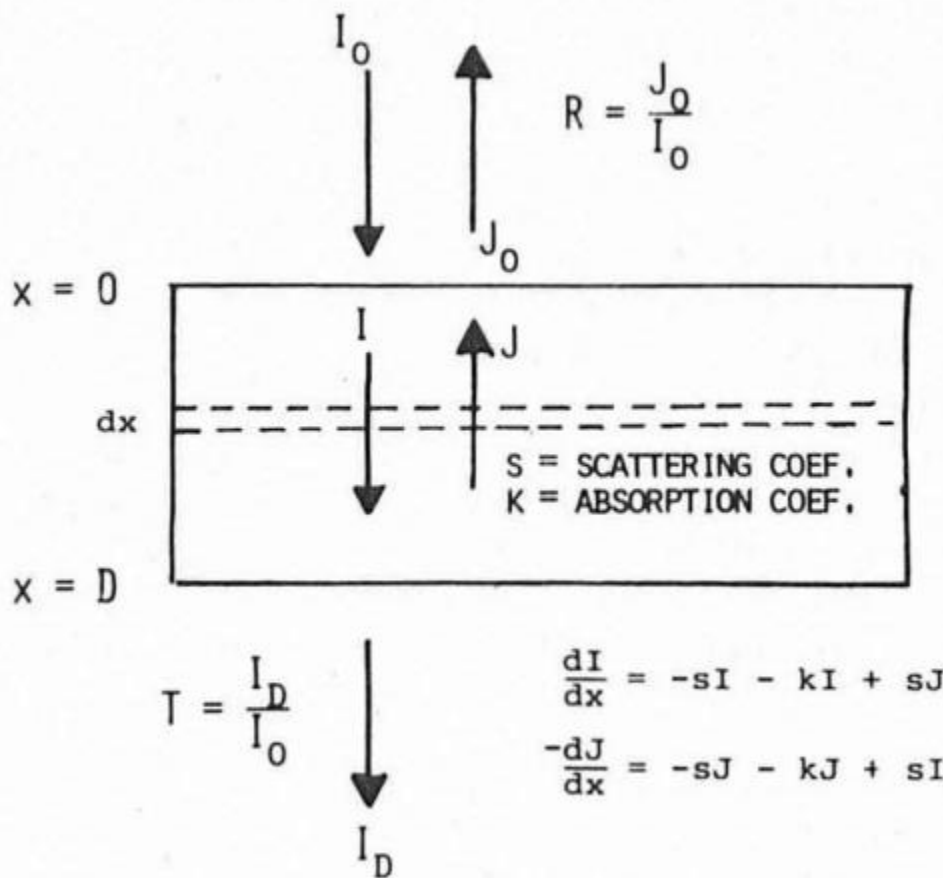
Ένα μοντέλο που έχει εφαρμογή στην περίπτωση που κάνουμε την παραδοχή ότι έχουμε ιστροπική ακτινοβολία είναι το **μοντέλο Kubelka-Munk**. Το εν λόγω μοντέλο δεν μπορεί να θεωρηθεί λεπτομερές αλλά είναι απλό και κατάλληλο για εφαρμογή σε δερματικά κύτταρα. Τα πιο αυστηρά μοντέλα θα απαιτούσαν καλύτερες γνώσεις της δομής και των οπτικών παραμέτρων των δερματικών κυττάρων κάτι το οποίο είναι δύσκολο να αποκτηθεί. [19]

Η θεωρία των Kubelka-Munk κάνει κάποιες παραδοχές, όπως ότι οι ανομοιογένειες του δείγματος είναι μικρές σε σχέση με το πάχος του ή ότι η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι ιστροπική ή ότι οι ανακλάσεις στα όρια του δείγματος μπορούν να αγνοηθούν. Αν και οι παραπάνω υποθέσεις δεν ικανοποιούνται απόλυτα ωστόσο αυτό το μοντέλο προσφέρει μια απλή σχέση για τις οπτικές ιδιότητες των δερματικών κυττάρων.

Η εξίσωση Kubelka-Munk εκφράζει το κλάσμα του συντελεστή απορρόφησης K προς τον συντελεστή σκέδασης S και η μονάδα μέτρησης είναι σε $1/m$. Το δέρμα για ακτινοβολία με μήκος κύματος μικρότερη των $600nm$ θεωρείται επαρκώς παχύ ώστε να εφαρμοστεί το μοντέλο. Ένα σημαντικό γνώρισμα είναι ότι τα στοιχεία εκείνα της δομής του δέρματος που καθορίζουν τον συντελεστή σκέδασης διαφέρουν από αυτά που καθορίζουν τον συντελεστή απορρόφησης. Αυτό είναι βολικό γιατί σε υγιές δέρμα ορισμένα χρωμοφόρα

όπως οι αιμοσφαιρίνες, η χολερυθρίνη και η μελανίνη αλλάζουν γρήγορα, προκαλώντας αλλαγές στους συντελεστές απορρόφησης, ενώ οι συντελεστές σκέδασης δεν θα πρέπει να αλλάξουν σημαντικά έως ότου συμβεί κάποια μεγάλη αλλαγή της δομής.

Συνοψίζοντας η θεωρία Kubelka-Munk περιγράφει την αλληλεπίδραση του φωτός με το υλικό χρησιμοποιώντας δύο βασικές παραμέτρους, τον συντελεστή σκέδασης (S) και τον συντελεστή απορρόφησης (K). Αυτοί οι συντελεστές ποσοτικοποιούν την τάση του υλικού να διασκορπίζει και να απορροφά φως, αντίστοιχα. Εισάγει επίσης δύο αδιάστατες ποσότητες, τον συντελεστή απορρόφησης Kubelka-Munk (K/S) και τον συντελεστή σκέδασης Kubelka-Munk (S/K), που αντιπροσωπεύουν τη σχετική συμβολή της απορρόφησης και της σκέδασης στη συνολική εξασθένηση του φωτός στο υλικό.



Εικόνα 8: Το μοντέλο Kubelka-Munk για μεταφορά ακτινοβολίας σε θολό, απορροφητικό μέσο [19]

Όσο αφορά την απορρόφηση των ουσιών που αποτελούν την επιδερμίδα, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, μπορούμε να συνοψίσουμε τα παρακάτω [19]. Νουκλεϊκά οξέα, με μέγιστη απορρόφηση κοντά στα 260 nm και πολυάριθμα μικρά αρωματικά μόρια, ιδιαίτερα το ουροκάνικο οξύ, με απορρόφηση στα 277 nm σε pH 7.4, συμβάλλουν στο ότι στα 275 nm παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση για την επιδερμίδα και την

κεράτινη στιβάδα. Όσο για την μελανίνη, απορροφά σε ένα εύρος από τα 250nm έως τα 1200nm. Ενώ κοντά στο φάσμα του υπέρυθρου, πάνω από 1100nm η απορρόφηση από την μελανίνη θεωρείται αμελητέα.

Καρκινικά κύτταρα

Όσο αφορά τα **καρκινικά κύτταρα**, οι οπτικές τους ιδιότητες είναι πολύπλοκες και πολύπλευρες, αντανακλώντας τις μοριακές, κυτταρικές και δομικές αλλαγές που σχετίζονται με την ογκογένεση. Αξιοποιώντας αυτές τις οπτικές ιδιότητες, οι ερευνητές και οι κλινικοί γιατροί μπορούν να αναπτύξουν καινοτόμες τεχνικές οπτικής απεικόνισης και φασματοσκοπίας για την έγκαιρη ανίχνευση καρκίνου, τον ακριβή εντοπισμό του όγκου και την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία. [21]

Ορισμένα από τα οπτικά γνωρίσματα των καρκινικών κυττάρων σχετίζονται με την σκέδαση, την απορρόφηση, τον φθορισμό, την πόλωση, την ελαστική σκέδαση, τους παράγοντες οπτικής αντίθεσης, τους δείκτες διάθλασης.

Τα καρκινικά κύτταρα συχνά παρουσιάζουν αλλοιωμένες ιδιότητες **σκέδασης** σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα λόγω αλλαγών στο μέγεθος, το σχήμα και τον δείκτη διάθλασης των κυττάρων. Η αυξημένη αναλογία πυρήνα προς κυτταρόπλασμα και η ακανόνιστη κυτταρική μορφολογία στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε ενισχυμένη σκέδαση φωτός. Οι ποσοτικές μετρήσεις των ιδιοτήτων σκέδασης μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κυτταρική πυκνότητα, την κατανομή μεγέθους και την αρχιτεκτονική των ιστών, τα οποία είναι σημαντικά για τη διάγνωση του καρκίνου. Σύμφωνα με σχετική έρευνα, για εύρος μηκών κύματος από 1050 έως 1400nm, υπάρχει μεγάλη απόκλιση στις ιδιότητες σκέδασης ανάμεσα στα υγιή και τα καρκινικά δερματικά κύτταρα.

Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά **απορρόφησης** σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα λόγω αλλαγών στη βιοχημική τους σύνθεση. Για παράδειγμα, αυξημένες συγκεντρώσεις ορισμένων ενδογενών χρωμοφώρων, όπως η αιμοσφαιρίνη, η μελανίνη και οι φλαβίνες, μπορεί να επηρεάσουν την απορρόφηση του φωτός στους καρκινικούς ιστούς. Η φασματοσκοπία απορρόφησης και οι τεχνικές απεικόνισης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση αυτών των διαφορών και την παροχή διαγνωστικών πληροφοριών σχετικά με τη σύνθεση και την αγγείωση των ιστών.

Τα καρκινικά κύτταρα συχνά παρουσιάζουν αλλοιωμένες ιδιότητες **φθορισμού** σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα λόγω αλλαγών στο μεταβολισμό, της μιτοχονδριακής δραστηριότητας και της παρουσίας βιομορίων όπως NADH, FAD και πορφυρινών. Οι τεχνικές απεικόνισης φθορισμού, συμπεριλαμβανομένης της φασματοσκοπίας και της απεικόνισης φθορισμού, μπορούν να εκμεταλλευτούν αυτές τις διαφορές για να ανιχνεύσουν και να χαρακτηρίσουν τους καρκινικούς ιστούς μη επεμβατικά.

Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να εμφανίζουν διαφορές στην **ελαστική σκέδαση φωτός** σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα λόγω αλλαγών στην κυτταρική μορφολογία, την πυκνότητα και τον δείκτη διάθλασης. Τεχνικές όπως η συμβολομετρία χαμηλής συνοχής με ανάλυση γωνίας (low coherence interferometry-a/LCI) και η απεικόνιση πεδίου χωρικής συχνότητας (Spatial Frequency Domain Imaging-SFDI) μπορούν να αξιολογήσουν αυτές τις ιδιότητες σκέδασης για να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κυτταρική δομή και τη μορφολογία.

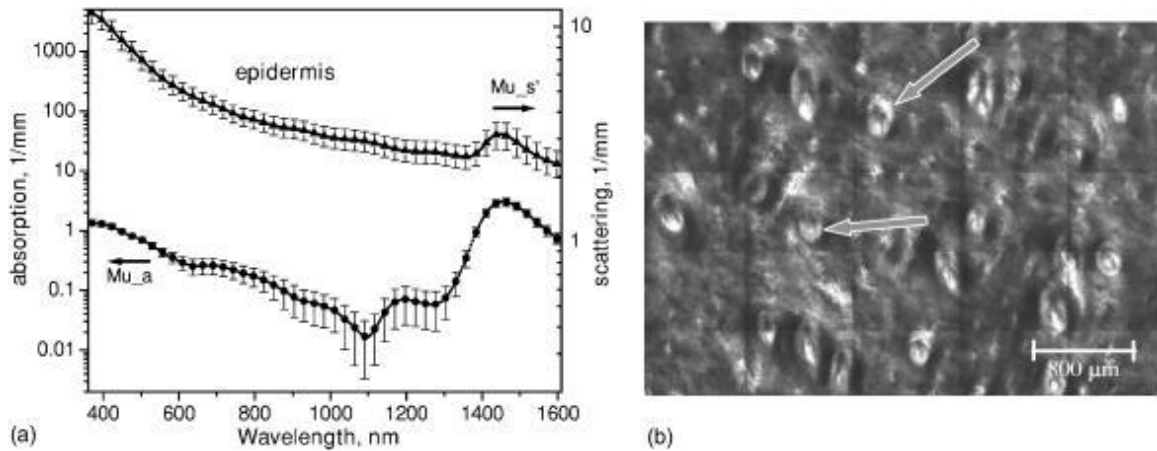
Οι αλλαγές στον **δείκτη διάθλασης** των καρκινικών κυττάρων και του περιβάλλοντος ιστού μπορεί να επηρεάσουν τη διάδοση του φωτός μέσω του ιστού και να αλλάξουν την οπτική αντίθεση στις μεθόδους απεικόνισης. Η οπτική τομογραφία συνοχής (Optical Coherence Tomography-OCT) και άλλες τεχνικές απεικόνισης που βασίζονται στη συνοχή μπορούν να αξιοποιήσουν αυτές τις διακυμάνσεις του δείκτη διάθλασης για απεικόνιση υψηλής ανάλυσης της μικροδομής των ιστών. [21]

Οι ιδιότητες **πόλωσης** του φωτός που σκεδάζεται από καρκινικά κύτταρα μπορούν να παρέχουν πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τη δομή των ιστών. Τεχνικές ευαίσθητες στην πόλωση, όπως η μικροσκοπία πολωμένου φωτός και η ευαίσθητη στην πόλωση OCT, μπορούν να χαρακτηρίσουν την ανισοτροπία των ιστών και να ανιχνεύσουν αλλαγές που σχετίζονται με την εξέλιξη του καρκίνου. [22]

Οι **εξωγενείς παράγοντες αντίθεσης**, όπως τα νανοσωματίδια και οι στοχευμένοι ανιχνευτές, μπορούν να ενισχύσουν την οπτική αντίθεση μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών, βελτιώνοντας την ευαισθησία και την ειδικότητα των τεχνικών οπτικής απεικόνισης για την ανίχνευση και τον εντοπισμό καρκίνου. [23]

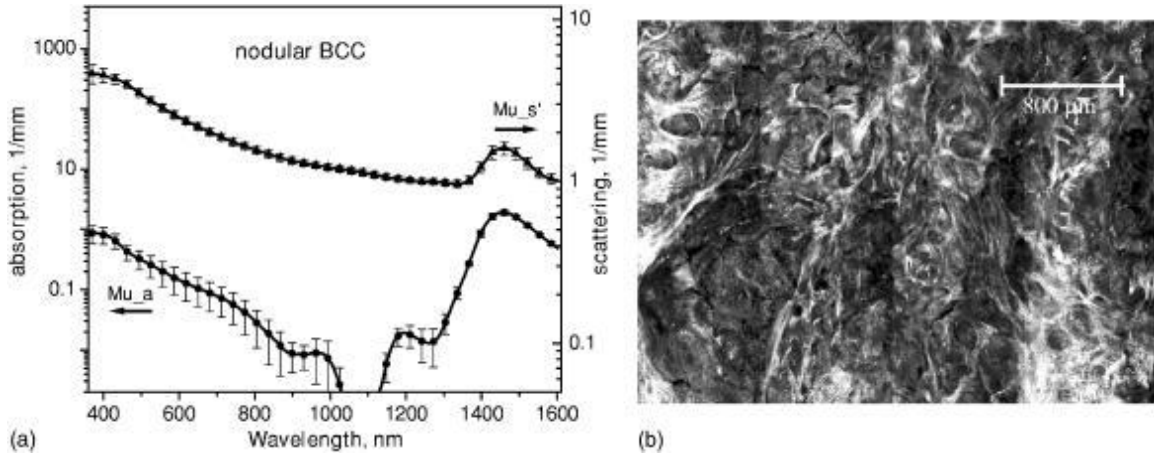
Έρευνες σχετικές με την διάκριση των οπτικών ιδιοτήτων ανάμεσα στα υγιή και τα καρκινικά επιδερμικά κύτταρα

Σχετική έρευνα για την απορρόφηση και την σκέδαση των υγιών επιδερμικών κυττάρων σε σχέση με καρκινικά σε ένα εύρος διέγερσης από τα 370nm έως τα 1600nm υποδεικνύουν ότι για την εν λόγω φασματική περιοχή δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφοροποίηση ως προς την απορρόφηση. Εξαίρεση αποτελεί **το οζώδες βασικοκυτταρικό καρκίνωμα** (nodular BCC) όπου **εμφανίζει χαμηλότερη απορρόφηση σε σύγκριση με το κανονικό δέρμα**. [20]



Εικόνα 9: Απορρόφηση (κάτω γραμμή) και σκέδαση (πάνω γραμμή) υγιών επιδερμικών [20]

2



Εικόνα 10: Απορρόφηση (κάτω γραμμή) και σκέδαση (πάνω γραμμή) καρκινικών nodular BCC [20]

Σχετικά με την σκέδαση εμφανίστηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα υγιή και τα καρκινικά κύτταρα για την περιοχή από τα 1050nm έως τα 1400nm. Έτσι το φασματικό εύρος από 1050 προς την 1400nm, όπου οι ιδιότητες σκέδασης φυσιολογικών και καρκινικών ιστών εμφανίζουν μέγιστη διαφορά, μπορεί να παρέχει μια αξιόπιστη βάση για τη διάκριση της παθολογίας.

Άλλη έρευνα επικεντρώθηκε στην συνδυασμένη ανάλυση των Raman φασμάτων (RS) και των φασμάτων αυτοφθορισμού (AF) δύο τύπων καρκίνου, των μελανωμάτων και των βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων (BCC). Στην εν λόγω μελέτη, τα κύτταρα διεγέρθηκαν από laser στο φάσμα του ορατού και του υπέρυθρου (NIR). [23]

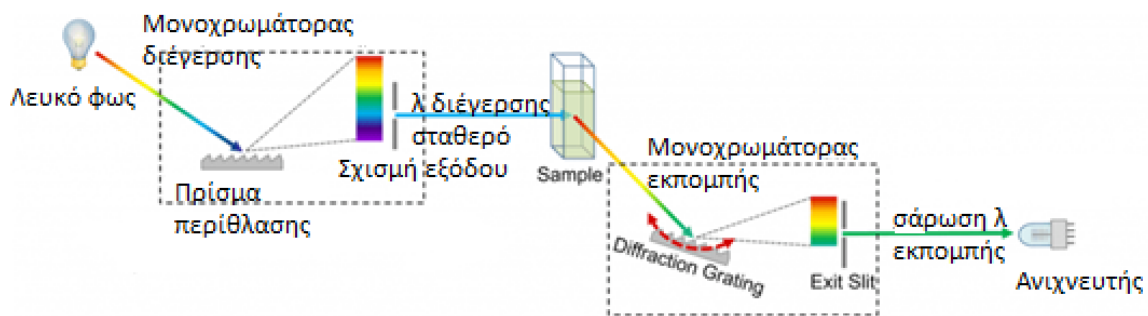
Ο συνδυασμός της ανάλυσης AF με την ανάλυση RS επιτρέπει την αύξηση της ευαισθησίας της διάγνωσης από 95% έως 100% λόγω της συμμετοχής στην ανάλυση των κριτηρίων των αλλαγών στη συγκέντρωση πορφυρινών, φλαβινών και μελανίνης μαζί με

τα κριτήρια RS. Το υψηλό επίπεδο ακρίβειας ταξινόμησης κακοήθων όγκων δέρματος είναι ενδεικτικό της υψηλής δυναμικής της προτεινόμενης μεθόδου. Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για ακριβή προσδιορισμό του τύπου του όγκου όσο και για μαζικές έρευνες προσυμπτωματικού ελέγχου. Η ακρίβεια μόνο της ανάλυσης δερματικού ιστού AF είναι περίπου 87% και μπορεί να αυξηθεί με την ανάλυση RS των ύποπτων περιοχών στο επόμενο βήμα. Τέτοια κοινή ανάλυση θα χαρακτηρίζεται από 100% ευαισθησία.

Σε μια ακόμη μελέτη κάνουν χρήση της τεχνικής πολωμετρίας Stokes-Mueller για τον χαρακτηρισμό των επιδερμικών κυττάρων ως υγιή ή καρκινικά. Η πολωμετρία μήτρας Stokes-Mueller (SMMP) επιτρέπει τον πλήρη χαρακτηρισμό των οπτικών ιδιοτήτων ενός μέσου υπό διέγερση από φως με διαφορετικές καταστάσεις πόλωσης. Σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό, ο καρκινικός ιστός εμφανίζει μια αρκετά διαφορετική απόκριση στο πολωμένο φως λόγω των διαφόρων δομικών αλλαγών που προκαλούνται στην εξωκυτταρική μήτρα και τα κύτταρά του και έτσι η μέθοδος μπορεί να αξιοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς. [22]

1.5 Ιδανικό φασματοφωτόμετρο φθορισμού

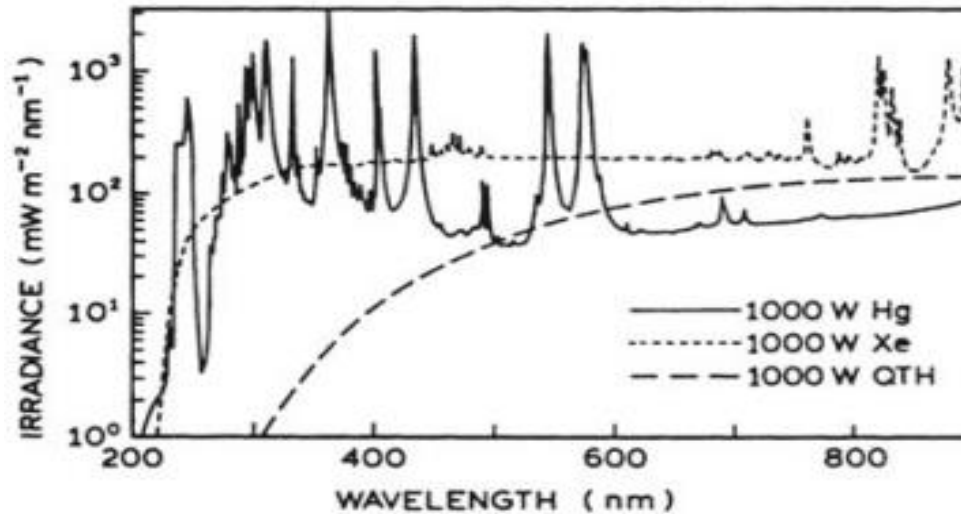
Το ιδανικό φασματοφωτόμετρο [26] αποτελείται από μια φωτεινή πηγή, τον μονοχρωμάτορα ή φίλτρα διέγερσης που 'επιλέγουν' συγκεκριμένο μήκος κύματος διέγερσης, τη βάση τοποθέτησης του δείγματος, τον μονοχρωμάτορα ή φίλτρα εκπομπής που 'επιλέγουν' συγκεκριμένο μήκος κύματος εκπομπής και τον ανιχνευτή που εντοπίζει τον φθορισμό. Ο χειρισμός και ο έλεγχος του οργάνου αλλά και η αποθήκευση των αποτελεσμάτων πραγματοποιούνται με τη βοήθεια κάποιου υπολογιστή.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της μέτρησης της εκπομπής μέσω φασματοφωτόμετρου [27]

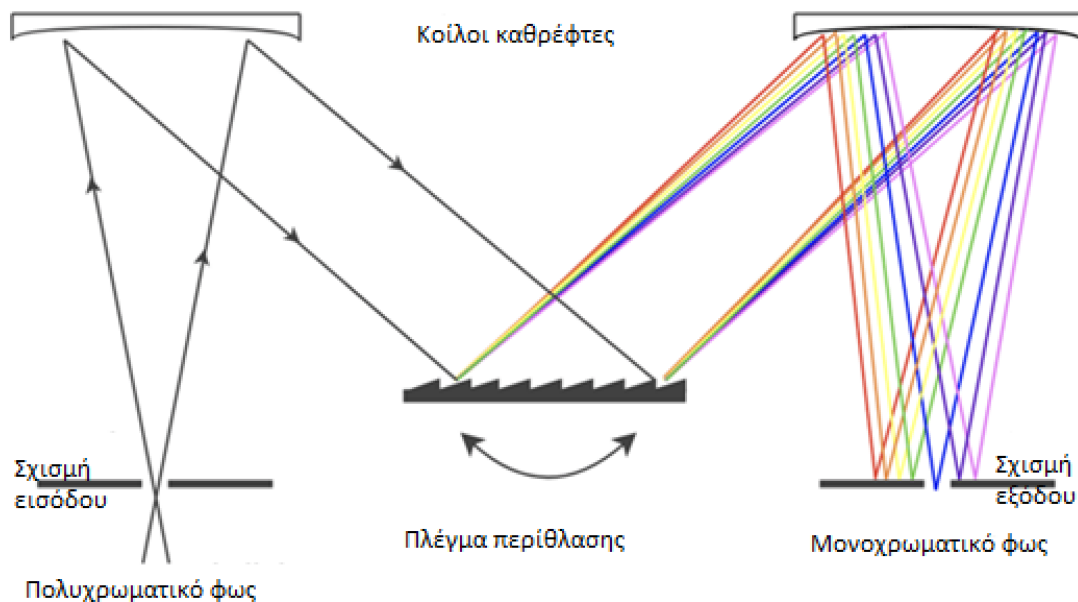
Συγκεκριμένα για την **φωτεινή πηγή**, ιδανικά θα έπρεπε να εκπέμπει με την ίδια ένταση φωτός σε όλα τα μήκη κύματος. Προφανώς μια τέτοια πηγή δεν υπάρχει και χρειάζεται να εξετάσουμε τα χαρακτηριστικά της προκειμένου να επιλεγεί η κατάλληλη για την κάθε περίπτωση. Για παράδειγμα, οι λάμπες Xenon εκπέμπουν σχετικά σταθερά από τα 250 έως τα 700nm, με εξαίρεση κοντά στα 450nm όπου παρατηρούνται διακυμάνσεις στην

εκπομπή, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει παραμορφώσεις στο φάσμα διέγερσης υλικών που απορροφούν στο ορατό ή το UV. [6]



Εικόνα 12: Φασματική απόκριση λάμπας Xenon [6]

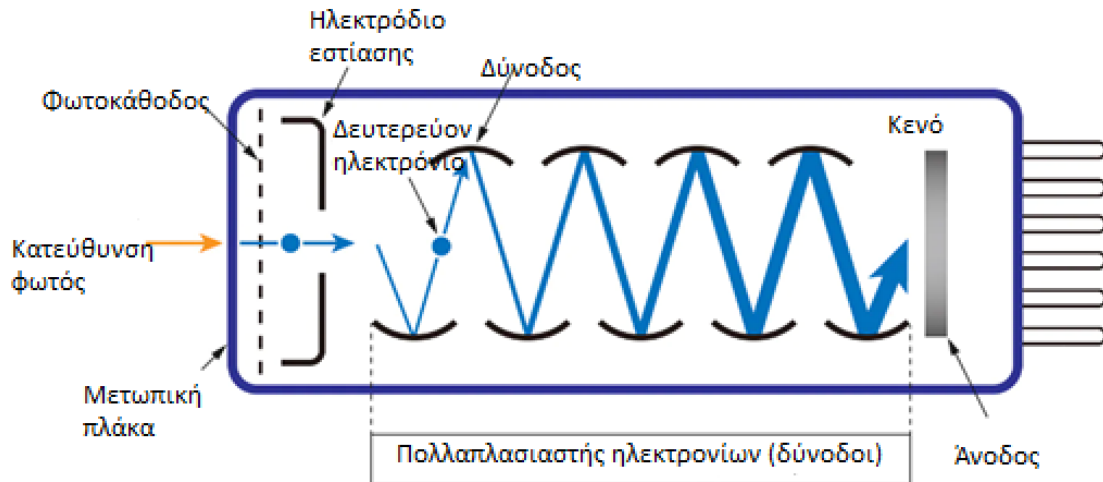
Ο **μονοχρωμάτορας** διασπείρει το λευκό φως ή το πολυχρωματικό φως της πηγής στα διάφορα χρώματα του φάσματος που αντιστοιχούν σε ένα εύρος μηκών κύματος. Δηλαδή, αναλύει την φωτεινή δέσμη του φωτός στα χρώματα του φάσματός της, διαχωρίζοντας αυτά ανάλογα του μήκους κύματος. Αυτός ο διαχωρισμός πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας πρίσματα ή συνηθέστερα περιθλαστικά φράγματα τα οποία απομονώνουν την **επιθυμητή μονοχρωματική ακτινοβολία**. Από την σχισμή εξόδου διέρχεται η επιθυμητή μονοχρωματική ακτινοβολία, η ένταση της οποίας είναι περίπου ανάλογη του τετραγώνου του πλάτους της σχισμής. Έτσι μεγαλύτερη σχισμή συνεπάγεται υψηλότερο σήμα αλλά και θόρυβο (SNR- signal-to-noise-ratio), ενώ μικρότερη σχισμή συνεπάγεται υψηλότερη ανάλυση αλλά σε βάρος της έντασης ακτινοβολίας. Η έξοδος ενός μονοχρωμάτορα δεν εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός και από την πόλωση αυτού. [6]



Εικόνα 13: Απλοποιημένο διάγραμμα μιας από τις πρώτες ρυθμίσεις μονοχρωματόρων με βάση το πλέγμα περίθλασης, γνωστού ως μονοχρωμάτορα Czerny-Turner. Περιστρέφοντας το πλέγμα περίθλασης και δημιουργώντας μια ασύμμετρη γεωμετρία, μπορεί να απομονωθεί ένα πολύ στενό εύρος μηκών κύματος. [40]

Ως **ανιχνευτές** χρησιμοποιούνται συνήθως φωτοπολλαπλασιαστές (Photomultiplier Tubes - PMTs), που αποτελούνται από μία φωτοκάθοδο και μια σειρά δυνόδων, ή συσκευές/διατάξεις συζευγμένου φορτίου (CCDs) ή και φωτοδιόδοι. Ο ιδανικός ανιχνευτής πρέπει να ανιχνεύει φωτόνια σε όλα τα μήκη κύματος με την ίδια απόδοση. Οι ανιχνευτές μετατρέπουν το φως σε ηλεκτρικό σήμα ανάλογο της έντασης του φωτός που προσπίπτει σε αυτούς.

Οι PMTs ανιχνευτές στηρίζονται στο φωτοηλεκτρικό φαινόμενο. Τα φωτόνια προσπίπτουν στην φωτοκάθοδο ελευθερώνοντας ηλεκτρόνια, τα οποία μέσω δυνόδων επιταχύνονται και πολλαπλασιάζονται οδηγώντας σε ενισχυμένο ηλεκτρικό σήμα. [6]



Εικόνα 14: Απεικόνιση του ανιχνευτή PMT [41]

Ενώ οι CCDs ανιχνευτές στηρίζονται επίσης στο φωτοηλεκτρικό φαινόμενο αλλά και στην κίνηση του φορτίου. Τα προσπίπτοντα φωτόνια παράγουν ζευγάρια οπών-ηλεκτρονίων στον ημιαγωγό, από τον οποίο κατασκευάζεται η διάταξη αυτή, και στη συνέχεια αυτά τα φορτία μετατοπίζονται εντός της συσκευής ώστε να καταλήξουν ως ηλεκτρικό σήμα στο PC. Αυτού του είδους ο ανιχνευτής αποτελεί ένα σύστημα απεικόνισης του ηλεκτρικού σήματος που έχει προέλθει από τα φωτόνια που εκπέμπει το δείγμα μας, αναλύοντας όλο το φάσμα. [6]

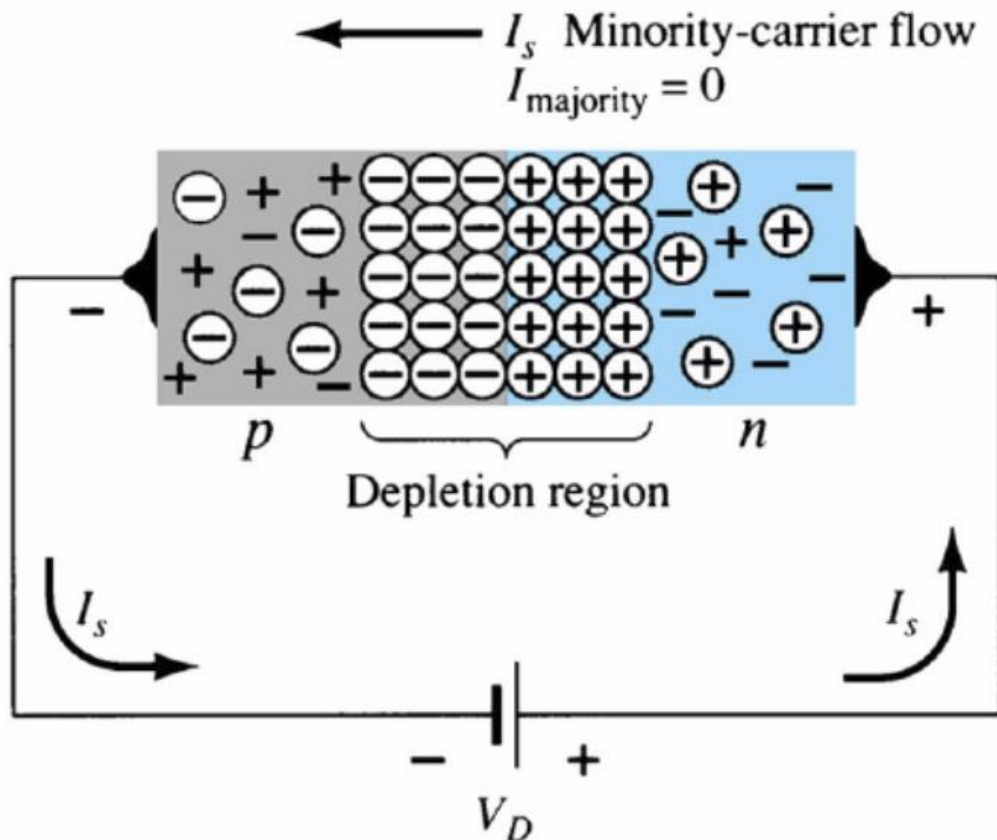
Παρακάτω θα επικεντρωθούμε κυρίως στην ανάλυση αυτού των CCD ανιχνευτών όπως και των φωτοδιόδων καθώς γίνεται χρήση τους στις διατάξεις που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο.

Φωτοδίοδος

Εδώ έχει αξία να αναφερθεί η λειτουργία της φωτοδιόδου. Η φωτοδίοδος είναι μια ημιαγωγική συσκευή που μετατρέπει το φως σε ηλεκτρικό ρεύμα. Αποτελεί ένα είδος φωτοανιχνευτή που λειτουργεί με βάση το φωτοβολταϊκό φαινόμενο, δηλαδή την πόλωση ηλεκτρικών φορτίων. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία δημιουργεί ζευγάρια ηλεκτρονίων-οπών στον ημιαγωγό, που αποτελεί το υλικό κατασκευής της φωτοδιόδου, συνήθως πρόκειται για ημιαγωγούς p-n. Οι φωτοδιόδοι συνήθως λειτουργούν με ανάστροφη πόλωση (αντίστροφη τάση που εφαρμόζεται στην ένωση p-n). Αυτό δημιουργεί μια περιοχή εξάντλησης που ενισχύει τον διαχωρισμό και τη συλλογή του φορτίου που παράγεται από τα προσπίπτοντα φωτόνια. [6]

Η φωτοδίοδος λειτουργεί σύμφωνα με την παρακάτω αρχή, η οποία απεικονίζεται και στο σχήμα που ακολουθεί. Ένα φωτόνιο με συγκεκριμένη ενέργεια προσπίπτει στην ένωση p-n μεταφέροντας ενέργεια στα ηλεκτρόνια του ομοιοπολικού δεσμού με αποτέλεσμα κάποια από αυτά τα ηλεκτρόνια να διασπώνται από τον ομοιοπολικό δεσμό

και να παράγονται ζεύγη ηλεκτρονίων-οπών, που αποκαλούνται φωτοφορείς. Ο αριθμός των φωτοφορέων είναι περιορισμένος ενώ ο αριθμός των μειοψηφικών φορέων πριν την πρόσπτωση του φωτός είναι μεγαλύτερος επομένως έχουν και μεγαλύτερη επίδραση. Αυτός είναι και ο λόγος που η φωτοдиодος λειτουργεί σε ανάστροφη πόλωση και όχι σε ορθή.



Εικόνα 15: Οπτική απεικόνιση λειτουργίας φωτοδιόδου σε ανάστροφη πόλωση πριν την πρόσπτωση του φωτός [32]

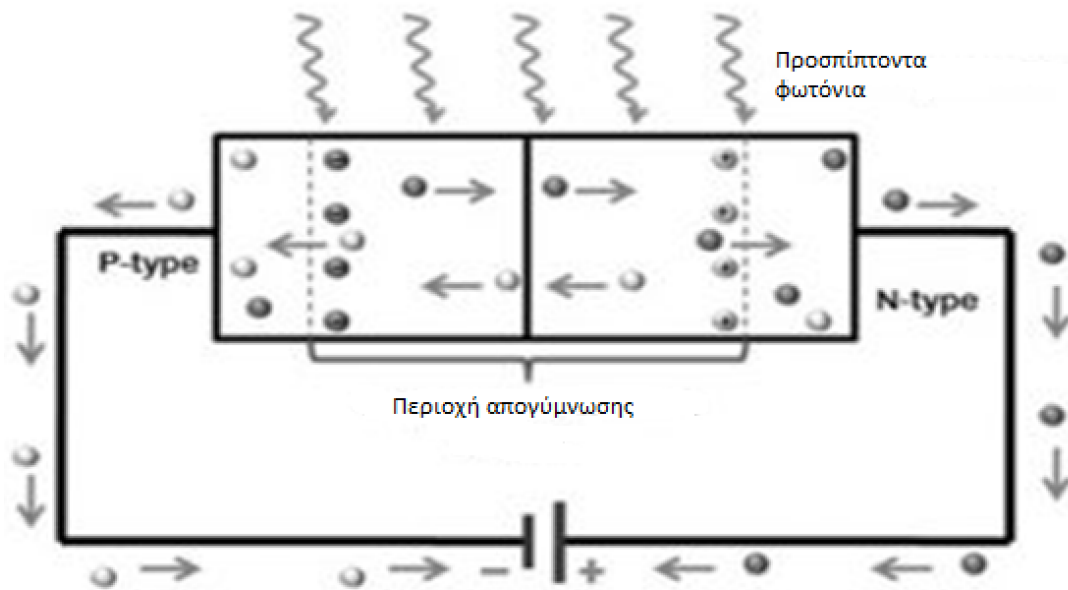
Έτσι, υπό ανάστροφη τάση, οι φορείς μειοψηφίας που αυξάνονται από τους φωτοπαραγόμενους φορείς συμμετέχουν στην κίνηση ολίσθησης. Στην περιοχή P, τα φωτοπαραγόμενα ηλεκτρόνια διαχέονται στη διασταύρωση p-n. Εάν το πάχος της περιοχής P είναι μικρότερο από το μήκος διάχυσης ηλεκτρονίων, τότε τα περισσότερα φωτοπαραγόμενα ηλεκτρόνια θα περάσουν από την περιοχή P στη διασταύρωση p-n. Το ίδιο συμβαίνει και στην περιοχή N. Επομένως, στην κατασκευή φωτοδιόδων, η διασταύρωση PN είναι πολύ λεπτή ώστε προωθήσει την μετατόπιση των μειοψηφικών φορέων.

Σε γενικές γραμμές, το έργο μιας φωτοδιόδου είναι μια διαδικασία απορρόφησης, η οποία μετατρέπει το φως σε ανάστροφο ρεύμα. Ο συνδυασμός του ρεύματος και του σκοτεινού ρεύματος αποτελεί το φωτορεύμα, επομένως το σκοτεινό ρεύμα

ελαχιστοποιείται όσο το δυνατόν περισσότερο για να βελτιωθεί η ευαισθησία της φωτοδιόδου στο φως. [31]

Σκοτεινό ρεύμα, στη λειτουργία φωτοαγωγών, είναι το ρεύμα που διαπερνά τη φωτοδίοδο απουσία φωτός. Το σκοτεινό ρεύμα στη φωτοδίοδο περιλαμβάνει το ρεύμα ακτινοβολίας και το ρεύμα κορεσμού της διασταύρωσης ημιαγωγών. Πρέπει να μετρηθεί εκ των προτέρων. Το σφάλμα που προκαλείται από το σκοτεινό ρεύμα πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά και να διορθωθεί.

Η ένταση του φωτός είναι ανάλογη με το φωτορεύμα. Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του φωτός, τόσο μεγαλύτερο είναι το ανάστροφο ρεύμα. Αυτό το χαρακτηριστικό ονομάζεται φωτοαγωγιμότητα και το ρεύμα που προκαλείται από αυτό ονομάζεται φωτορεύμα. [31]



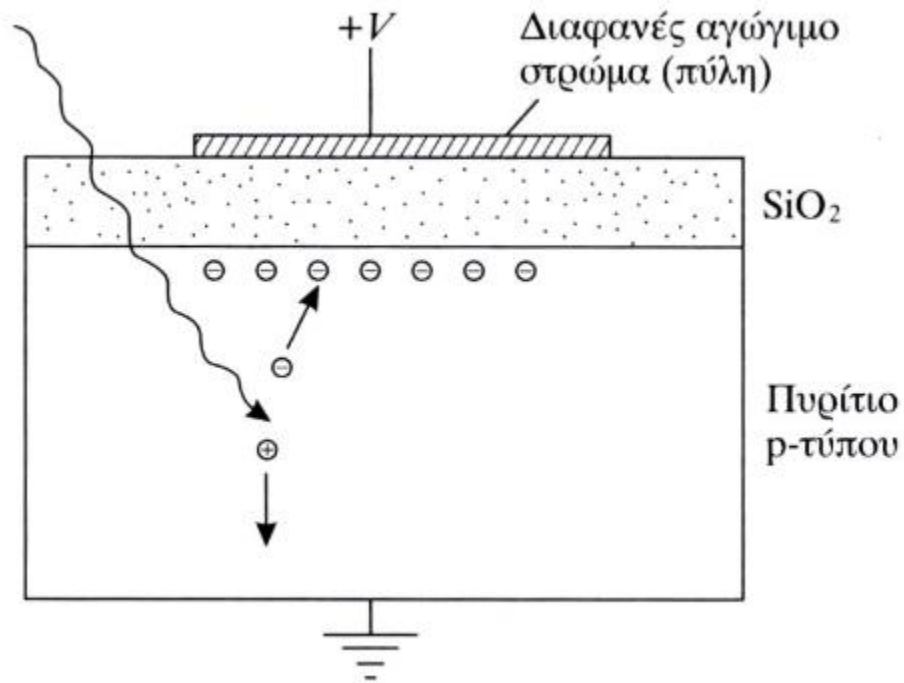
Εικόνα 16: Οπτική απεικόνιση λειτουργίας φωτοδιόδου σε ανάστροφη πόλωση μετά την πρόσπτωση του φωτός [33]

Ανιχνευτής CCD

Ο στοιχειώδης ανιχνευτής CCD αποτελείται από τρεις ανιχνευτές MOS παράλληλα τοποθετημένους. Η καινοτομία της συσκευής, έγκειται στη μεταφορά του σήματος, από τον ένα πυκνωτή, στον άλλο.

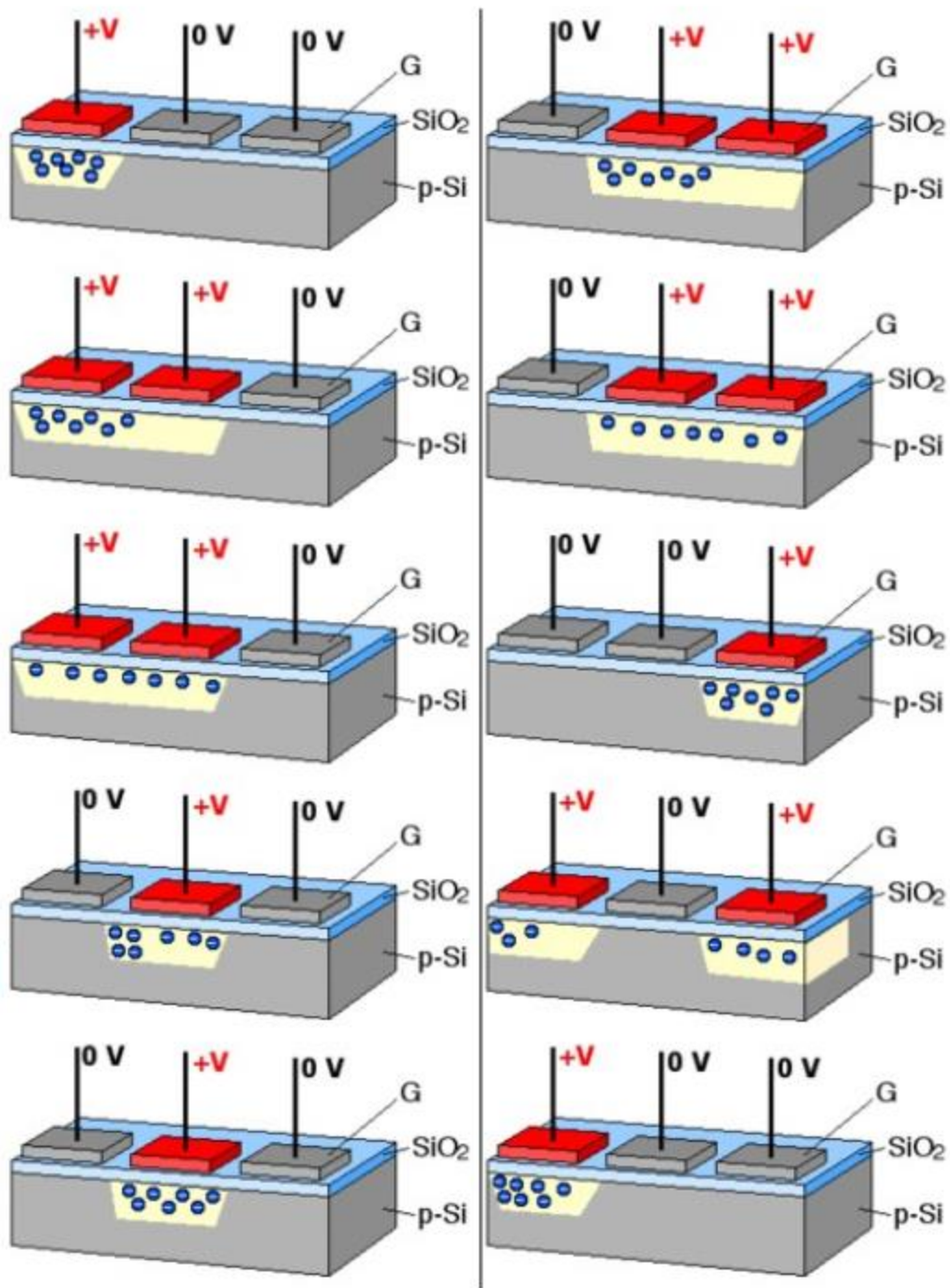
Ο πυκνωτής MOS αποτελείται από τρεις στρώσεις υλικού, έναν ημιαγωγό, ένα μονωτή και ένα μέταλλο όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα. Όταν ο πυκνωτής είναι ορθά πολωμένος, δημιουργείται ένα πηγάδι δυναμικού κάτω από το ηλεκτρόδιο. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία δημιουργεί ζεύγη οπών και ηλεκτρονίων στον ημιαγωγό. Τα

ηλεκτρόνια δεσμεύονται από το πηγάδι δυναμικού και μένουν κοντά στη διεπιφάνεια ημιαγωγού-μονωτή.



Εικόνα 17: Πυκνωτής MOS ([34])

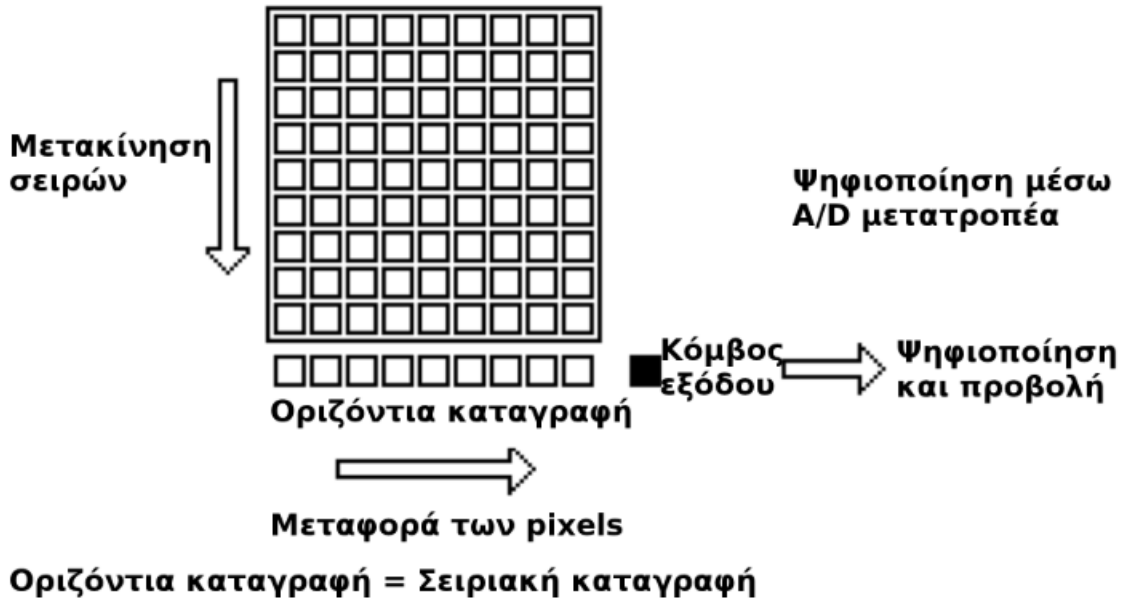
Επανερχόμαστε τώρα στην λειτουργία του ανιχνευτή CCD. Η σύλληψη και μεταφορά του σήματος γίνεται σε τρεις φάσεις. Αρχικά πολώνουμε μόνο την πρώτη πύλη, έτσι όλο το σήμα συγκεντρώνεται εκεί. Έπειτα, πολώνουμε τη δεύτερη πύλη και μηδενίζουμε το δυναμικό της πρώτης. Το σήμα έκανε ένα "βήμα" δεξιά. Όμοια πράττουμε και με την τρίτη πύλη. Ο κύκλος ολοκληρώθηκε. Αυτό γίνεται καλύτερα κατανοητό με το παρακάτω σχήμα. [35]



Εικόνα 18: Διάταξη CCD [34]

Υπάρχουν δύο είδη CCD, τα φωτιζόμενα από εμπρός με χαμηλότερη κβαντική απόδοση και τα φωτιζόμενα από πίσω με υψηλότερη κβαντική απόδοση αλλά και υψηλότερο κόστος.

Ένας ανιχνευτής CCD αποτελείται από πολλά τέτοια στοιχεία, τοποθετημένα σε μονοδιάστατο ή δισδιάστατο πλέγμα, ανάλογα την εφαρμογή. Το σήμα μεταφέρεται προς τα κάτω, σε κάθε σειρά και καταγράφεται σε ένα γραμμικό ανιχνευτή CCD. Έπειτα, μεταφέρεται και διαβάζεται σειριακά, από τον κόμβο εξόδου. Ακολουθεί η ψηφιοποίηση και τελική επεξεργασία του σήματος. Αυτό γίνεται περισσότερο κατανοητό με την παρακάτω εικόνα όπου κάθε pixel αποτελεί και έναν ανιχνευτή CCD όπως φαίνεται στην προηγούμενη εικόνα. [34],[36]



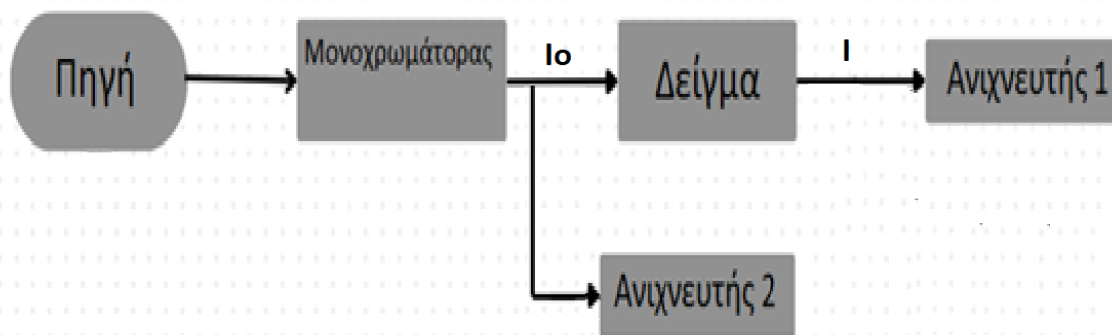
Εικόνα 19: Ανιχνευτής δύο διαστάσεων [34]

Πειραματικό μέρος

2.1 Οργανολογία μέτρησης

Προκειμένου να μελετήσουμε την απορρόφηση και τον φθορισμό των δειγμάτων μας κάνουμε χρήση του φασματοφωτόμετρου, που είναι ένα όργανο που μετρά ένταση ακτινοβολίας σε ένα εύρος μηκών κύματος. Έτσι ανάλογα με το εύρος μέτρησης του οργάνου που έχει αναπτυχθεί αλλά και τις ιδιότητες του υπό εξέταση υλικού, δηλαδή σε ποια μήκη κύματος απορροφά ή φθορίζει, καθορίζεται η καταλληλότητα του οργάνου να πραγματοποιήσει τη συγκεκριμένη μέτρηση. [24]

Το **φάσμα απορρόφησης** προκύπτει όταν πολυχρωματική ακτινοβολία προσπέσει σε ένα δείγμα με αποτέλεσμα να απομακρυνθούν ορισμένα μήκη κύματος ως αποτέλεσμα της μεταφοράς ενέργειας στα άτομα της ουσίας για τα δεδομένα μήκη κύματος. Ένα φασματοφωτόμετρο που μετρά απορρόφηση, ωστόσο, λειτουργεί με βάση το παρακάτω σχήμα. Δηλαδή έχουμε μια πολυχρωματική πηγή φωτός που εκπέμπει ακτινοβολία, η οποία καταλήγει σε έναν μονοχρωμάτορα, όπου 'επιλέγει' ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος, του οποίου το ένα μέρος περνά μέσα από το δείγμα ώστε να καταλήξει στον φωτοανιχνευτή έντασης και ένα άλλο μέρος του καταλήγει απευθείας σε έναν άλλον φωτοανιχνευτή ώστε να προσδιοριστεί η αρχική ένταση ακτινοβολίας I_0 . Στη συνέχεια από την σχέση $\log(I_0/I)$ υπολογίζεται η απορρόφηση για το δεδομένο μήκος κύματος. Ακολούθως η διαδικασία επαναλαμβάνεται με σάρωση των μηκών κύματος με την βοήθεια του μονοχρωμάτορα ώστε να προκύψει το φάσμα απορρόφησης.

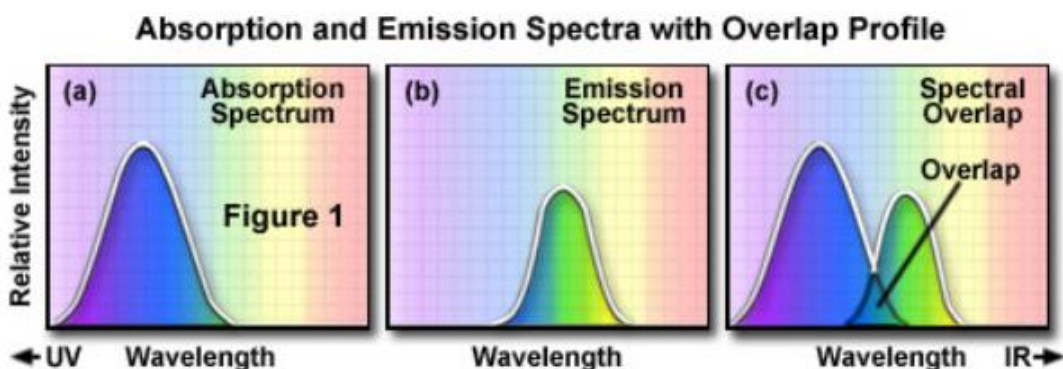


Εικόνα 20: Σχεδιάγραμμα φασματοφωτόμετρου απορρόφησης

Προκειμένου να προσδιοριστεί το **φάσμα εκπομπής** μιας δεδομένης ουσίας, προσδιορίζεται το μήκος κύματος όπου αυτή απορροφά μέγιστα και στην συνέχεια διεγείρεται σε αυτό το μήκος κύματος. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία διέρχεται από έναν μονοχρωμάτορα, μια συσκευή που επιτρέπει τη διέλευση μεμονομένων μηκών κύματος φωτός ή στενών ζωνών μηκών κύματος φωτός και καταλήγει σε έναν φωτοανιχνευτή όπου και καταγράφεται η ένταση της. Με σάρωση των μηκών κύματος με τη βοήθεια του μονοχρωμάτορα μπορούν να καταγραφούν οι εντάσεις του εκπεμπόμενου φθορισμού

στα διάφορα μήκη κύματος και έτσι να συλλεγεί το φάσμα φθορισμού του προς εξέταση δείγματος.

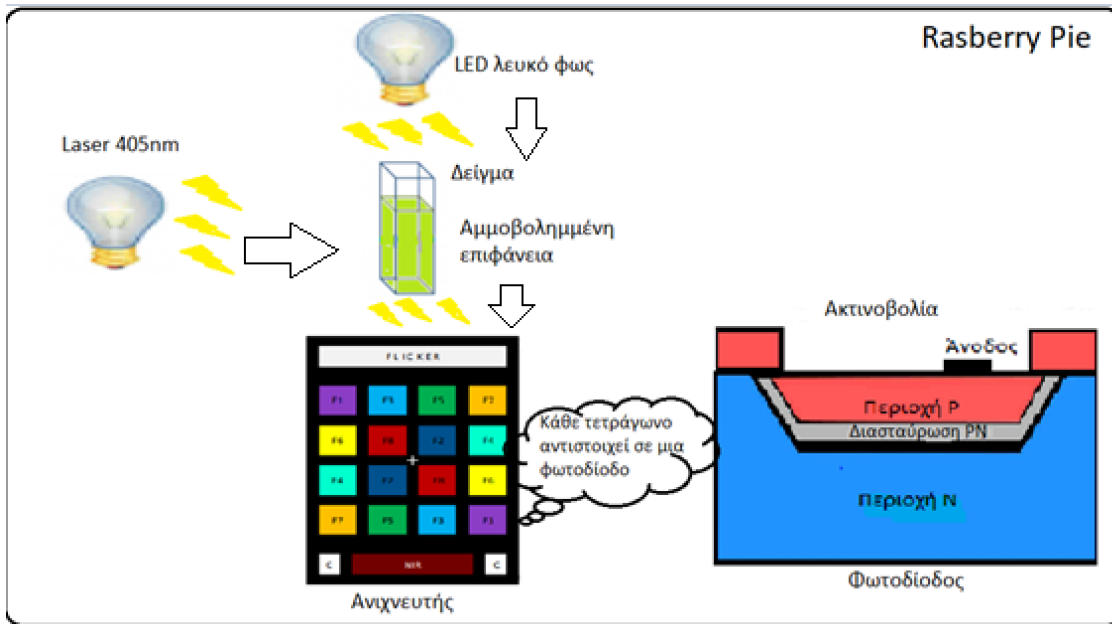
Το **φάσμα διέγερσης** μιας ουσίας προσδιορίζεται με παρόμοιο τρόπο καταγράφοντας την εκπομπή φθορισμού στο μήκος κύματος της μέγιστης έντασης εκπομπής, ενώ η υπό εξέταση ουσία διεγείρεται μέσω μιας ομάδας διαδοχικών μηκών κύματος. Επιλέγεται η μέγιστη εκπομπή και μόνο το φως εκπομπής σε αυτό το μήκος κύματος επιτρέπεται να περάσει στον ανιχνευτή. Η διέγερση προκαλείται (συνήθως μέσω ενός μονοχρωμάτορα) σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης και η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού μετράται ως συνάρτηση του μήκους κύματος διέγερσης. Το αποτέλεσμα είναι ένα γράφημα ή καμπύλη, που απεικονίζει τη σχετική απόδοση των διαφόρων μηκών κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας στην επαγωγή φθορισμού.



Εικόνα 21: Παράδειγμα φάσματος απορρόφησης και εκπομπής [25]

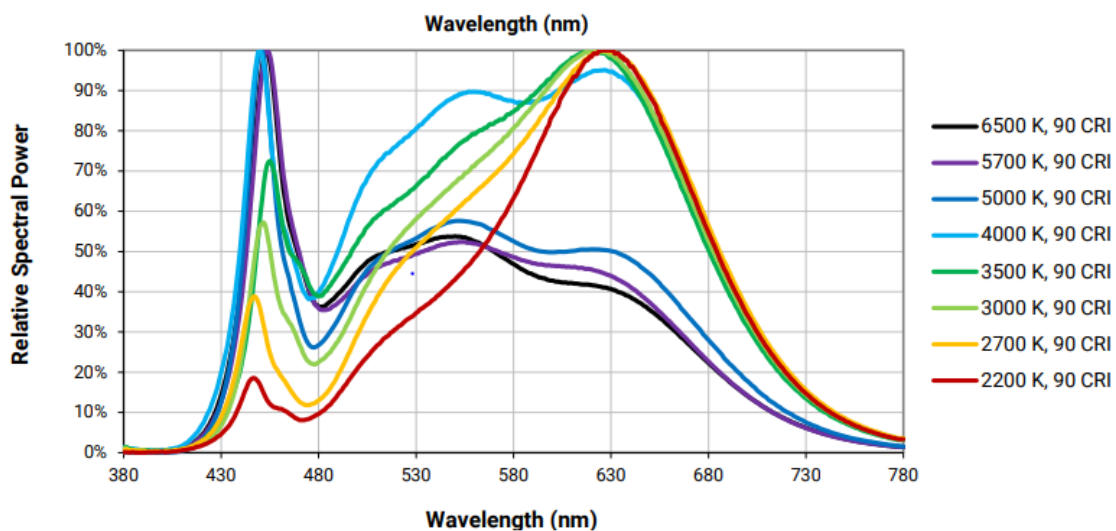
2.1.1 Ειδικά κατασκευασμένο φασματοφωτόμετρο εργαστηρίου (Pi-Lab)

Στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικών Αισθητηρίων έχει αναπτυχθεί ένα ειδικά κατασκευασμένο φασματοφωτόμετρο, το Pi-Lab, το οποίο μπορεί να μετρά τόσο την απορρόφηση όσο και τον φθορισμό των υπό εξέταση δειγμάτων. Υπολογίζει την φασματική απόκριση ενός δείγματος καλύπτοντας ένα εύρος από τα 350nm έως τα 1000nm περίπου, χωρίζοντας το φάσμα αυτό σε 8 κανάλια με κέντρο το ορατό. Οι μετρήσεις, που αποτυπώνονται σε χρωματικές κλίμακες, αποτελούν φασματοσκοπικές μετρήσεις έντασης. [28]



Εικόνα 24: Σχεδιάγραμμα του Pi-Lab φασματοφωτόμετρου

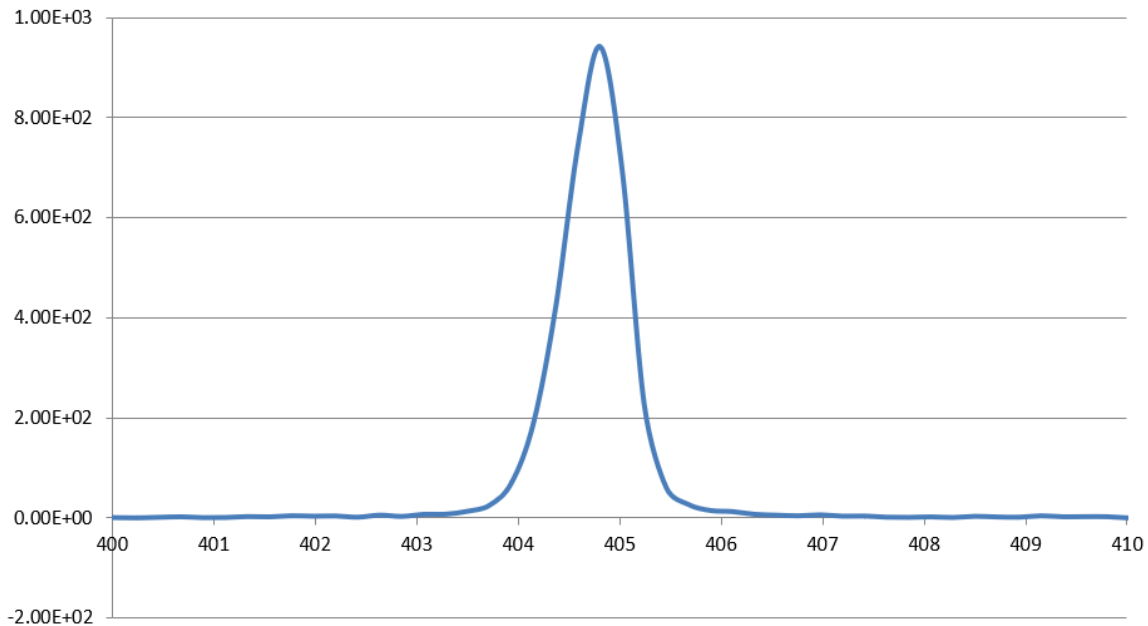
Ακόμη αποτελείται από ένα LED (4000K, 90 CRI) το οποίο έχει τοποθετηθεί απέναντι από τον ανιχνευτή, ενώ μεσολαβεί η κυβέτα χαλαζία (quartz) η οποία έχει τοποθετηθεί έτσι ώστε να προσπίπτει το φως του LED στην διάφανη επιφάνειά της [29]. Επομένως το LED χρησιμοποιείται για την μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος. Η χρήση κυβέτας χαλαζία είναι απαραίτητη για τη διέλευση φωτός στην περιοχή του UV. Παρακάτω παρατίθεται η φασματική απόκριση του LED (γαλάζια γραμμή) από την οποία μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το LED αντιμετωπίζεται ως πηγή λευκού φωτός εφόσον, αν και όχι με την ίδια ένταση/απόδοση, εκπέμπει σε όλο το μήκος του ορατού φάσματος.



Εικόνα 22: Φάσμα LED ([29], p.37)

Εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι στο Pi-Lab δεν υπάρχουν μονοχρωμάτορες ή φίλτρα προκειμένου να 'επιλεγεί' ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος διέγερσης αλλά χρησιμοποιείται το laser ως φωτεινή πηγή το οποίο το αντιμετωπίζουμε ως μια μονοχρωματική πηγή φωτός, όπως θα φανεί και στο διάγραμμα της φασματικής απόκρισης του laser όπου το εύρος εκπομπής του είναι πολύ στενό, περίπου στα 2nm γύρω από τα 405nm.

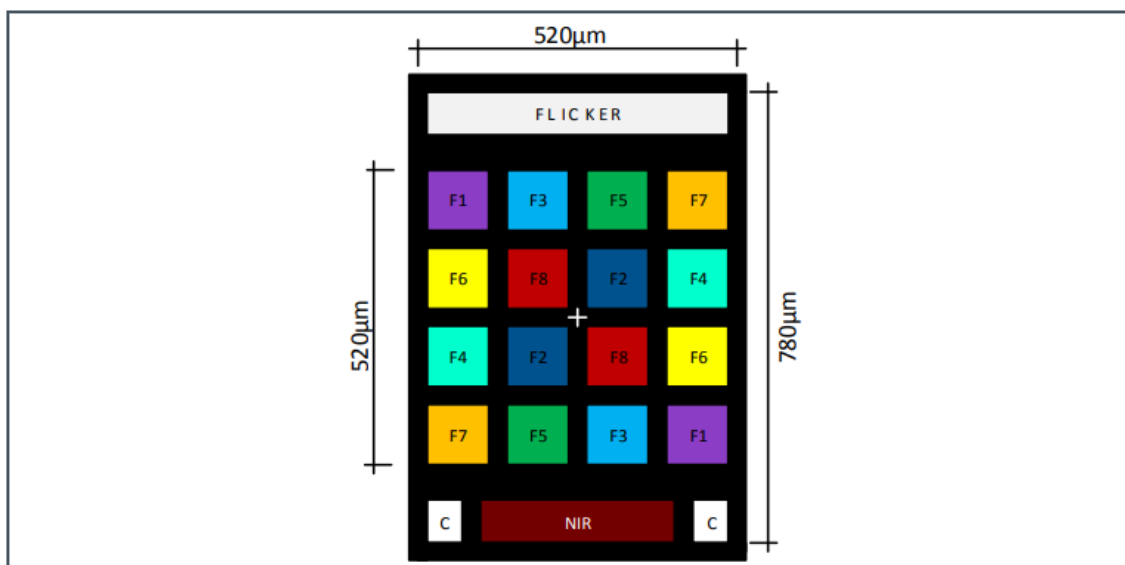
Φασματική Απόκριση Laser



Εικόνα 23: Φάσμα laser [28]

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, το Pi-Lab αποτελείται από μια διάταξη που απαρτίζεται από ένα laser που τοποθετείται κάθετα στην κυβέτα, στην οποία τοποθετείται το δείγμα μας, από ένα led που τοποθετείται απέναντι από την κυβέτα και τον ανιχνευτή που τοποθετείται στην ίδια ευθεία με την κυβέτα και το LED (LED-κυβέτα-φασματόμετρο). Ο ανιχνευτής διαθέτει μια συστοιχία φωτοδιόδων 4x4 προκειμένου να υπολογίσει την φασματική απόκριση του δείγματος σε καθένα από τα 8 κανάλια της χρωματικής κλίμακας.

Καθώς διαφορετικά είδη φωτοδιόδων είναι ευαίσθητα σε διαφορετικά μήκη κύματος το κάθε κανάλι της συστοιχίας φωτοδιόδων του Pi-Lab είναι ευαίσθητο σε συγκεκριμένο εύρος μηκών κύματος. Δηλαδή αν, για παράδειγμα, προσπέσει στην συστοιχία κόκκινο φως, δηλαδή με μήκος κύματος κοντά στα 680nm, τότε θα εντοπιστεί από το κανάλι F8. Ο λόγος που έχουν τοποθετεί συμμετρικά στην συστοιχία από δυο κανάλια για το κάθε μήκος κύματος που καλύπτεται είναι για να αυξηθούν οι πιθανότητες αυτό να εντοπιστεί και να μην 'χαθεί' εξαιτίας της γωνίας πρόσπτωσης του φωτός στον ανιχνευτή.



Εικόνα 25: Πίνακας της συστοιχίας φωτοδιόδων/ κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο κανάλι φάσματος [28]

Παρακάτω παρατίθεται η χρωματική κλίμακα του φασματομέτρου, όπου στην πρώτη στήλη είναι το όνομα του καναλιού, όπως ονοματίζεται και στον πίνακα παραπάνω, στην επόμενη είναι το κεντρικό μήκος κύματος όπου υπολογίζουμε την μέτρηση και η τελευταία είναι το εύρος του φάσματος γύρω από το κεντρικό μήκος κύματος, καθώς η κάθε μέτρηση είναι υπολογισμένη σε ένα εύρος και όχι σημειακή.

Κανάλι	Κεντρικό μήκος κύματος (nm)	Εύρος (nm)
F1	415	26
F2	445	30
F3	480	36
F4	515	39
F5	555	39
F6	590	40
F7	630	50
F8	680	52

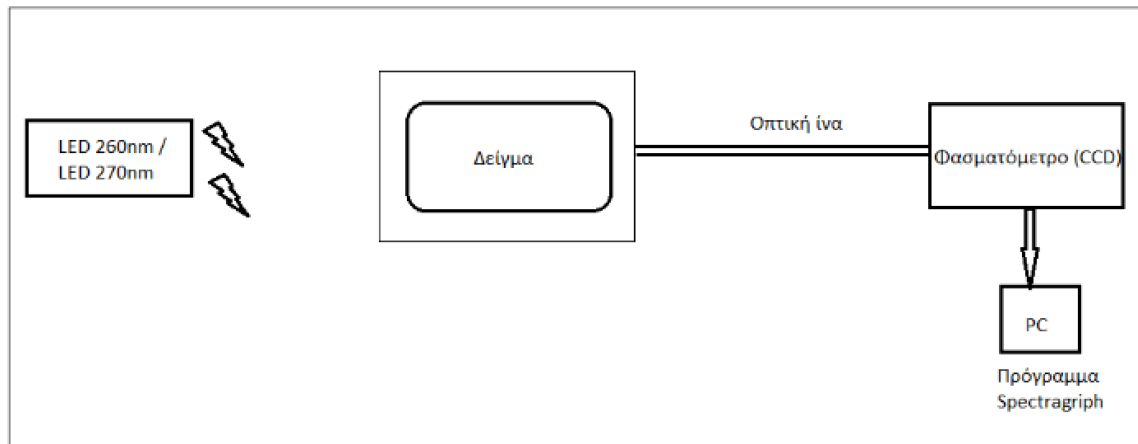
Ακόμη, αυτή η διάταξη χρησιμοποιείται και για εφαρμογές απεικόνισης του φάσματος του δείγματος. Για αυτό και το Pi-Lab δίνει ως έξοδο και κάποιες φωτογραφίες που εκφράζουν ακριβώς αυτό, την απεικόνιση του φάσματος ακτινοβολίας

Τέλος, μέσω του Rasbery-Pi εξάγονται οι μετρήσεις σε μορφή .csv οι οποίες παίρνουν αυθαίρετες τιμές. Το .csv αρχείο εξάγει μια στήλη 25 μετρήσεων από τις οποίες στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής αξιολογούμε τις 22. Οι 8 πρώτες είναι φασματικές μετρήσεις έντασης από το LED. Οι 8 επόμενες είναι φασματικές μετρήσεις έντασης από το LASER. Οι 3 επόμενες είναι RGB (Red-Green-Blue) μετρήσεις έντασης που έχουν

παρθεί από τη φωτογραφία του LED. Οι 3 επόμενες είναι RGB μετρήσεις έντασης από τη φωτογραφία του LASER. Οι μετρήσεις που αφορούν τη χρωματική κλίμακα (LED&LASER) έχουν 16bit ανάλυση (min-max//0-65536). Ενώ οι μετρήσεις RGB (Red-Green-Blue) θα μπορούσαν να αντιστοιχηθούν αυθαίρετα στα μήκη κύματος R:630nm, G:530nm και B:460nm και έχουν ανάλυση 8bit (min-max//0-256).

2.1.2 Ειδικά κατασκευασμένο αναλυτικό Φασματόμετρο φθορισμού με διέγερση στα 260 και 270nm με τη χρήση LED

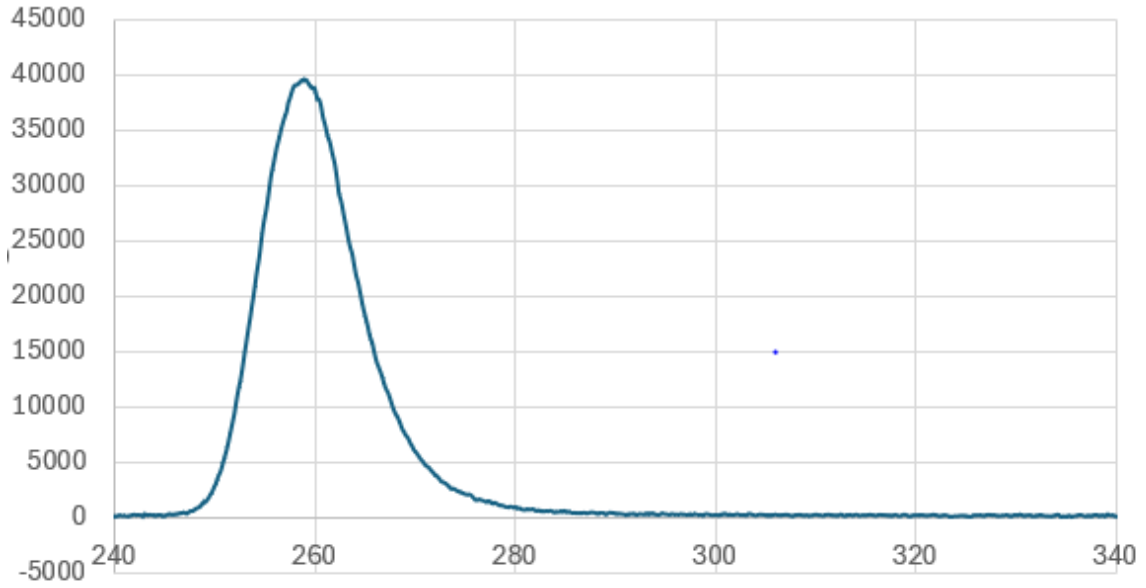
Στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικών Αισθητηρίων έχει αναπτυχθεί ειδικά κατασκευασμένο φασματόμετρο φθορισμού το οποίο χρησιμοποιεί για τη διέγερση του δείγματος LED στα 260 και 270 nm. Το φασματοφωτόμετρο απαρτίζεται από μια φωτεινή πηγή, την υποδοχή για την κυψελίδα όπου τοποθετούμε το υπό εξέταση δείγμα και μια οπτική ίνα που καταλήγει σε ένα φασματόμετρο της εταιρείας Thunder Optics. Η ανίχνευση του σήματος φθορισμού πραγματοποιείται από CCD πίνακα ο οποίος παράγει ηλεκτρικό σήμα ανάλογο της έντασης του φωτός που φτάνει σε αυτόν και συνεπώς περιέχει την πληροφορία για τον φθορισμό του δείγματος.



Εικόνα 26: Σχεδιάγραμμα φασματοφωτόμετρου φθορισμού με διέγερση στα 260 ή 270nm

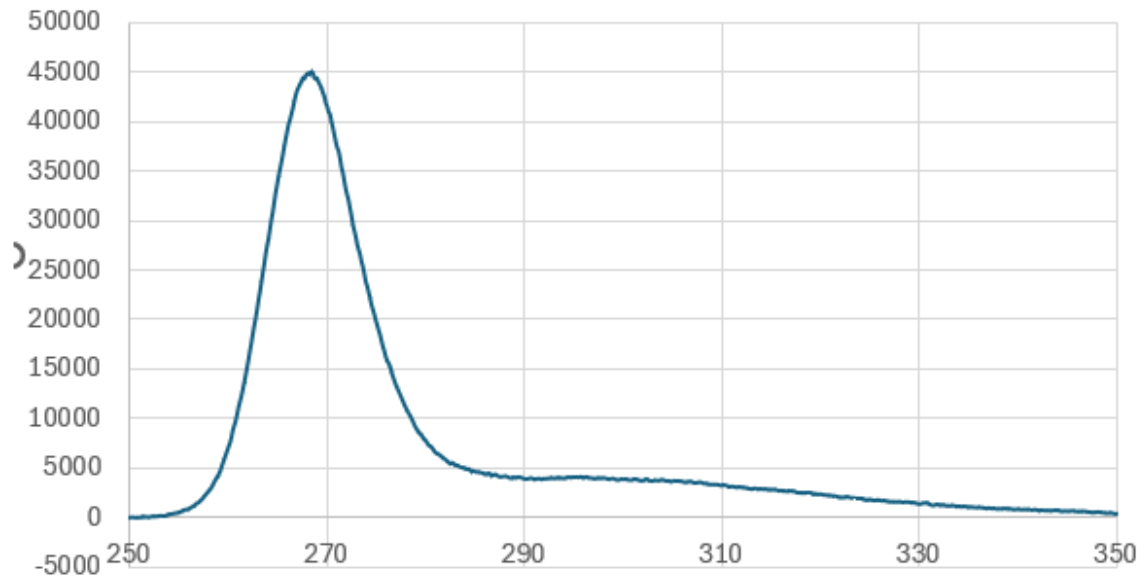
Όσο αφορά την φωτεινή πηγή για τη διέγερση του δείγματος υπάρχει δυνατότητα επιλογής ανάμεσα σε 2 LED, το UVTOP250H-FW-SMD με μήκος κύματος εκπομπής τα 255nm, 3.5mW, 100mA και το UVR270-SC12P με μήκος κύματος τα 270nm, 3mW, 50mA. Παρακάτω παρατίθενται και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του καθενός. Η φωτεινή πηγή που χρησιμοποιείται θεωρείται μονοχρωματική έτσι δεν χρησιμοποιείται κάποιος μονοχρωμάτορας ή φίλτρα στην διάταξη για την εκλογή κάποιου επιθυμητού μήκους κύματος διέγερσης. Από την φασματική απόκριση των δύο LED επιβεβαιώνεται αυτή η θεώρηση καθώς το φάσμα είναι στενό, στα 20nm περίπου ενώ φαίνεται ότι στα 255 και 270nm αντίστοιχα κορυφώνεται η ένταση ακτινοβολίας άρα είναι συγκεντρωμένη σε αυτά τα μήκη κύματος.

Φάσμα LED 260



Εικόνα 27: Φάσμα LED 255nm

Φάσμα LED 270



Εικόνα 28: Φάσμα LED 270nm

Το φασματόμετρο είναι εξοπλισμένο με CCD πίνακα, που όπως αναφέρεται και παραπάνω αποτελεί ένα είδος ανιχνευτή οπτικής πληροφορίας. Η πληροφορία αυτή μεταφράζεται σε ηλεκτρικό σήμα που καταλήγει στο PC με τις τιμές να αποθηκεύονται σε .csv μορφή, ταυτόχρονα εξάγεται το διάγραμμα φθορισμού.

Στη δική μας περίπτωση η επεξεργασία της πληροφορίας γίνεται μέσω του προγράμματος Spectrograph. Μέσω αυτού του προγράμματος μπορούμε να ορίζουμε διάφορες παραμέτρους όπως για παράδειγμα τον χρόνο ολοκλήρωσης. Ως χρόνος ολοκλήρωσης ορίζεται το χρονικό διάστημα που ο φωτοανιχνευτής συλλέγει την ένταση ακτινοβολίας του δείγματος προκειμένου να λάβει μια μέτρηση, όπου θεωρητικά δεν υπάρχει κάποια αλλαγή στο επίπεδο του σήματος σε αυτό το διάστημα. Από το σύνολο αυτών των μετρήσεων σε ένα δεδομένο χρονικό παράθυρο προκύπτει το διάγραμμα φθορισμού. Ο χρόνος ολοκλήρωσης που θα επιλέξουμε είναι σημαντική παράμετρος και χρειάζεται να γίνει κατάλληλη επιλογή αναλογιζόμενοι ότι μεγάλος χρόνος ολοκλήρωσης συνεπάγεται περισσότερο θόρυβο (Signal-to-Noise-Ratio) ενώ μικρός χρόνος ολοκλήρωσης σημαίνει μικρότερη ένταση ακτινοβολίας για την εκάστοτε μέτρηση.

2.2 Δείγματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τόσο υγιή όσο και καρκινικά κύτταρα δέρματος. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ειδικό επωαστικό κλίβανο ο οποίος διατηρεί σταθερή θερμοκρασία στους 37 °C και σταθερό ποσοστό CO₂ στο 5% με 85% υγρασία. Τα κύτταρα πλένονται με DPBS 1X (Pan Biotech) ενώ για την αποκόλληση τους από τη φλάσκα χρησιμοποιείται 0,7 mL/25 cm² Trypsin—EDTA 0.05 (Biosera).

2.2.1 Υγιή Κύτταρα

Ως υγιή κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν δερματικά κερατινοκύτταρα (NCTC 2544). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε ειδικές φλάσκες των 75 cm² με θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Biosera), εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS) (Qualified HI/Pen-Str 0.5%, Gibco) 1% αντιβιοτικό – αντιμυκητιακό διάλυμα (Antibiotic—Antimycotic) (Gibco), 0.5%, Πενικιλίνη – Στρεπτομυκίνη (Penicillin-Streptomycin) (Gibco) και 0.07% διάλυμα Γενταμικίνης (Gentamicin solution 1%) (Thermo Fisher Scientific).

2.2.2 Καρκινικά Κύτταρα

Ως καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα δερματικά καρκινικά κύτταρα της επιδερμίδας (A431). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε ειδικές φλάσκες των 25 cm² με θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)+ 4.5g/L D-Glucose, L-Glutamine [D-MEM (HG) W/NA PYR (CE) 500 mL] εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS) (Qualified HI/Pen-Str 0.5%, Gibco) 1% αντιβιοτικό – αντιμυκητιακό διάλυμα (Antibiotic—Antimycotic) (Gibco), 0.5%, Πενικιλίνη – Στρεπτομυκίνη (Penicillin-

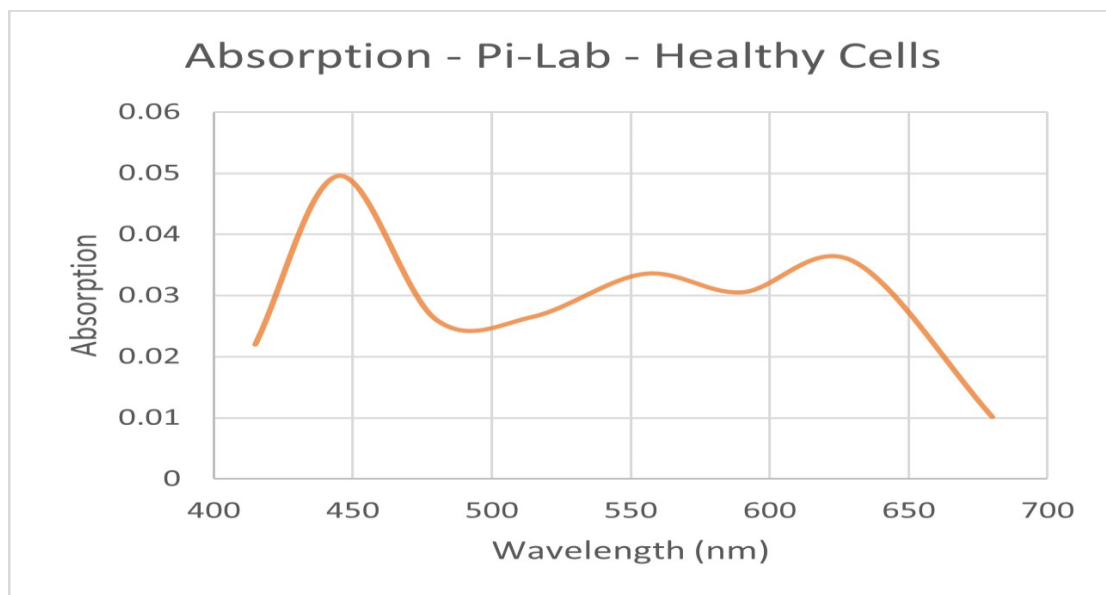
Streptomycin) (Gibco) και 0.07% διάλυμα Γενταμικίνης (Gentamicin solution 1%) (Thermo Fisher Scientific).

Αποτελέσματα- Συμπεράσματα

3.1 Αποτελέσματα για μετρήσεις μέσω Pi-Lab

Για την μέτρηση της απορρόφησης και του φθορισμού που πραγματοποιήθηκε μέσω του Pi-Lab, όπου η διάταξη του οργάνου και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του αναλύονται στο προηγούμενο μέρος, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις, με πυκνότητα κυττάρων 8.600.000 κύτταρα σε 3ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Οι μετρήσεις που έλαβαν χώρα αφορούν τα κύτταρα μαζί με την συμβολή των θρεπτικών τους μέσων. Ωστόσο, στα αποτελέσματα που παρατίθενται παρακάτω για διέγερση στα 405nm, έχει αφαιρεθεί η συμβολή του θρεπτικού μέσου κατόπιν επανάληψης των μετρήσεων μόνο με το θρεπτικό μέσο και αφαίρεσης της συμβολής του από τις μετρήσεις των κυττάρων. Έτσι στα ακόλουθα διαγράμματα παρατίθενται η συμπεριφορά των αμιγώς κυττάρων χωρίς να λαμβάνεται υπόψιν το θρεπτικό μέσο.

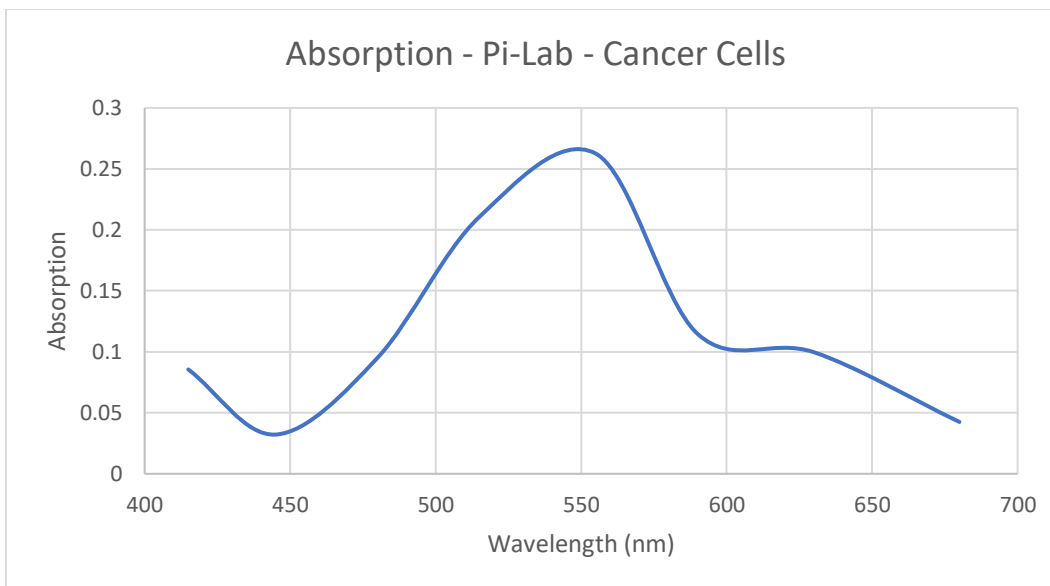
3.1.1 Απορρόφηση



Εικόνα 29: Απορρόφηση υγιών κυττάρων

Στην εικόνα 29 παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης των υγιών κυττάρων στο εύρος 400 -700 nm. Διακρίνονται 3 κορυφές απορρόφησης με τη μέγιστη στα 445 nm. Οι άλλες δυο κορυφές απορρόφησης με φθίνουσα ένταση εντοπίζονται στα 555 και 630 nm, αντίστοιχα.

Αντίστοιχα τα καρκινικά κύτταρα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 30, εμφανίζουν 2 κορυφές απορρόφησης στο διάστημα μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζουν μία κύρια κορυφή απορρόφησης στα 555 nm και μια δευτερεύουσα στα 630 nm.

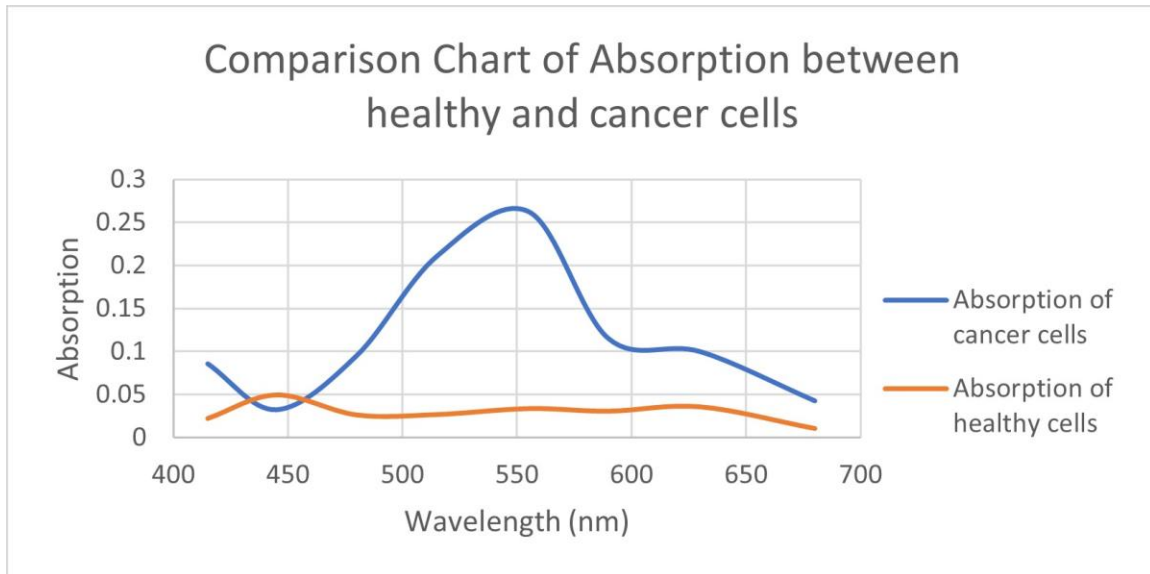


Εικόνα 30: Απορρόφηση καρκινικών κυττάρων

Συγκρίνοντας τα φάσματα απορρόφησης των υγιών και των καρκινικών κυττάρων (εικόνα 31) παρατηρούμε ότι εκτός από τα διαφορετικά μήκη κύματος στα οποία αυτά απορροφούν μέγιστα υπάρχει και μία σημαντική διαφορά στην ένταση της απορρόφησης. Η μέγιστη απορρόφηση για τα υγιή κύτταρα στα 445 nm είναι αρκετά χαμηλή, στα 0.05, ενώ η αντίστοιχη μέγιστη απορρόφηση για τα καρκινικά κύτταρα στα 555 nm είναι 0.3.

Συνεπώς τα καρκινικά κύτταρα έχουν περίπου πενταπλάσια μέγιστη απορρόφηση από αυτή των υγιών στα 555nm. Αξίζει επίσης να σημειώσουμε ότι στα 445nm, εκεί που απορροφούν μέγιστα τα υγιή κύτταρα, η σχέση των δύο κυττάρων ως προς την απορρόφηση αντιστρέφεται και τα υγιή εμφανίζουν ελαφρώς μεγαλύτερη απορρόφηση αυτής των καρκινικών.

Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι **η απορρόφηση των κυττάρων διαφοροποιείται σημαντικά καθώς αυτά μετατρέπονται από υγιή σε καρκινικά, και μπορεί να αποτελέσει έναν σημαντικό βιοδείκτη για τη διάγνωση καρκινικών αλλοιώσεων.**

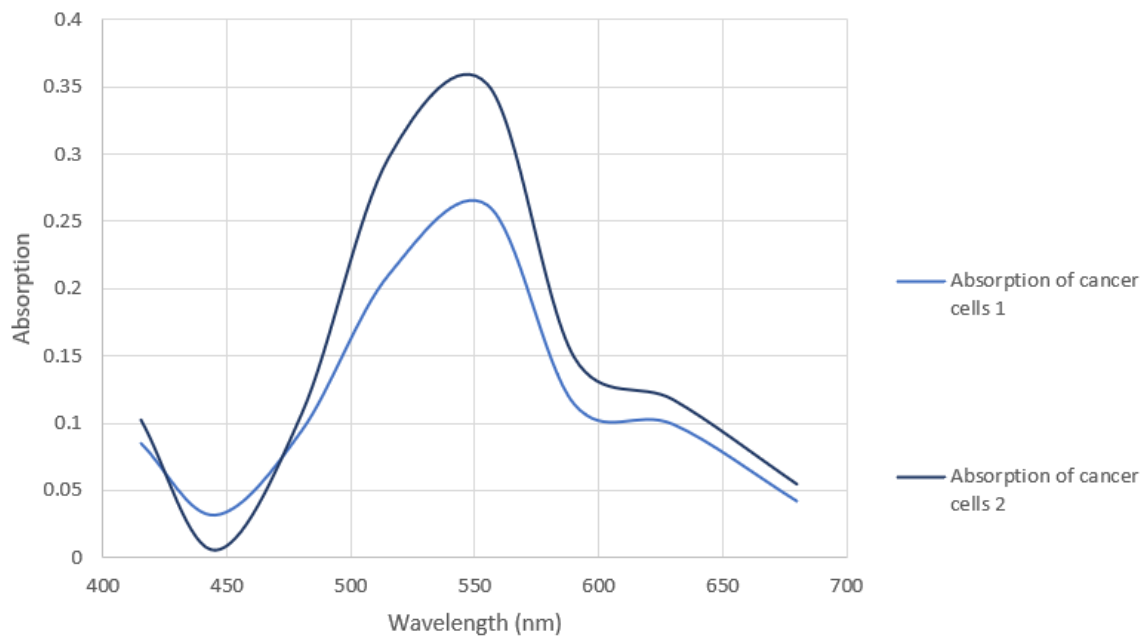


Εικόνα 21: Υπέρθυση φάσματος απορρόφησης υγιών και καρκινικών κυττάρων

Σχετικά με την επαναληψιμότητα των μετρήσεων της απορρόφησης, πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές μετρήσεις σε διαφορετικούς χρόνους με πανομοιότυπα δείγματα (ίδιο θρεπτικό μέσο, ίδια συγκέντρωση κυττάρων, συνθήκες συντήρησης). Όπως φαίνεται ενδεικτικά και στο διάγραμμα (Εικόνα 32) οι μετρήσεις είναι επαναλήψιμες καθώς παρατηρούμε ίδια μορφή φάσματος, μέγιστη απορρόφηση για ίδιο μήκος κύματος, ενώ οι διαφορετικές τιμές απορρόφησης πιθανόν οφείλονται στα δείγματα καθώς οι συγκεντρώσεις τους είναι στατιστικά υπολογισμένες και πιθανόν να υπάρχουν αποκλίσεις.

Συνεπώς το ειδικά κατασκευασμένο φασματοφωτόμετρο απορρόφησης που έχει αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικών Αισθητηρίων αποτελεί ένα αξιόπιστο εργαλείο μέτρησης της απορρόφησης παρέχοντας αξιόπιστες και επαναλήψιμες μετρήσεις.

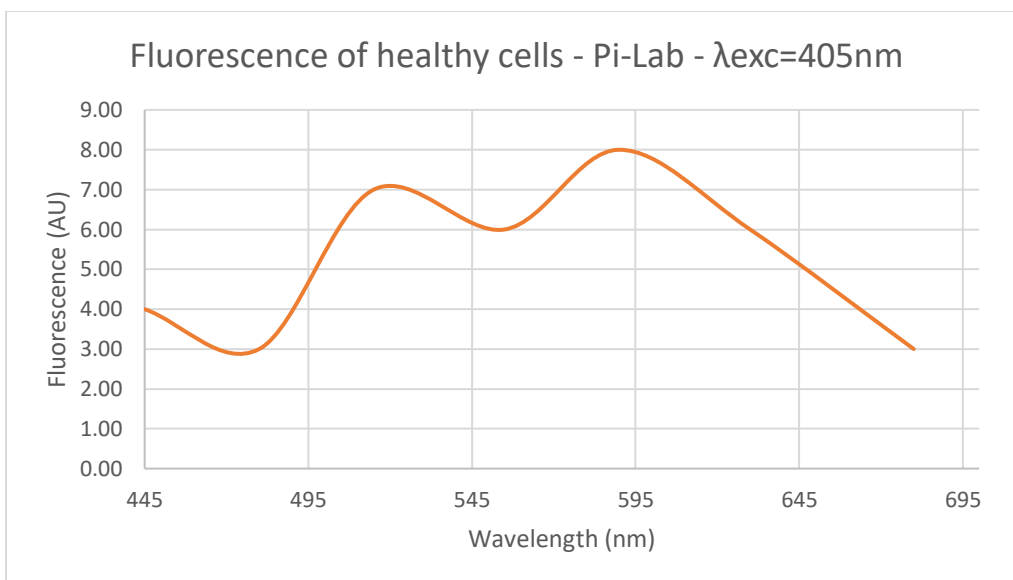
Repeatability of absorption of cancer cells



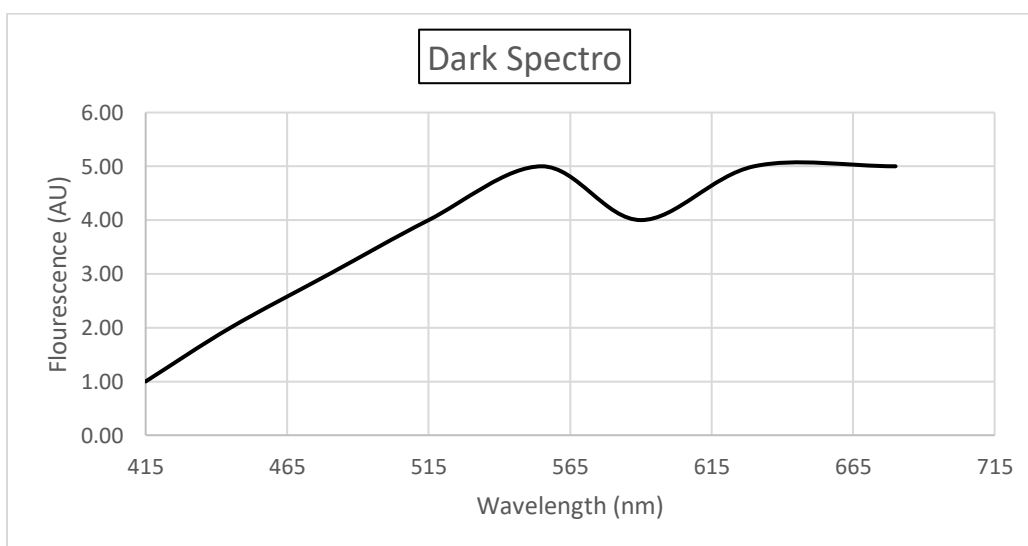
Εικόνα 32: Σύγκριση μεταξύ διαφορετικών μετρήσεων για την απορρόφηση των καρκινικών κυττάρων

3.1.2 Φθορισμός με διέγερση στα 405nm

Από ό,τι φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 33), για διέγερση στα 405nm τα υγιή κύτταρα εμφανίζουν πολύ ασθενή φθορισμό. Διακρίνονται δυο κορυφές εκπομπής στα 515 και στα 590 nm. Στη συνέχεια συλλέχθηκε η απόκριση του οργάνου απουσία διέγερσης και δείγματος ώστε να καταγραφεί ο θόρυβος της διάταξης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 34, ο θόρυβος του οργάνου είναι ίδιας τάξης μεγέθους με το φθορισμό που καταγράφηκε για τα υγιή κύτταρα, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο φθορισμός των υγιών κυττάρων δεν μπορεί να ληφθεί υπόψιν καθώς παίρνει τιμές κοντά στον θόρυβο του οργάνου, συνεπώς η συγκεκριμένη μέτρηση δε μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστη.

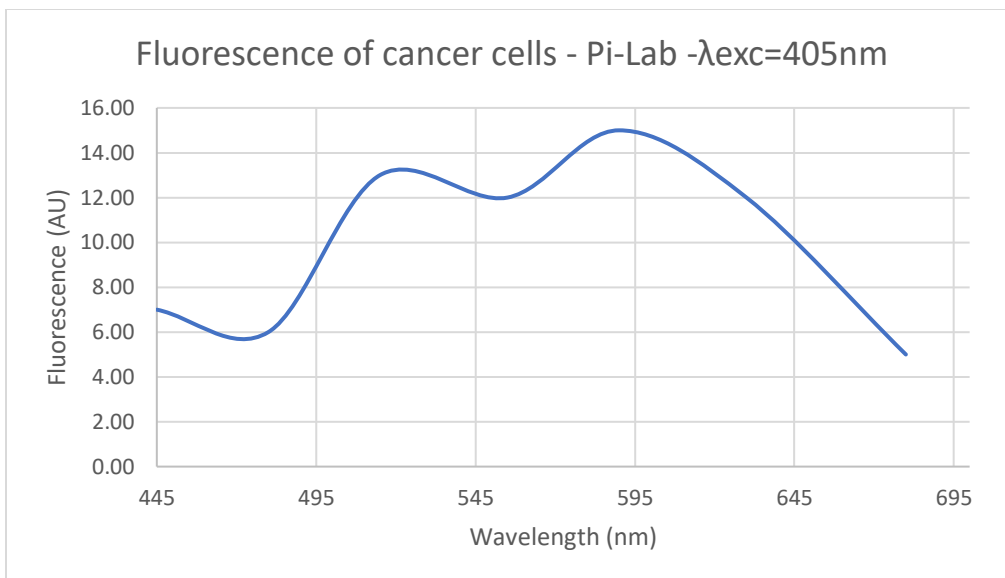


Εικόνα 33: Φθορισμός υγιών κυττάρων για διέγερση στα 405 nm

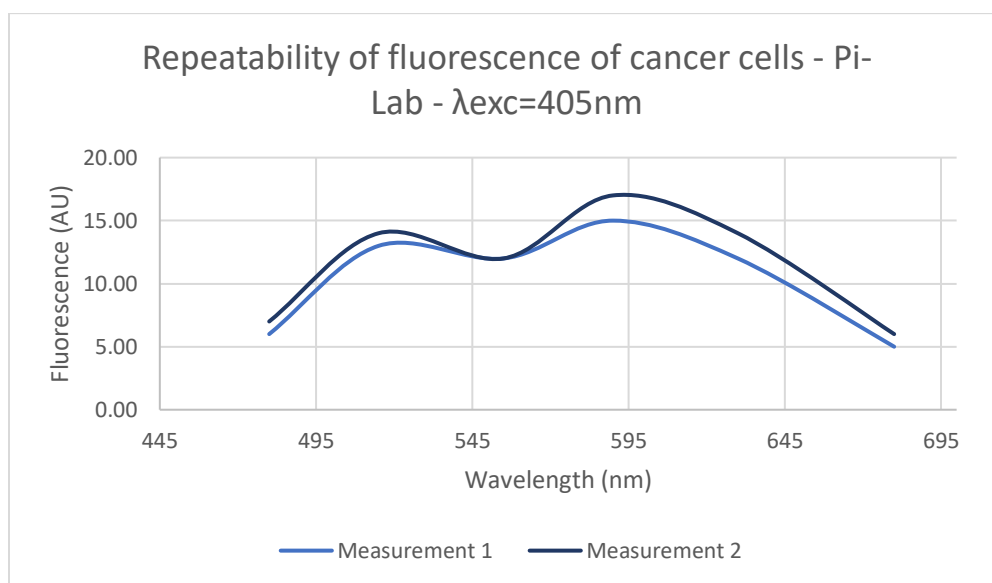


Εικόνα 34: Απόκριση του Pi-Lab σε σκοτεινές συνθήκες / Θόρυβος οργάνου

Όσο αφορά τον φθορισμό των καρκινικών κυττάρων από το διάγραμμα (Εικόνα 35) παρατηρούμε ότι εμφανίζουν δύο κορυφές φθορισμού μια κύρια κορυφή στα 590nm και μια δευτερεύουσα στα 515nm. Εδώ οι τιμές φθορισμού των καρκινικών κυττάρων είναι τάξη μεγέθους πάνω από τις τιμές φθορισμού των υγιών κυττάρων αλλά και του θορύβου του οργάνου, επομένως μπορούμε να τις λάβουμε υπόψιν και να θεωρήσουμε ότι οφείλονται στην ιδιότητα των κυττάρων αυτών να φθορίζουν για διέγερση στα 405nm. Οι μετρήσεις ελέγχθηκαν επίσης για την επαναληψιμότητα τους και όπως ενδεικτικά φαίνεται στην Εικόνα 36 μπορούν να θεωρηθούν επαναλήψιμες καθώς τα φάσματα φθορισμού παρουσιάζουν την ίδια μορφή και εμφανίζουν τις κορυφές φθορισμού στα ίδια μήκη κύματος.

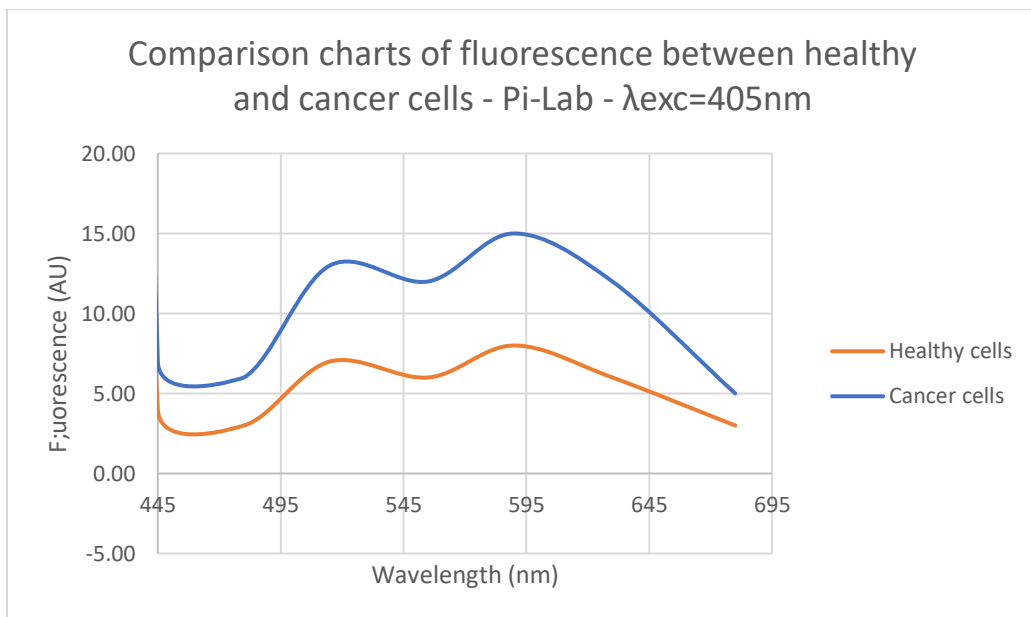


Εικόνα 35: Φθορισμός καρκινικών κυττάρων χωρίς αφαίρεση της συμβολής του θρεπτικού μέσου



Εικόνα 36: Επαναληψιμότητα μέτρησης για τον φθορισμό των καρκινικών κυττάρων

Σχετικά με την σύγκριση του φθορισμού ανάμεσα στα υγιή και τα καρκινικά κύτταρα από την Εικόνα 37 παρατηρούμε ότι τα καρκινικά εμφανίζουν φθορισμό (με μέγιστο στα 590nm) ενώ τα υγιή εμφανίζουν ασθενή φθορισμό για διέγερση στα 405nm. Άρα οι μετρήσεις φθορισμού για διέγερση στα 405 nm **αποτελούν μια ένδειξη διαφοροποίησης μεταξύ των υγιών και των καρκινικών κυττάρων που μπορούν να αξιοποιηθούν εν δυνάμει στην διάγνωση καρκινικών περιοχών.**



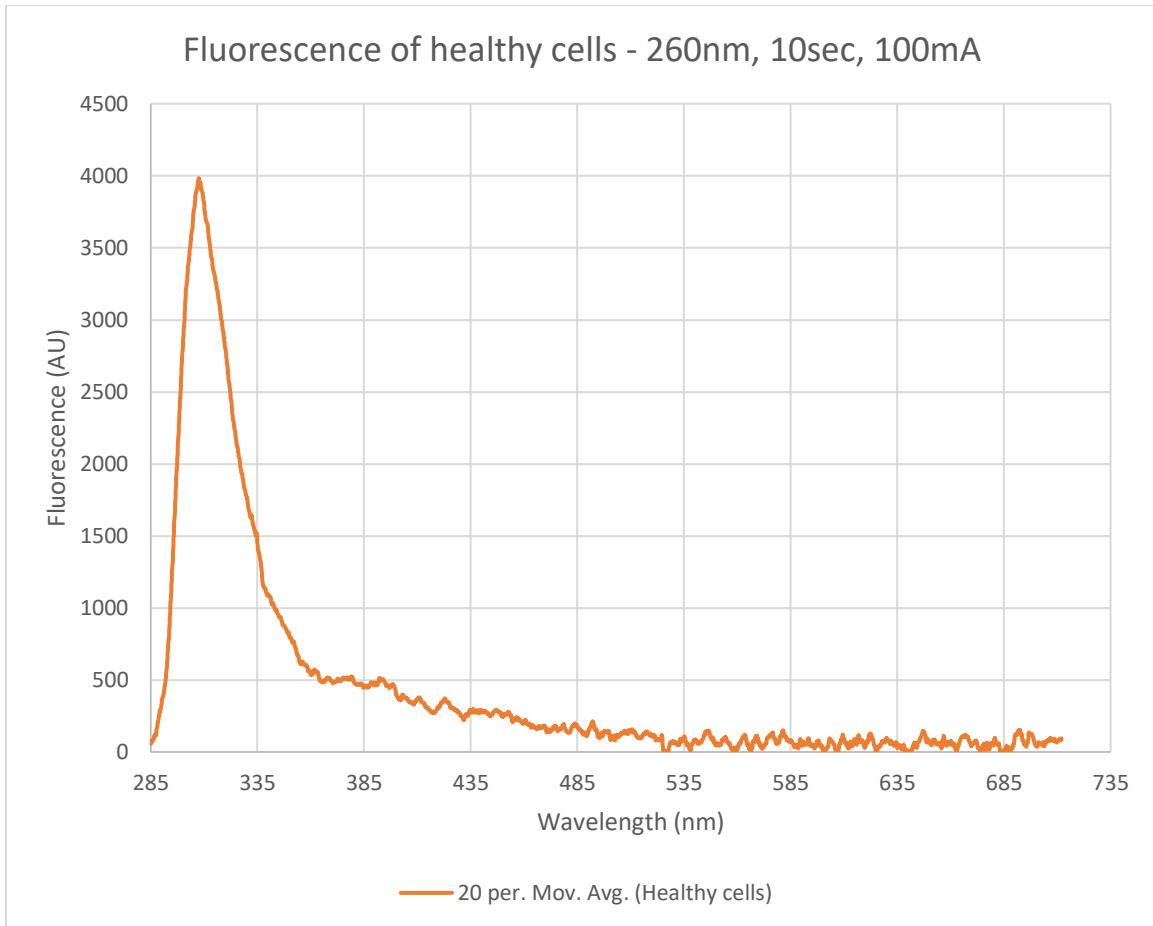
Εικόνα 37: Σύγκριση φθορισμού ανάμεσα στα υγιή και τα καρκινικά κύτταρα

3.2 Αποτελέσματα για μετρήσεις μέσω του LED Φασματοφωτόμετρου 260-270nm

Στην συνέχεια παρουσιάζονται οι μετρήσεις φθορισμού που πραγματοποιήθηκαν μέσω του ειδικά κατασκευασμένου φασματοφωτόμετρου φθορισμού που χρησιμοποιεί ως πηγές διέγερσης είτε LED με μήκος κύματος στα 260nm είτε με μήκος κύματος στα 270nm, που έχουμε αναφερθεί και στο προηγούμενο μέρος. Πραγματοποιήθηκαν και εδώ μετρήσεις τόσο για τα καρκινικά κύτταρα όσο και για τα υγιή, με πυκνότητα κυττάρων 8.600.000 κύτταρα σε 3ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Οι μετρήσεις που έλαβαν χώρα αφορούν τα κύτταρα μαζί με την συμβολή των θρεπτικών τους μέσων.

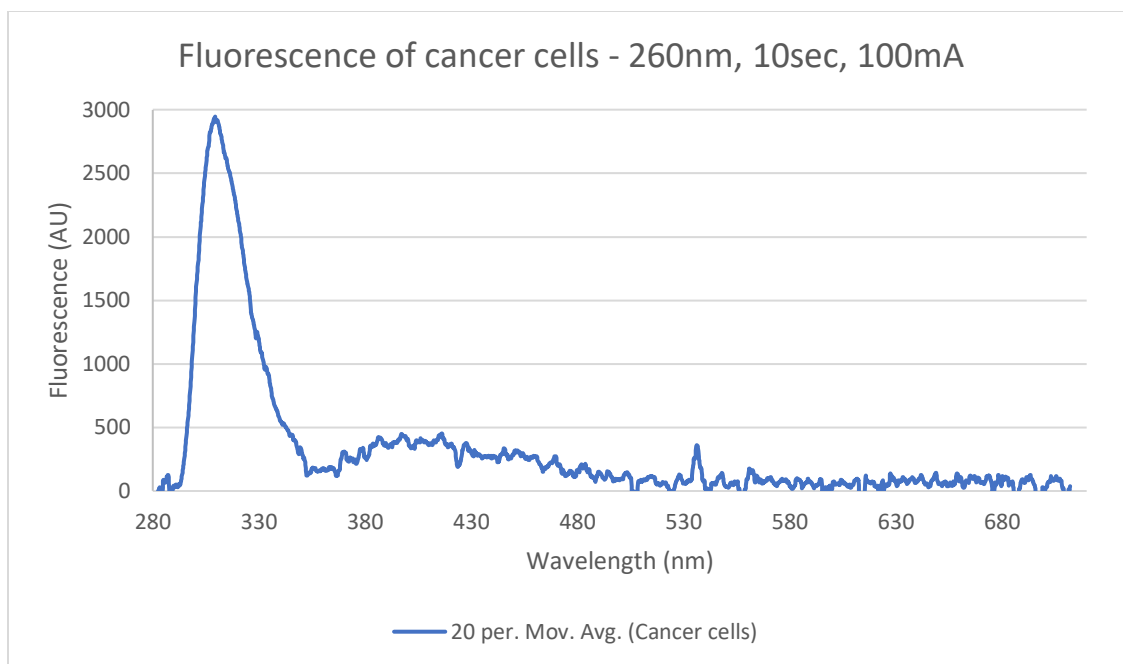
3.2.1 Φασματικές μετρήσεις φθορισμού υγιών και καρκινικών κυττάρων για διέγερση στα 260nm

Στην εικόνα 38, παρουσιάζεται το φάσμα εκπομπής φθορισμού υγιών κυττάρων για διέγερση στα 260 nm. Από το φάσμα αυτό έχει αφαιρεθεί η συνεισφορά του θρεπτικού μέσου στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα, συνεπώς η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού οφείλεται μόνο στα υγιή κύτταρα. Το φάσμα εκτείνεται από τα 285 nm έως τα 485 nm. Παρουσιάζει μία κορυφή μέγιστου φθορισμού στα 305 nm ενώ στη συνέχεια η ένταση του φθορισμού μειώνεται εκθετικά. Το φάσμα έχει συλλεγεί για χρόνο ολοκλήρωσης στο σύστημα ανίχνευσης 10 sec.



Εικόνα 38: Φθορισμός υγιών κυττάρων για διέγερση στα 260nm

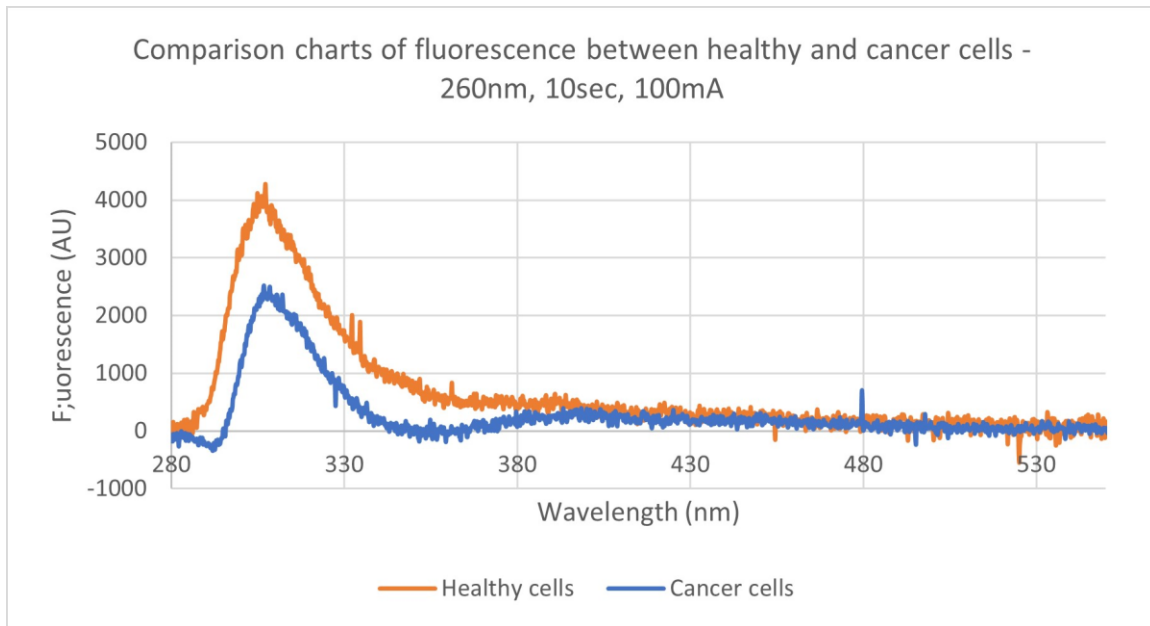
Στις ίδιες ακριβώς πειραματικές συνθήκες, συλλέχθηκε και το φάσμα φθορισμού των καρκινικών κυττάρων για διέγερση στα 260 nm (Εικόνα 39). Όμοια με πριν από το φάσμα έχει αφαιρεθεί η συνεισφορά του αντίστοιχου θρεπτικού μέσου των καρκινικών κυττάρων και η ένταση του φθορισμού οφείλεται μόνο στα καρκινικά κύτταρα. Το φάσμα εκτείνεται από τα 285 έως τα 500 nm. Παρουσιάζει δύο κορυφές φθορισμού, μία κύρια με μέγιστη ένταση φθορισμού στα 310 nm και μία δευτερεύουσα με μέγιστη ένταση φθορισμού στα 400 nm. Το φάσμα έχει συλλεγεί για χρόνο ολοκλήρωσης στο σύστημα ανίχνευσης 10 sec.



Εικόνα 39: Φθορισμός αμιγώς καρκινικών κυττάρων για διέγερση στα 260nm

Τέλος, παραθέτοντας το φάσμα των υγιών με αυτό των καρκινικών κυττάρων για διέγερση στα 260nm (Εικόνα 40) παρατηρούμε ότι υπάρχει διαφορά στην συμπεριφορά μεταξύ των υγιών και των καρκινικών κυττάρων. Αρχικά, το φάσμα φθορισμού των καρκινικών κυττάρων είναι πιο στενό σε σχέση με αυτό των υγιών. Επίσης παρατηρείται μια μετατόπιση του φάσματος φθορισμού των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με τα υγιή προς τα μεγαλύτερα μήκη κύματος κατά 5 nm ως προς την κύρια κορυφή εκπεμπόμενου φθορισμού και εμφανίζεται και μία επιπλέον κορυφή η οποία δεν ήταν παρούσα στα υγιή κύτταρα. Ο φθορισμός των καρκινικών κυττάρων σε αντίθεση με των υγιών σχεδόν μηδενίζεται στα 350 nm.

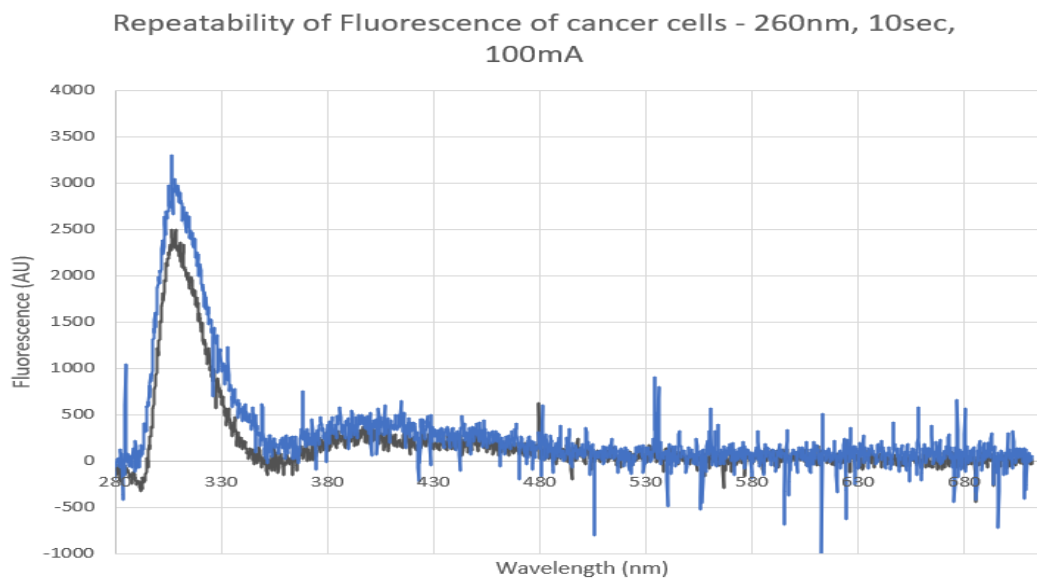
Τέλος συγκρίνοντας τα δύο φάσματα ως προς την ένταση φθορισμού, παρατηρούμε την ύπαρξη μιας σημαντικής διαφοροποίησης καθώς για διέγερση στα 260nm **ο φθορισμός των υγιών κυττάρων είναι διπλάσιος αυτών των καρκινικών** στην ίδια μάλιστα περιοχή, γύρω στα 305 με 310nm, όπου μεγιστοποιείται ο φθορισμός τόσο για τα καρκινικά όσο και για τα υγιή κύτταρα.



Εικόνα 40: Σύγκριση φθορισμού υγιών και καρκινικών κυττάρων για διέγερση στα 260nm

Αυτό είναι σημαντική παρατήρηση καθώς ενδεχομένως **αυτή η διαφορετική συμπεριφορά των υγιών από τα καρκινικά κύτταρα ως προς την ιδιότητα του φθορισμού θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση μεταξύ τους και μπορεί να αξιοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς.**

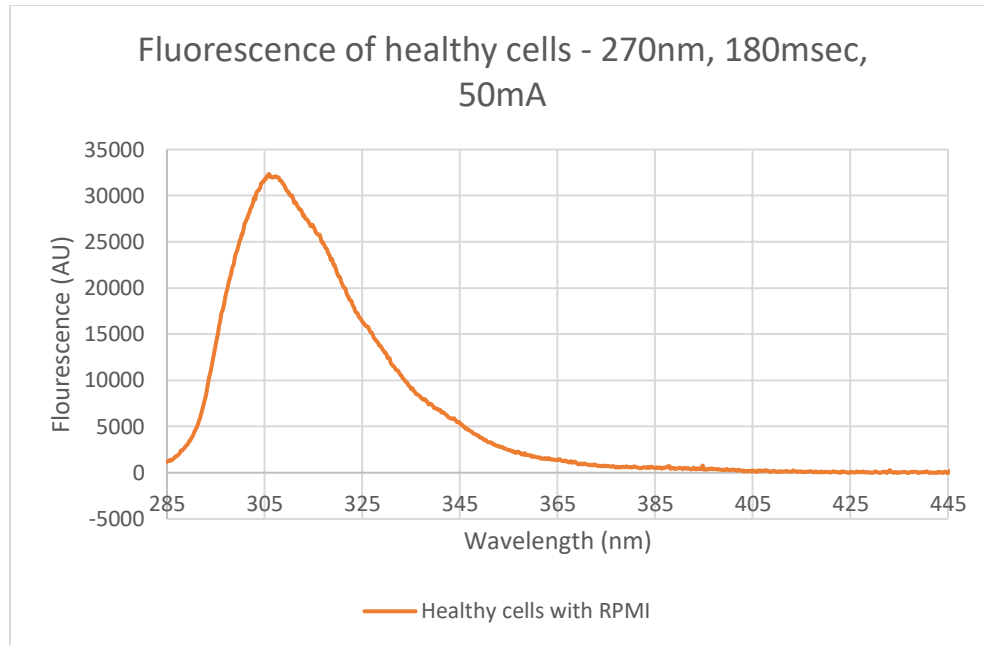
Τέλος το φασματοσκοπικό σύστημα ελέγχθηκε για την επαναληψιμότητα των μετρήσεων του ως προς τον φθορισμό. Πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές μετρήσεις σε διαφορετικούς χρόνους με πανομοιότυπα δείγματα (ίδιο θρεπτικό μέσο, ίδια συγκέντρωση κυττάρων, συνθήκες συντήρησης). Όπως φαίνεται ενδεικτικά και στο διάγραμμα της εικόνας 41 οι μετρήσεις είναι επαναλήψιμες καθώς παρατηρούμε ίδια μορφή φάσματος, μέγιστο φθορισμό για ίδιο μήκος κύματος, ενώ οι διαφορετικές τιμές φθορισμού πιθανόν οφείλονται στα δείγματα καθώς οι συγκεντρώσεις των κυττάρων σε αυτά είναι στατιστικά υπολογισμένες και πιθανόν να υπάρχουν αποκλίσεις. Συμπερασματικά, η διάταξη φασματοσκοπίας φθορισμού η οποία αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικών Αισθητηρίων της ΣΗΜΜΥ ΕΜΠ μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστη καθώς οι μετρήσεις της εμφανίζουν σημαντική επαναληψιμότητα.



Εικόνα 41: Επαναληψιμότητα μέτρησης φθορισμού αμιγώς καρκινικών κυττάρων για διέγερση στα 260nm

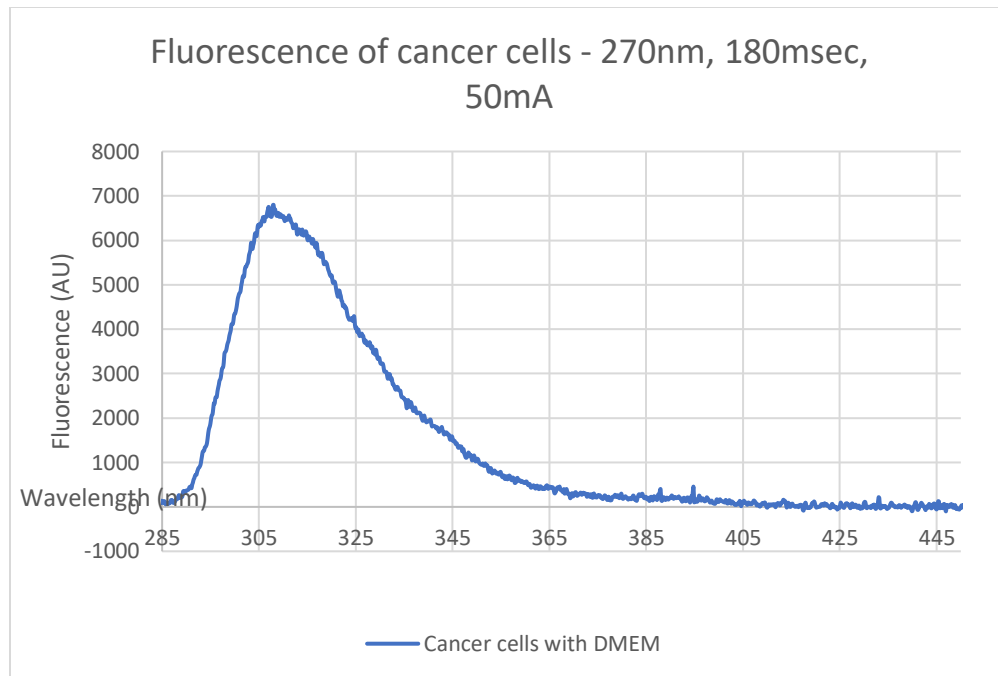
3.2.2 Φασματικές μετρήσεις φθορισμού υγιών και καρκινικών κυττάρων για διέγερση στα 270nm

Στην εικόνα 42, εμφανίζεται το φάσμα του εκπεμπόμενου φθορισμού υγιών κυττάρων για διέγερση στα 270 nm. Στο φάσμα αυτό η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού οφείλεται μόνο στα υγιή κύτταρα καθώς έχει αφαιρεθεί η συνεισφορά του θρεπτικού μέσου στο φθορισμό. Το φάσμα εκτείνεται από τα 285 έως τα 365 nm και παρουσιάζει κορυφή μέγιστου φθορισμού στα 307 nm με τιμή έντασης 32034 αυθαίρετες μονάδες (Arbitrary Units, AU), στη συνέχεια η ένταση του φθορισμού παρουσιάζει εκθετική μείωση. Το φάσμα έχει συλλεγεί για χρόνο ολοκλήρωσης στο σύστημα ανίχνευσης 180 ms.



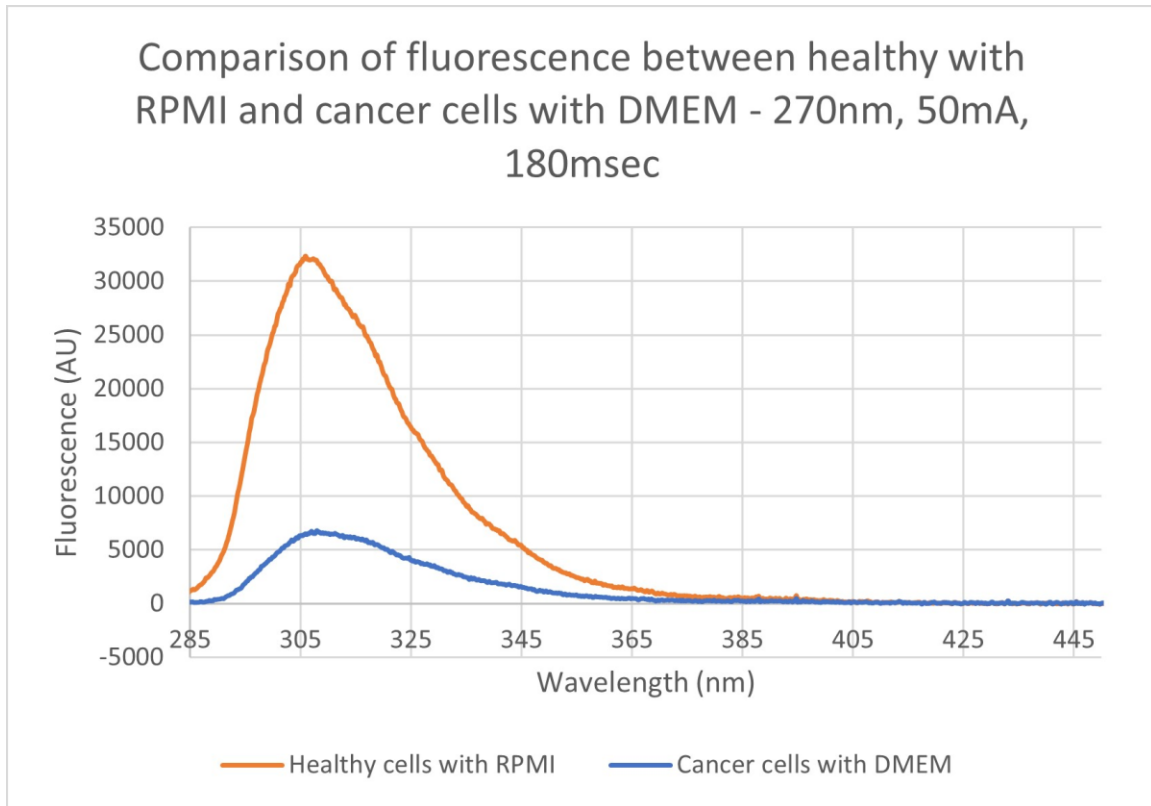
Εικόνα 42: Φθορισμός υγιών κυττάρων για διέγερση στα 270nm

Στη συνέχεια συλλέχθηκε το φάσμα φθορισμού των καρκινικών κυττάρων για διέγερση στα 270 nm (Εικόνα 43) και για τον ίδιο χρόνο ολοκλήρωσης στο σύστημα ανίχνευσης, 180 ms. Το φάσμα των καρκινικών κυττάρων είναι απαλλαγμένο από το φθορισμό του θρεπτικού μέσου των κυττάρων καθώς έχει πραγματοποιηθεί αφαίρεση του αντίστοιχου φάσματος ως αφαίρεση υποβάθρου. Όμοια με τα υγιή κύτταρα, το φάσμα εκτείνεται από τα 285 έως τα 365 nm. Στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων, το φάσμα φθορισμού παρουσιάζει κορυφή μέγιστου φθορισμού στα 310 nm με τιμή έντασης 6431 AU, ενώ στη συνέχεια μειώνεται εκθετικά.



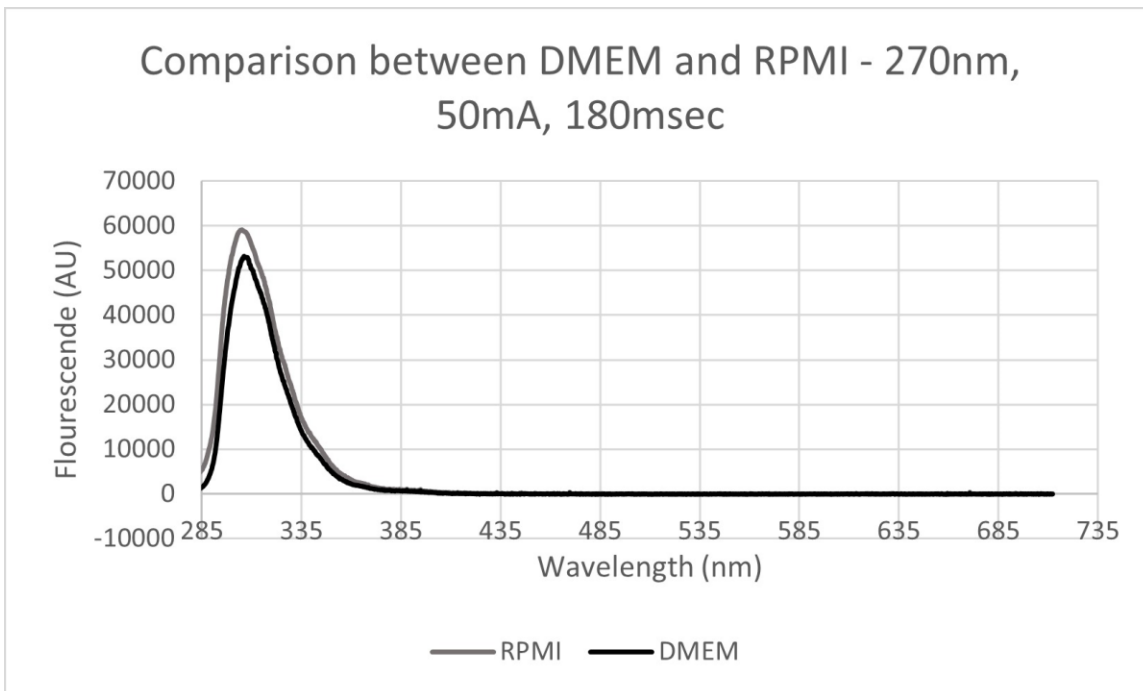
Εικόνα 43: Φθορισμός καρκινικών κυττάρων για διέγερση στα 270nm

Από την παράθεση των δυο διαγραμμάτων (Εικόνα 44) παρατηρούμε ότι τα φάσματα φθορισμού των υγιών και των καρκινικών κυττάρων δέρματος εμφανίζουν παρόμοιο σχήμα και θέση ενώ εμφανίζουν μέγιστο φθορισμό στο ίδιο περίπου μήκος κύματος. Ωστόσο, εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς την ένταση του φθορισμού. **Τα υγιή κύτταρα εμφανίζουν περίπου πενταπλάσια ένταση φθορισμού σε σχέση με τα αντίστοιχα καρκινικά.** Η παραπάνω παρατήρηση για την διαφοροποίηση της έντασης φθορισμού ανάμεσα στα υγιή και τα καρκινικά κύτταρα, **μπορεί πιθανόν να αποτελέσει έναν ισχυρό βιοδείκτη για τον χαρακτηρισμό ύποπτων περιοχών του δέρματος και τελικά την διάγνωση καρκινικών αλλοιώσεων.**



Εικόνα 44: Σύγκριση φθορισμού μεταξύ υγιών και καρκινικών κυττάρων για διέγερση στα 270nm

Τέλος αξίζει να σημειώσουμε ότι η αφαίρεση της συνεισφοράς του κυτταρικού μέσου δεν ήταν απαραίτητη καθώς όπως φαίνεται και στην εικόνα 45 τα εν λόγω θρεπτικά μέσα εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά όσο αφορά τον φθορισμό με διέγερση στα 270nm, επομένως η συμβολή τους δεν επηρεάζει την σύγκριση ανάμεσα στα υγιή και τα καρκινικά κύτταρα.



Εικόνα 45: Υπέρθεση φθορισμού των θρεπτικών μέσων DMEM&RPMI για διέγερση στα 270nm

Προεκτάσεις / Μελλοντική έρευνα

Η παρούσα εργασία είναι μόνο ένα μέρος ενός μεγάλου πεδίου έρευνας, και υπάρχουν πολλές και διαφορετικές μελλοντικές επεκτάσεις για αυτή.

Με βάση τις παραπάνω μετρήσεις μπορούμε να συμπεράνουμε ότι παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στον φθορισμό μεταξύ των υγιών και των καρκινικών επιδερμικών κυττάρων για τις διεγέρσεις στα 260nm και στα 270nm. Ενώ και η απορρόφηση στο φάσμα του ορατού εμφανίζει διαφοροποιήσεις για τους υπό εξετάσει τύπους κυττάρων.

Επομένως, μια πιθανή προέκταση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήταν η επικέντρωση στα παραπάνω μήκη κύματος διέγερσης και η επέκτασή τους και σε άλλους τύπους κυττάρων, όπως για παράδειγμα στοματικά υγιή και καρκινικά κύτταρα. Ή η προσπάθεια να εντοπιστεί μήκος κύματος διέγερσης, παραπλήσιο των παραπάνω που εξετάστηκαν, που η διαφοροποίηση ανάμεσα στα υγιή και τα καρκινικά επιδερμικά κύτταρα είναι πιο έντονη.

Ακόμη, με δεδομένα τα συμπεράσματα από αυτή την εργασία, θα μπορούσε να αναπτυχθεί μια φορητή οικονομική διαγνωστική διάταξη που θα αποτελούνταν από μια συστοιχία LED κατάλληλων μηκών κύματος με σκοπό τον εντοπισμό καρκινικών κυττάρων σε μια δεδομένη περιοχή του σώματος που ακτινοβολείται από την συσκευή. Τέλος, με κατάλληλες αλλαγές και διαφοροποιήσεις θα μπορούσε η διάταξη αυτή να προσαρμοστεί και να αναπτυχθεί βασιζόμενη σε ένα κινητό τηλέφωνο αντικαθιστώντας τις ιδιαίτερα ακριβές και ογκώδεις διατάξεις φασματοσκοπίας απορρόφησης ή φθορισμού.

Βιβλιογραφία

[1]. Albani, J. R. (2004). *Structure and dynamics of macromolecules: absorption and fluorescence studies* (1st ed). Amsterdam ; Boston: Elsevier.

[2]. Granite. (χ.χ.). Beer Lambert Law | Transmittance & Absorbance. Ανακτήθηκε από <https://www.edinst.com/blog/the-beer-lambert-law/>

[3]. Schematic of the measurement of absorption spectra in a spectrophotometer. (χ.χ.). Ανακτήθηκε από <https://www.edinst.com/wp-content/uploads/2019/07/spectrophotometer-diagram-1024x251.png>

[4]. Molecular Expressions Microscopy Primer: Fluorescence - Jablonski Energy Diagram - Interactive Java Tutorial. (χ.χ.). Ανακτήθηκε από <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/jabintro/index.html>

[5]. Granite. (χ.χ.). Jablonski Diagram | What is it? Ανακτήθηκε από <https://www.edinst.com/de/blog/jablonski-diagram/>

[6]. Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3061-6>

[7]. JablonskiDiagramFull-1024x604.png (1024×604). (χ.χ.). Ανακτήθηκε από <https://www.edinst.com/wp-content/uploads/2019/02/JablonskiDiagramFull-1024x604.png>

[9]. Molecular Expressions Microscopy Primer: Specialized Microscopy Techniques - Fluorescence - Basic Concepts in Fluorescence. (χ.χ.). Ανακτήθηκε από <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>

[10]. Granite. (χ.χ.). Stokes Shift, Fluorescence Spectroscopy. Ανακτήθηκε από <https://www.edinst.com/blog/what-is-the-stokes-shift/>

[11]. File:Stokes shift- Rh6G.png - Wikipedia. (2013, Νοέμβριος 8). Ανακτήθηκε από https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Stokes_shift- Rh6G.png

[12]. stokes-shift-4-768x922.png (768×922). (χ.χ.). Ανακτήθηκε από <https://www.edinst.com/wp-content/uploads/2019/08/stokes-shift-4-768x922.png>

[13]. stokes-shift-6-768x699.png (768×699). (χ.χ.). Ανακτήθηκε από <https://www.edinst.com/wp-content/uploads/2019/08/stokes-shift-6-768x699.png>

- [14]. fluorescenceintrofigure3.jpg (390×288). (χ.χ.). Ανακτήθηκε από <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/images/fluorescenceintrofigure3.jpg>
- [16]. Fluorescence Polarization Anisotropy | Explained | Simple Easy. (2018). Ανακτήθηκε από <https://www.youtube.com/watch?v=5a6Zl6XBhrl>
- [17]. Hof, M., Hutterer, R., & Fidler, V. (Επιμ.). (2005). Fluorescence spectroscopy in biology: advanced methods and their applications to membranes, proteins, DNA, and cells. Παρουσιάστηκε στο Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Probes, Imaging, and Spectroscopy, Berlin Heidelberg New York: Springer.
- [18]. Monici, M. (2005). Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. Στο Biotechnology Annual Review (τ. 11, σσ. 227–256). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11007-2](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11007-2)
- [19]. Nadezhdina, E. A., Vul'fson, I. N., Ivanitskaia, I. N., Kurbatov, V. S., & Kupriianova, O. O. (1976). [Use of beta-blockader visken in children with primary arterial hypertension]. *Kardiologiia*, 16(5), 71–75.
- [20]. Salomatina, E., Jiang, B., Novak, J., & Yaroslavsky, A. N. (2006). Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range. *Journal of Biomedical Optics*, 11(6), 064026. <https://doi.org/10.1117/1.2398928>
- [21]. Rey-Barroso, L., Peña-Gutiérrez, S., Yáñez, C., Burgos-Fernández, F. J., Vilaseca, M., & Royo, S. (2021). Optical Technologies for the Improvement of Skin Cancer Diagnosis: A Review. *Sensors*, 21(1), 252. <https://doi.org/10.3390/s21010252>
- [22]. Le, D. L., Nguyen, D. T., Le, T. H., Phan, Q.-H., & Pham, T.-T.-H. (2021). Characterization of healthy and cancerous human skin tissue utilizing Stokes–Mueller polarimetry technique. *Optics Communications*, 480, 126460. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2020.126460>
- [23]. Bratchenko, I. A., Artemyev, D. N., Myakinin, O. O., Khristoforova, Y. A., Moryatov, A. A., Kozlov, S. V., & Zakharov, V. P. (2017). Combined Raman and autofluorescence ex vivo diagnostics of skin cancer in near-infrared and visible regions. *Journal of Biomedical Optics*, 22(2), 027005. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.2.027005>
- [24]. Φασματοφωτόμετρο. (2023). Στο Βικιπαίδεια. Ανακτήθηκε από <https://el.wikipedia.org/w/index.php?title=%CE%A6%CE%B1%CF%83%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%86%CF%89%CF%84%CF%8C%CE%BC%CE%B5%CF%84%CF%81%CE%BF&oldid=9956003>
- [25]. excitationemissionfigure1.jpg (471×160). (χ.χ.). Ανακτήθηκε από <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/images/excitationemissionfigure1.jpg>
- [26]. Granite. (χ.χ.). What are Absorption, Excitation and Emission Spectra? Ανακτήθηκε 7 Μάιος 2024, από <https://www.edinst.com/blog/what-are-absorption-excitation-and-emission-spectra/>

- [27]. spectrophotometer-diagram-1024x251.png (1024×251). (χ.χ.). Ανακτήθηκε από <https://www.edinst.com/wp-content/uploads/2019/07/spectrophotometer-diagram-1024x251.png>
- [28]. (χ.χ.). Ανακτήθηκε από https://ams.com/documents/20143/36005/AS7341_DS000504_3-00.pdf/
- [29]. (χ.χ.). Ανακτήθηκε από https://gr.mouser.com/datasheet/2/723/ISeries_2835_3V_Consolidated-2940268.pdf
- [30]. Photodiode. (2024). Στο Wikipedia. Ανακτήθηκε από <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Photodiode&oldid=1221695335>
- [31]. Utmel. (χ.χ.). How does a Photodiode Work? Ανακτήθηκε από <https://www.utmel.com/blog/categories/diodes/how-does-a-photodiode-work>
- [32] Ανακτήθηκε από https://www.professorpetry.com.br/Ensino/Repositorio/Docencia_UFSC/Materiais_EEL_7051/Notas_Aula_Experiencia05.pdf
- [33]. Photodiode-Working-Principle-300x195.jpg (300×195). (χ.χ.). Ανακτήθηκε από <https://www.elprocus.com/wp-content/uploads/Photodiode-Working-Principle-300x195.jpg>
- [34]. Ανακτήθηκε από https://www.physics.ntua.gr/pdf_doc_files/seminario_fysikhs_2011/koutsoumphis.pdf
- [35]. Charged Couple Device. (2019). Ανακτήθηκε από <https://www.youtube.com/watch?v=GcwiovyTZ4g>

- [36]. technical article The difference between PMT and CCD_新闻中心_Beijing Huake Yitong Analytical Instrument Co., Ltd. (χ.χ.). Ανακτήθηκε από <http://www.bjhkyt.com/newsen28.html>
- [40]. What is a monochromator in a UV-Vis spectrophotometer? (χ.χ.). Ανακτήθηκε από <https://knowledge.cphnano.com/en/pages/what-is-a-spectral-bandwidth>
- [41]. Inc, M. P. (2019, Αύγουστος 22). Photomultiplier Tubes | Application. Ανακτήθηκε από https://www.matsusada.com/application/ps/photomultiplier_tubes/