



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Ανίχνευση και Προσδιορισμός Βιοδεικτών
και Συμπλόκων Ενώσεων τους στο Δακρυϊκό Υγρό,
μέσω Ηλεκτρονικής Φασματοσκοπίας, Φασματοσκοπίας Φθορισμού και
Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας

Κοραλία Σαρακηνού,
Διπλωματούχος Μηχανικός Υλικών

Διπλωματική Εργασία Μεταπτυχιακού Διπλώματος

Επιβλέπων:
καθηγητής Δρ. Σωτήριος Κ. Χατζηκακού



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2021



UNIVERSITY OF IOANNINA
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
M.Sc BIOLOGICAL INORGANIC CHEMISTRY

Diploma Thesis:

« Detection and Determination of Biomarkers and their complexes in Tear Fluid, by Electron Spectroscopy, Fluorescence Spectroscopy and Thin Layer Chromatography »

KORALIA SARAΚΙΝΟΥ

Materials Engineer



Ioannina, 2021

Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ

ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

της κ. Κοραλίας Σαρακηνού

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: κ. Σωτήριος Κ. Χατζηκακού

Θέμα: « Ανίχνευση και προσδιορισμός βιοδεικτών και συμπλόκων ενώσεών τους στο δακρυϊκό υγρό, μέσω ηλεκτρονικής φασματοσκοπίας, φασματοσκοπίας φθορισμού και χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας »

Ορισμός Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από την Ε.Δ.Ε. :.....^A/.....-.....-.....:

1. Σωτήριος Κ. Χατζηκακού, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.....(Επιβλέπων)
2. Βασιλική Μπούμπα, Αναπλ. Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.....(Μέλος)
3. Αναστάσιος Τασιόπουλος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου.....(Μέλος)

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής: .../.../...

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.
Καθηγητής

Ο/Η Γραμματέας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή αποτελεί τη διπλωματική εργασία στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης "Ανόργανη Βιολογική Χημεία" του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η εκπόνηση της πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Εφαρμοσμένης Βιολογικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του Καθηγητή, κ. Σωτήριου Κ. Χατζηκακού.

Η κάτωθι επιστημονική μελέτη πραγματοποιήθηκε ύστερα από το πέρας δεκαοκτώ μηνών πολύωρης δουλειάς και αρκετού φόρτου εργασίας, επομένως, αποτελεί υψίστης σημασίας για εμένα η συμβολή των ανθρώπων, που συνέβαλαν στην υλοποίηση της. Για το λόγο, αυτό, πριν την παρουσίαση του αντικειμένου μελέτης, των πειραμάτων και των αποτελεσμάτων, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα, αλλά και που με την παρουσία τους διαδραμάτισαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Θα ήθελα αρχικά να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα μου καθηγητή, κ. Σωτήριο Κ. Χατζηκακού, για την πολύτιμη καθοδήγηση του, καθώς και την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που έδειξε προς το πρόσωπό μου. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω, ακόμη, για τη συνεχή υποστήριξή του, την άριστη συνεργασία και το όμορφο κλίμα που φρόντισε να εξασφαλίσει καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Β. Μπούμπα, αναπλ. Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, του τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κ. Α. Τασιόπουλο, Καθηγητή τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κύπρου που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Α. Χατζηδημητρίου, αναπλ. Καθηγητή τμήματος Χημείας, ΑΠΘ, για την επίλυση των δομών, καθώς και τους κ. Τ. Βαϊμάκη, αναπλ. Καθηγητή του τμήματος Χημείας, για τις θερμικές αναλύσεις TG-DTA DSC και κ. Β. Τσιατούρα, μέλος ΕΔΙΠ του τομέα Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη φιλοξενία του στο εργαστήριο προς τη διεξαγωγή των μαγνητικών μετρήσεων.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη μεταδιδάκτορα του εργαστηρίου μας, Δρ. Χριστίνα Μπαντή, η οποία συνέβαλε ουσιαστικά στη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας και που χωρίς τη βοήθεια και τη συνεισφορά της δε θα μπορούσε να θεωρηθεί ολοκληρωμένη η παρούσα διατριβή.

Ένα ευχαριστώ και σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς, και ιδιαίτερα στην "εργαστηριακή γειτόνισσα" Γεωργία, για το ευχάριστο κλίμα και την εύρυθμη συνεργασία όλους αυτούς τους μήνες που διανύσαμε μαζί καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στις παιδικές μου φίλες, Ολυμπία και Ιουλίτα, καθώς και στις/στους φίλες/ους και συμφοιτη(ρι)ες μου από τη σχολή μου, τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Άγγελο, Κωνσταντίνα, Μυρτώ και Σοφία, οι οποίες/οι μοιράστηκαν μαζί μου, τόσο τον ενθουσιασμό και τη χαρά μου για την ένταξή μου στο ΔΠΜΣ και στην ομάδα του εργαστηρίου, όσο και το άγχος και τις απογοητεύσεις μου καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ένα ακόμη ευχαριστώ στο φίλο μου Γ. Ράικο, για όλη την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη, αλλά και για τη διαχείριση των όποιων κρίσεων και άγχους μου εμφανίστηκαν καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης του μεταπτυχιακού. Η συνεισφορά του βελτίωσε αισθητά τη διαχείριση όλων των παραπάνω, και εμένα την ίδια.

Ευχαριστώ πάνω απ' όλους και όλα τους γονείς μου, οι οποίοι με αγάπη και υπομονή μου προσέφεραν καθημερινά υποστήριξη και εμπύχωση όλα, αυτά, τα χρόνια των σπουδών μου.

Μάρτιος, 2021

Σαρακηνού Κοραλία

Από την παρούσα Διατριβή προέκυψε:

- μία δημοσίευση, τον Δεκέμβρη του 2020, στο επιστημονικό περιοδικό *Inorganica Chimica Acta*: **K. M. Sarakinou, C. N. Banti, A. G. Hatzidimitriou, S. K. Hadjidakou,**
“Utilization of metal complexes formed by copper (II) acetate or nitrate, for the urea assay”, *Inorganica Chimica Acta*, Vol. 517, 2020.
- μία συμμετοχή παρουσίασης Poster στο 18^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Φαρμακευτικής Χημείας με τίτλο: **TEARS UREA AS A POTENTIAL DIAGNOSTIC BIOMARKER BY MEASURING COPPER UREA COMPLEXES**, Koralia Sarakinou, Christina N. Banti, Ewelina Czyz, Ilias Milionis, Sotiris K. Hadjidakou
- μία συμμετοχή στο παγκόσμιο συνέδριο Association of Revolutionary Eye and Vision Research, ARVO 2021, με τίτλο: **Utilization of metal complexes in the tears biomarkers assay**, Milionis Ilias, Banti N. Christina, Sarakinou Koralia, Hadjidakou K. Sotiris

Περίληψη

Μία από τις πιο συχνές οφθαλμικές παθήσεις αποτελεί η ξηροφθαλμία. Η ξηροφθαλμία είναι μια πολυπαραγοντική φλεγμονώδης ασθένεια των δακρύων και της οφθαλμικής επιφάνειας που έχει ως αποτέλεσμα συμπτώματα δυσφορίας, διαταραχής της όρασης και αστάθεια του φιλμ δακρύων με πιθανή βλάβη του οφθαλμού. Εκτός από μια οφθαλμική κατάσταση με σοβαρές συνέπειες, μπορεί να προκαλέσει προβλήματα, όπως οφθαλμική δυσφορία στην απλούστερη μορφή της, προβλήματα όρασης, αλλά και έλκος του κερατοειδούς σε σοβαρές περιπτώσεις. Δεδομένα από επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η ξηροφθαλμία είναι μια κοινή ασθένεια, η οποία προσβάλλει έως και το 20% των ενηλίκων ηλικίας 45 ετών και άνω, ενώ δεν είναι μικρότερο το ποσοστό των νεότερων που φαίνεται να πάσχουν από ξηροφθαλμία.

Κατά συνέπεια, η έρευνα άρχισε να επικεντρώνεται γύρω από το δακρυϊκό υγρό. Η ανίχνευση βιοδεικτών σε δείγματα δακρυϊκού υγρού μπορεί να προβλέψει οφθαλμικές διαταραχές, όπως το σύνδρομο της ξηροφθαλμίας. Ο προσδιορισμός των συνθετικών αλλαγών στα προφίλ δακρύων μπορεί να προβλέψει τη διάγνωση της νόσου και να εντοπίσει την εξέλιξη της. Ένα διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση της ξηροφθαλμίας μπορεί να είναι τα επίπεδα συγκέντρωσης της ουρίας στο δακρυϊκό υγρό.

Ο στόχος της παρούσας διατριβής είναι η ανίχνευση και ο προσδιορισμός της ουρίας στο δακρυϊκό υγρό. Δύο σύμπλοκα Cu (II) με ουρία με τύπους $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**), (U = ουρία) συντέθηκαν στο εργαστήριο και χαρακτηρίστηκαν μέσω σημείου τήξης, στοιχειακής ανάλυσης, μαγνητικών μετρήσεων, θερμικής ανάλυσης θερμοβαρυμετρίας (TG/DTA) και διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC), και τέλος μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών (FTIR, UV-Vis και φθορισμό). Οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων ενώσεων προσδιορίστηκαν με

ανάλυση περίθλασης ακτίνων-X μονοκρυστάλλου. Η σύμπλοκη ένωση **1** βρέθηκε να αποτελεί ένα νέο πολύμορφο, ενώ η κρυσταλλική δομή της σύμπλοκης ένωσης **2**, βρέθηκε να είναι ίδια με την ήδη γνωστή ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$) με το κωδικό όνομα ZIYVOS, σύμφωνα με την κρυσταλλογραφική βάση δεδομένων του Cambridge (CCDC). Ωστόσο, η επίλυση του συμπλόκου **2** ολοκληρώθηκε και ακολούθησε η μεταξύ τους σύγκριση.

Τα σύμπλοκα χρησιμοποιήθηκαν για τον έμμεσο προσδιορισμό της ουρίας με φασματοσκοπία φθορισμού και χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC).

Λέξεις κλειδιά: ανόργανη βιολογική χημεία, σύμπλοκα χαλκού, ουρία, 3D-πυκνομετρία TLC

Abstract

One of the most common eye diseases is Dry Eye Syndrome (DES). DES is a multifactorial inflammatory disease of the tears and the ocular surface that results in symptoms of discomfort, blurred vision, and instability of the tear film with possible eye damage. In addition to an eye condition with serious consequences, it can cause problems, such as discomfort in its simplest form, vision problems, but also corneal ulcers in severe cases. Data from epidemiological studies show that DES is a common disease, affecting up to 20% of adults aged 45 and over, and no less than the proportion of young people who appear to suffer from DES as well.

As a result, research has begun to focus on tear fluid. The detection of biomarkers in tear fluid samples can predict ocular disorders, such as Dry Eye Syndrome. Identifying synthetic changes in tear profiles can predict the diagnosis of the disease and track its progression. A diagnostic tool for detecting DES could be the levels of urea concentration in the tear fluid.

The aim of the present work is to detect and determine urea in the tear fluid. Two complexes of Cu (II) with urea with the formulae $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**), (U = urea) were synthesized and characterized by melting point (m.p.), elemental analysis (ea), magnetic measurements sensitivity, thermal gravimetric analysis (TG/DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) and spectroscopic techniques (FTIR, UV-Vis and fluorescence). The crystal structures of the complexes were determined by single crystal X-ray diffraction analysis. Complex **1** was found to be a new polymorph, while the crystal structure of complex **2** was found to be identical to the already reported one ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$) under the CCDC code name ZIYVOS, according to the Cambridge Crystallographic Database (CCDC). However, the refinement of complex **2** was completed for comparison between them.

Complexes **1-2** were used for the indirect determination of urea by fluorescence spectroscopy and thin layer chromatography (TLC).

Key words: *biological inorganic chemistry, copper complexes, urea, 3D-densitometry*

Περιεχόμενα

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή:	- 15 -
1.1 Οφθαλμός.....	- 15 -
1.2 Δακρυϊκό Υγρό	- 17 -
1.2.1 Ρόλος του Δακρυϊκού Υγρού.....	- 19 -
1.2.2 Σύσταση Δακρυϊκού Υγρού	- 20 -
1.2.3 Τύποι Δακρυϊκού Υγρού	- 22 -
1.3 Βιοδείκτες.....	- 27 -
1.4 Το Δακρυϊκό Υγρό για Μελέτη Βιοδεικτών	- 30 -
1.5 Ασθένειες προς διάγνωση μέσω ανάλυσης του Δακρυϊκού Υγρού	- 32 -
1.5.1 Ασθένειες Οφθαλμικής Επιφάνειας	- 33 -
1.5.2 Ξηροφθαλμία	- 37 -
1.5.2.1 Υποκατηγορίες Ξηροφθαλμίας.....	- 38 -
1.6 Βιοδείκτες Ξηροφθαλμίας.....	- 44 -
1.6.1 Ουρία	- 49 -
1.7 Χαλκός	- 51 -
1.7.1 Χημεία του Χαλκού.....	- 51 -
1.7.1.1 Άλας Οξικού Χαλκού	- 53 -
1.7.1.2 Άλας Νιτρικού Χαλκού	- 54 -
1.7.2 Σύμπλοκες Ενώσεις του Χαλκού	- 55 -
2. Σκοπός Μεταπτυχιακής Διατριβής:	- 59 -
2.1 Σκοπός Μελέτης.....	- 59 -
2.2 Διαδικασία και Προσέγγιση της Μελέτης.....	- 61 -
3. Πειραματικό Μέρος.....	- 63 -
3.1 Συνθετικές Πορείες	- 63 -
3.1.1 Σύνθεση της Σύμπλοκης Ένωσης 1	- 64 -
3.1.2 Σύνθεση της Σύμπλοκης Ένωσης 2.....	- 65 -
3.2 Περίθλαση Ακτίνων- Χ Μονοκρυστάλλου.....	- 66 -
3.3 Σημείο Τήξεως	- 67 -

3.4 Διαλυτότητα	- 67 -
3.5 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)	- 68 -
3.6 Φασματοσκοπία Υπεριώδους - Ορατού (UV-Vis).....	- 68 -
3.7 Θερμική Ανάλυση.....	- 69 -
3.8 Φασματοσκοπία Φθορισμού	- 69 -
3.9 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)	- 69 -
4. Χαρακτηρισμός Ενώσεων.....	- 72 -
4.1 Περίθλαση Ακτίνων-Χ Μονοκρυστάλλου	- 72 -
4.2 Σημείο Τήξεως	- 82 -
4.3 Διαλυτότητα	- 82 -
4.4 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)	- 84 -
4.5 Φασματοσκοπία Υπεριώδους - Ορατού (UV-Vis).....	- 89 -
4.5.1 Χαρακτηρισμός Συμπλόκων.....	- 89 -
4.5.2 Μελέτη Σταθερότητας.....	- 91 -
4.5.2 d-d Ηλεκτρονιακές Διεγέρσεις στο Ορατό.....	- 93 -
4.6 Θερμική Ανάλυση.....	- 95 -
4.6.1 Θερμοβαρνομετρική Ανάλυση (TG)	- 95 -
4.6.2 Διαφορική Θερμική Ανάλυση (DTA)	- 95 -
4.6.3 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)	- 96 -
4.7 Μαγνητικές Μετρήσεις.....	- 99 -
4.8 Φασματοσκοπία Φθορισμού	- 100 -
5. Πειραματικά Αποτελέσματα.....	- 103 -
5.1 Φασματοσκοπία Υπεριώδους - Ορατού (UV-Vis).....	- 105 -
5.2 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)	- 108 -
5.2.1 Τιμές R_f	- 108 -
5.2.2 Αλληλεπίδραση συμπλόκων με διαλύματα δακρυϊκού υγρού	- 110 -
5.2.3 Στατιστική Πειραμάτων	- 115 -
5.3 Φασματοσκοπία Φθορισμού	- 116 -
6. Συζήτηση – Συμπεράσματα	- 121 -
7. Παράρτημα (Α): Διαγράμματα ORTEP	- 124 -
7.1 Σύμπλοκη Ένωση 1	- 124 -

7.2 Σύμπλοκη Ένωση 2.....	- 125 -
8. Παράρτημα (B): Αντιδραστήρια-Διαλύτες-Συσκευές-Όργανα	- 127 -
8.1 Αντιδραστήρια και Διαλύτες.....	- 127 -
8.2 Πίνακας συντομογραφιών Αντιδραστηρίων και Διαλυτών	- 127 -
8.3 Συσκευές και Όργανα.....	- 129 -
Παραπομπές: Βιβλιογραφία.....	- 131 -
Παραπομπές εικόνων και πινάκων: Βιβλιογραφία	- 144 -

Κεφάλαιο 1^ο

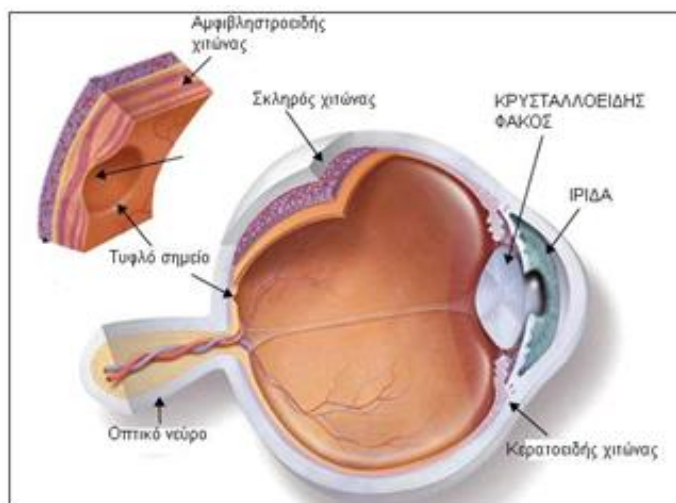
Εισαγωγή

1. Εισαγωγή:

1.1 Οφθαλμός

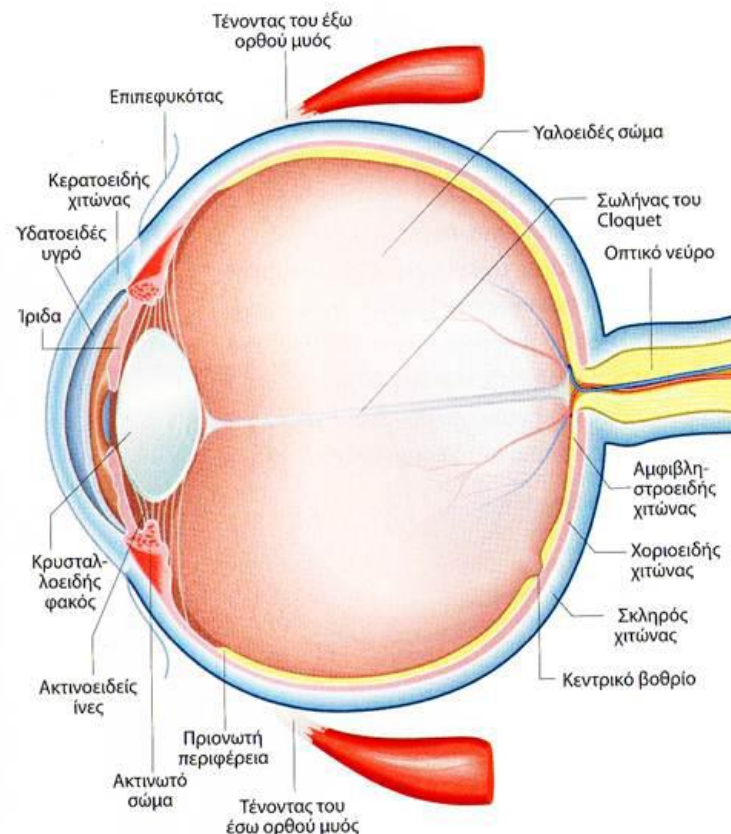
Ο οφθαλμός, επίσης γνωστός ως μάτι, ονομάζεται το αισθητήριο όργανο της όρασης των ζωντανών οργανισμών. Μέσω αυτού λαμβάνονται τα οπτικά ερεθίσματα που στέλνονται στον εγκέφαλο, ώστε να λαμβάνουν την τελική τους μορφή. Με τον τρόπο αυτό, γίνεται αντιληπτό το περιβάλλον, υπό την προϋπόθεση πως το τελευταίο εκπέμπει, σκεδάζει, απορροφά, διαθλά κλπ. κατάλληλη ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, δηλαδή φως, που μπορεί να συλλάβει το μάτι.

Ο οφθαλμός, πρόκειται για ένα στρογγυλό βολβό, το τοίχωμα του οποίου αποτελείται από τρεις χιτώνες (**Εικόνα 1**). Ο πρώτος και εξωτερικός χιτώνας του οφθαλμού είναι ο σκληρός χιτώνας (το λευκό τμήμα του ματιού), ο δεύτερος είναι ο χοριοειδής χιτώνας και ο τρίτος, ο εσωτερικός, είναι ο αμφιβληστροειδής χιτώνας. Το εμπρόσθιο τμήμα του σκληρού χιτώνα είναι διαφανές και ονομάζεται κερατοειδής χιτώνας. Το χρωματιστό μέρος του οφθαλμού αποτελεί η ίριδα. Στη μέση της ίριδας υπάρχει μια μικρή οπή, γνωστή ως κόρη του ματιού [1].



Εικόνα 1. Οι τρεις χιτώνες του οφθαλμού [a]

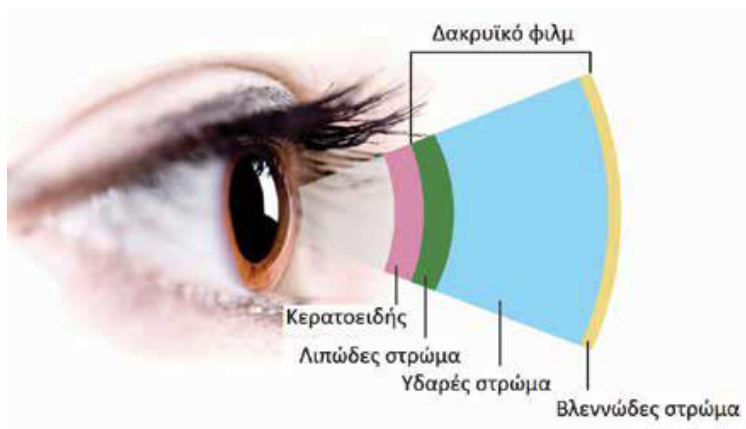
Η όραση ξεκινά με τον κερατοειδή χιτώνα, ο οποίος πραγματοποιεί τα τρία τέταρτα, περίπου, της εστίασης. Οι ακτίνες του φωτός εισέρχονται σε αυτόν και κατευθύνονται προς το εσωτερικό του, ώστε να αρχίσει η δημιουργία του ειδώλου. Ο κερατοειδής χιτώνας με τη σειρά του καλύπτεται από μία συνεχώς ανανεωμένη στοιβάδα δακρυϊκών υγρών, το δακρυϊκό φιλμ, και εκτίθεται άμεσα στις επιδράσεις του εξωτερικού περιβάλλοντος καθώς και των διαφόρων μικροοργανισμών. Τέλος, ο φακός ολοκληρώνει τη διαδικασία της εστίασης του φωτός στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα ευκρινές είδωλο του οπτικού κόσμου [2]. Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται η δομή του οφθαλμού με τα επιμέρους τμήματά του.



Εικόνα 2. Ανατομική εικόνα του βολβού του οφθαλμού [b]

1.2 Δακρυϊκό Υγρό

Το δακρυϊκό υγρό είναι το υγρό, το οποίο εκκρίνεται από τον κύριο και τους επικουρικούς δακρυϊκούς αδένες, οι οποίοι βρίσκονται στο άνω πλάγιο τμήμα του οφθαλμικού κόγχου. Η έκκρισή του γίνεται με μηχανισμό αντλίας, μέσω των κινήσεων των βλεφάρων, δηλαδή τον βλεφαρισμό. Φυσιολογικά, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ένα λεπτό στρώμα δακρύων καλύπτει τον κερατοειδή και τον επιπεφυκότα προστατεύοντας τους έτσι από το εξωτερικό περιβάλλον, καθώς και από τους μικροοργανισμούς και απεικονίζεται στην **Εικόνα 3**.



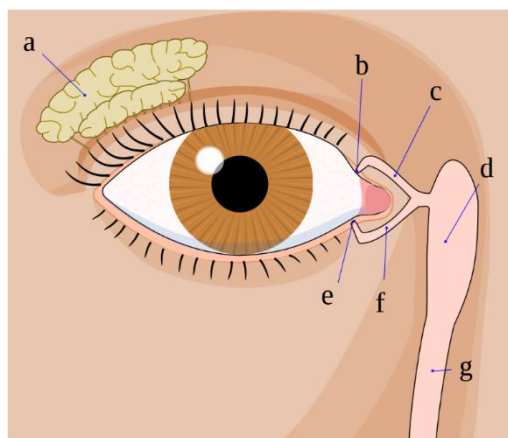
Εικόνα 3. Στρώματα στο δακρυϊκό φιλμ [c]

Τα δάκρυα είναι ένα πολύπλοκο μίγμα πρωτεϊνών, λιπιδίων, βλεννίνων, νερού και αλάτων και πρόσφατη μελέτη έχει εντοπίσει 1526 πρωτεΐνες, με κυρίαρχες τη λυσοζύμη και τη λακτοφερρίνη, οι οποίες έχουν αντιμικροβιακές και αντιβακτηριδιακές δράσεις, καθώς και την αλβουμίνη και τη λιποκαλίνη. Τα παραπάνω συστατικά του δακρυϊκού υγρού, το καθιστά το λιγότερο πολύπλοκο ως σωματικά υγρά από τον ορό ή το πλάσμα. Λόγω, λοιπόν, αυτής της λιγότερο περίπλοκης φύσης του και επίσης, επειδή στην οφθαλμική επιφάνεια τα δάκρυα αντιπροσωπεύουν το « εγγύς υγρό », δηλαδή το τελικό προϊόν της δακρυϊκής λειτουργικής μονάδας [3], η έρευνα της σύνθεσης τους αποτελεί ιδανική πηγή για την εύρεση βιοδεικτών που

σχετίζονται με τα διάφορα συστατικά τους [4], ενώ υπήρξε έντονο ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό νέων βιοδεικτών για οφθαλμικές παθήσεις, όπως για παράδειγμα την ξηροφθαλμία, την εαρινή επιπεφυκίτιδα, τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, όγκους του οφθαλμού και τέλος το γλαύκωμα.

Η παραγωγή του δακρυϊκού υγρού είναι πολύ σημαντική, καθώς ο κύριος ρόλος τους είναι σε συνδυασμό με τα βλέφαρα να αποτελούν τη άμυνα του οργανισμού, αλλά και να καθαρίζουν και να λιπαίνουν το μάτι σε περίπτωση ερεθισμού. Το δακρυϊκό υγρό, λοιπόν, παράγεται για τρεις λόγους: πρώτον, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, για προστασία του οφθαλμού από το περιβάλλον και τους ποικίλους μικροοργανισμούς, δεύτερον ως αποτέλεσμα ισχυρών εσωτερικών συναισθημάτων και τέλος, σε περίπτωση ερεθισμού του οφθαλμού.

Ο δακρυϊκός αδένας από τον οποίο παράγεται το δάκρυ χωρίζεται σε δυο λοβούς, τον άνω και τον κάτω λοβό. Ο άνω λοβός είναι μεγαλύτερος και έχει σχήμα φασολιού. Στη συνέχεια, τα δάκρυα απλώνονται στον οφθαλμό. Η περίσσεια των δακρύων φτάνει σε ένα στενό πόρο, το δακρυϊκό σημείο, στον έσω κανθό του οφθαλμού και συσσωρεύεται στον δακρυϊκό ασκό και στη συνέχεια στον ρινοδακρυϊκό πόρο και τέλος στην ρινική κοιλότητα [5].



Εικόνα 4. Ανατομία της παραγωγής δακρύων: a) Δακρυϊκός αδένας, b) Άνω δακρυϊκό σημείο, c) Άνω δακρυϊκό σωληνάριο, d) Δακρυϊκός ασκός, e) Κάτω δακρυϊκό σημείο, f) Κάτω δακρυϊκό σωληνάριο, g) ρινοδακρυϊκός πόρος [d]

1.2.1 Ρόλος του Δακρυϊκού Υγρού

Ο οφθαλμός είναι ένα πολύ ευαίσθητο όργανο και η αίσθηση της όρασης πολύ σημαντική για τη ζωή. Για το λόγο αυτό, τα δάκρυα κρίνονται απαραίτητα για τη φυσιολογική λειτουργία του οφθαλμού και αυτό αποδεικνύεται ως εξής [6]:

1. Τα δάκρυα σχηματίζουν ένα φιλμ, το δακρυϊκό φιλμ, πάνω από το επιθήλιο του κερατοειδή, με αποτέλεσμα η επιφάνειά του να είναι λεία και ομαλή. Κατά αυτό τον τρόπο, δρουν ως λιπαντικό για την οφθαλμική επιφάνεια.
2. Επίσης, διατηρούν μία ομαλή επιφάνεια για τη διάθλαση του φωτός. Τα δάκρυα σχηματίζουν την πρώτη διαθλαστική επιφάνεια που συναντά το φως στην πορεία του από τον κερατοειδή προς τον αμφιβληστροειδή χιτώνα.
3. Ακόμη, η μεμβράνη των δακρύων προστατεύει την επιφάνεια του οφθαλμού από επιβλαβείς καταστάσεις, όπως αυτή της ξήρανσης, του έντονου φωτός, των επιβλαβών χημικών ουσιών και της βακτηριακής, ιικής και παρασιτικής μόλυνσης.
4. Ενυδατώνουν τον κερατοειδή και τον επιπεφυκότα, αλλά και παρέχουν οξυγόνο, γλυκόζη και άλλα χημικά στοιχεία, που είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων τους.
5. Με τη βοήθεια του βλεφαρισμού μέσω των βλεφάρων επιτυγχάνεται ο καθαρισμός της επιφάνειας του κερατοειδή και του επιπεφυκότα από μικροσωματίδια και επιβλαβείς μικροοργανισμούς.
6. Παρεμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροβίων στον κερατοειδή και στον επιπεφυκότα.

7. Τέλος, σε περίπτωση τραύματος τα δάκρυα βοηθούν στη μεταφορά αντιφλεγμονωδών κυττάρων στην περιοχή της βλάβης επιτυγχάνοντας με αυτό τον τρόπο την epούλωσή της λοίμωξης.

1.2.2 Σύσταση Δακρυϊκού Υγρού

Το δακρυϊκό υγρό αποτελείται από νερό, ηλεκτρολύτες, πρωτεΐνες όπως αντισώματα και λυσοζύμη, και λιπίδια. Τα υλικά, αυτά, με τη σειρά τους σχηματίζουν τρία διακριτά στρώματα, με σειρά από το εξωτερικό προς το εσωτερικό και είναι τα εξής:

1. το στρώμα λιπιδίων, το οποίο είναι ένα πολύ λεπτό ελαιώδες στρώμα εξωτερικών λιπιδίων, πλάτους 0,9-11 μm,
2. το υδάτινο στρώμα, το οποίο είναι ένα λεπτότερο υδατικό μεσαίο στρώμα πάχους 6,5-7,5 μm, που περιέχει πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων αρκετών αντιμικροβιακών ενζύμων, το οποίο εκκρίνεται από τους δακρυϊκούς αδένες
3. και τέλος, το βλεννώδες στρώμα, το οποίο είναι ένα πολύ παχύ εσωτερικό στρώμα βλεννογόνου και περιέχει ηλεκτρολύτες, νερό, ανοσοσφαιρίνες και ένζυμα και του οποίου ρόλος αποτελεί να καλύπτει το επιθήλιο [7].

Το αρχικό ελαιώδες στρώμα του δακρυϊκού φιλμ εμποδίζει την εξάτμιση της υδατινής στοιβάδας, η οποία περιέχει πλήθος αμυντικών ουσιών, όπως λυσοζύμη, ανοσοσφαιρίνες, β-λυσίνη κ.ά.. Συνολικά η δακρυϊκή στοιβάδα χρησιμεύει για την έκπλυση των διαφόρων παθογόνων και τοξικών παραγόντων καθώς και των αλλεργιογόνων από την επιφάνεια του οφθαλμού.

Κατά συνέπεια, η δακρυϊκή στοιβάδα περιέχει ένα σύνθετο μίγμα πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και των ενζύμων, των νευροπεπτιδίων, των προστατευτικών πρωτεϊνών, καθώς και άλλων κατηγοριών ουσιών όπως λιπίδια, υδατάνθρακες και άλατα. Τα λιπίδια του δακρυϊκού υγρού είναι τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, υδρογονάνθρακες, κηροί και εστέρες στερολών. Οι πρωτεΐνες είναι οι πρωτεΐνες των δακρυϊκών αδένων και οι πρωτεΐνες ορού, οι συγκεντρώσεις των οποίων στο δακρυϊκό υγρό κυμαίνονται από 6 έως 10 mg/ml. Οι κυρίαρχες πρωτεΐνες δακρύων είναι η λακτοφερρίνη, η οποία έχει αντιβακτηριδιακές ιδιότητες, και η λυσοζύμη, της οποίας κύριος ρόλος αποτελεί η καταπολέμηση των βακτηριακών λοιμώξεων διασπώντας την πεπτιδογλυκάνη στο εξωτερικό τμήμα κάποιων βακτηρίων και οι οποίες εκκρίνονται από τα δακρυϊκά κύτταρα *acinar*. Άλλες κυρίαρχες πρωτεΐνες δακρυϊκού υγρού συνιστούν ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο οποίος έχει ρυθμιστικό ρόλο διατηρώντας την οφθαλμική επιφάνεια και ελέγχοντας την επούλωση του κερατοειδούς από κάποιο τραύμα ή από κάποια οφθαλμική ασθένεια, η λιποκαλίνη, η οποία σχετίζεται με το ιξώδες και την επιφανειακή τάση, απαραίτητα για την σταθερότητα του δακρυϊκού υγρού και τέλος, οι πρωτεΐνες ορού είναι η αλβουμίνη (παρόμοια με την αλβουμίνη του πλάσματος του αίματος), η τρανσφερίνη (παρόμοια δράση με αυτή της λακτοφερρίνης) και οι ανοσοσφαιρίνες IgA, IgG και IgM [8].

1.2.3 Τύποι Δακρυϊκού Υγρού

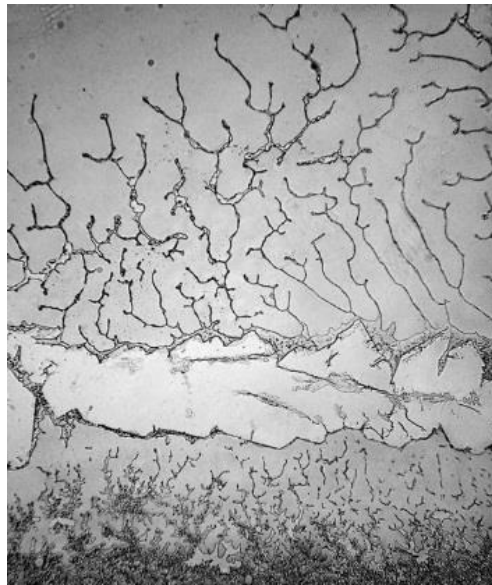
Το δακρυϊκό υγρό, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αποτελείται από τρία στρώματα: το στρώμα λιπιδίων, το υδατικό και το βλεννώδες στρώμα και αποτελείται κυρίως από νερό, άλατα, αντισώματα και λυσοζύμες. Παρόλα αυτά, η σύνθεση ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών τύπων δακρύων. Για παράδειγμα, η σύνθεση του δακρυϊκού υγρού που προκαλείται από κάποιο συναίσθημα διαφέρει από εκείνη των δακρύων που προέρχονται ως αντίδραση σε ερεθισμό, όπως ο καπνός, η σκόνη ή τα αλλεργιογόνα. Αυτό συμβαίνει, διότι τα συναισθηματικά δάκρυα περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις ορμονών στρες, όπως η αδρενοκορτικοτροπική ορμόνη και η εγκεφαλίνη λευκίνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα συναισθηματικά δάκρυα διαδραματίζουν βιολογικό ρόλο στην εξισορρόπηση των επιπέδων ορμονών του στρες.

Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι δακρυϊκού υγρού:

- τα βασικά δάκρυα
- τα αντανακλαστικά δάκρυα
- τα ψυχικά δάκρυα

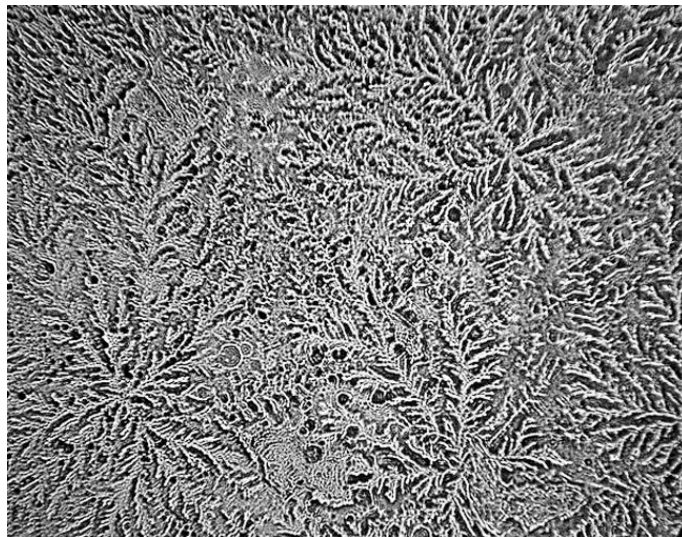
των οποίων κύριος ρόλος τους είναι η λίπανση, η προστασία και η ανακούφιση από τον πόνο, αντίστοιχα. Οι τρεις τύποι του δακρυϊκού υγρού παρατίθενται αναλυτικά παρακάτω [9]:

Βασικά δάκρυα. Στα υγιή μάτια, οι κερατοειδείς χιτώνες διατηρούνται συνεχώς υγροί και θρέφονται μέσω των βασικών δακρύων. Στόχος αυτών των δακρύων είναι να λιπαίνουν τον οφθαλμό και να βοηθούν να καθαριστεί από τη σκόνη. Τα δάκρυα αποτελούνται από νερό, ορισμένες πρωτεΐνες, τις γλυκοπρωτεΐνες που ονομάζονται μουκίνες και των οποίων το 50-80% της μάζας τους αποτελείται από υδατάνθρακες, λιπίδια, λυσοζύμη, λακτοφερρίνη, λιποκαλίνη, ανοσοσφαιρίνες, γλυκόζη, ουρία, νάτριο και κάλιο. Κάποια από αυτά τα συστατικά, όπως η λυσοζύμη, καταπολεμά τις βακτηριακές λοιμώξεις διασπώντας την πεπτιδογλυκάνη στο εξωτερικό τμήμα κάποιων βακτηρίων. Επιπλέον, περιέχουν ασκορβικό οξύ, ουρικό οξύ, κυστεΐνη, γλουταθειόνη και τυροσίνη. Συνήθως παράγονται 0,75-1,1 γραμμάρια δακρύων κάθε 24-ωρο, ρυθμός ο οποίος μειώνεται με την ηλικία [10].



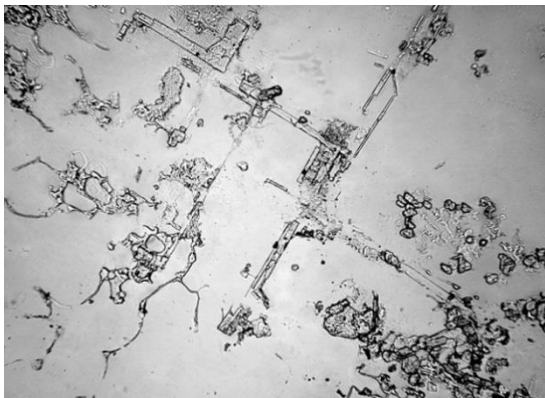
Εικόνα 5. Βασικά δάκρυα στο μικροσκόπιο [e]

Αντανακλαστικά δάκρυα. Αυτός ο τύπος δακρύων παράγεται ως αποτέλεσμα ερεθισμού του οφθαλμού από ξένα σώματα ή από την παρουσία ερεθιστικών ουσιών, όπως είναι το κρεμμύδι, δακρυγόνα και σπρέι πιπεριού, στην περιοχή του οφθαλμού που βρίσκεται ο κερατοειδής, ο επιπεφυκότας ή ο ρινικός βλεννογόνος. Αποτέλεσμα αυτού του ερεθισμού είναι η ενεργοποίηση των διαύλων TRP στο οφθαλμικό νεύρο [9]. Οι διάυλοι TRP αποτελούν θερμοευαίσθητους, μη ειδικούς διαύλους ιόντων και είναι ένα άθροισμα πρωτεϊνών διαμορφωμένο με τέτοιο τρόπο, ώστε να ενεργοποιείται και να απενεργοποιείται, ανάλογα με την δράση διαφόρων ερεθισμάτων. Επίσης, οι διάυλοι TRP επιτρέπουν την εισχώρηση στο εσωτερικό της νευρικής ίνας ιόντα ασβεστίου, ιόντα μαγνησίου και μερικά ιόντα νατρίου. Στόχος των αντανακλαστικών δακρύων είναι να καθαρίσουν και να ξεπλύνουν τον οφθαλμό. Τέλος, έχουν σχετιστεί με την παρουσία έντονου φωτός, με εμετό, βήχα και χασμουρητό.

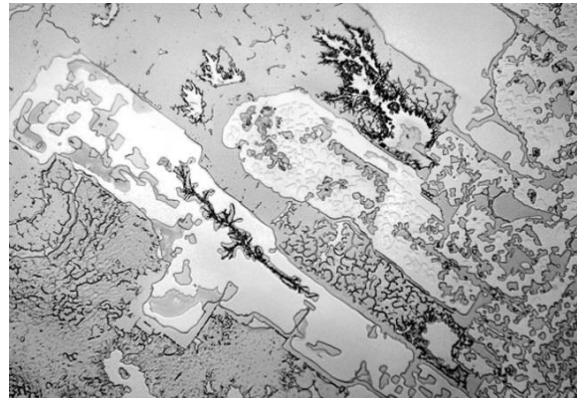


Εικόνα 6. Δάκρυα που προκλήθηκαν από κρεμμύδι στο μικροσκόπιο [e]

Ψυχικά δάκρυα. Αυτή η κατηγορία δακρυϊκού υγρού, γενικά, αναφέρεται ως κλάμα, και αυξάνεται λόγω ισχυρού συναισθηματικού άγχους, ευχαρίστησης, θυμού, λύπης, πένθους ή σωματικού πόνου. Αυτή η πρακτική δεν περιορίζεται μόνο στα αρνητικά συναισθήματα, καθώς συνδέεται και με τη συγκίνηση, αλλά ακόμα και με περιπτώσεις χαράς, γέλιου και έντονου χιούμορ. Στους ανθρώπους, τα συναισθηματικά δάκρυα μπορεί να συνοδεύονται από ερυθρότητα του προσώπου και λυγμούς, όπως σπασμωδική αναπνοή. Τα δάκρυα αυτά, έχουν διαφορετική χημική σύσταση από τα βασικά δάκρυα, των οποίων κύριος ρόλος αποτελεί η λίπανση. Περιέχουν περισσότερες πρωτεϊνικές ορμόνες, όπως η προλακτίνη, η αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη, η λευκεφαλίνη, η οποία είναι ένα φυσικό παυσίπονο, σε σύγκριση με τα βασικά ή τα αντανακλαστικά δάκρυα. Στην παραγωγή τους συμμετέχει το μεταιχμιακό σύστημα και το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Το τελευταίο ελέγχει τους δακρυϊκούς αδένες, μέσω του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνης, μέσω των νικοτινικών και μουσκαρινικών υποδοχέων. Όταν ενεργοποιούνται αυτοί οι υποδοχείς, ο δακρυϊκός αδένας διεγείρεται για να παράγει τα δάκρυα [11].



Εικόνα 7. Δάκρυα πένθους [e]



Εικόνα 8. Δάκρυα χαράς στο μικροσκόπιο [e]

Όσον αφορά τη νευρολογία, το νεύρο του τριδύμου V1 (πέμπτο κρανίο) φέρει το αισθητήριο μονοπάτι των αντανακλαστικών δακρύων. Όταν κόβεται το νεύρο του τριδύμου, τα δάκρυα από τα αντανακλαστικά θα σταματήσουν, ενώ τα συναισθηματικά δάκρυα όχι. Το μεγάλο (επιφανειακό) πετροσαλικό νεύρο από το κρανιακό νεύρο VII παρέχει αυτόνομη εννεύρωση στον δακρυϊκό αδένα [12] και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μεγάλου μέρους του υδατικού τμήματος της μεμβράνης δακρύων.

Βιβλιογραφικά, δακρυϊκό υγρό και από τους τρεις τύπους δακρύων έχει συλλεχθεί, κρυσταλλωθεί και παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο και απεικονίζεται στις παραπάνω εικόνες. Παρακάτω (**Εικόνα 9**) απεικονίζονται συγκεντρωτικά και συγκριτικά οι διαφορετικές μικροσκοπικές δομές των τριών δακρυϊκών τύπων που προέρχονται από διαφορετικά άτομα και διαφορετικές περιστάσεις:



Εικόνα 9. Διαφορετικές μικροσκοπικές δομές δακρυϊκού υγρού σε δύο διαφορετικά άτομα [f]

1.3 Βιοδείκτες

Στον τομέα της προγνωστικής, προληπτικής και εξατομικευμένης ιατρικής, οι βιοδείκτες παίζουν ολοένα και σημαντικότερο ρόλο στην ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων φαρμάκων και θεραπειών, ως διαγνωστικά εργαλεία ή για αντικειμενική παρακολούθηση της θεραπείας σε κλινικές δοκιμές. Ένας βιοδείκτης, όπως ορίζεται από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (National Institute of Health: NIH), είναι ένα χαρακτηριστικό που μετριέται και εκτιμάται αντικειμενικά ως δείκτης φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών, παθογόνων διεργασιών ή φαρμακολογικών αποκρίσεων στην θεραπευτική παρέμβαση, ενώ η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration: FDA) περιγράφει ένα βιοδείκτη ως οποιοσδήποτε μετρήσιμος διαγνωστικός δείκτης που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του κινδύνου ή της παρουσίας ασθένειας [13].

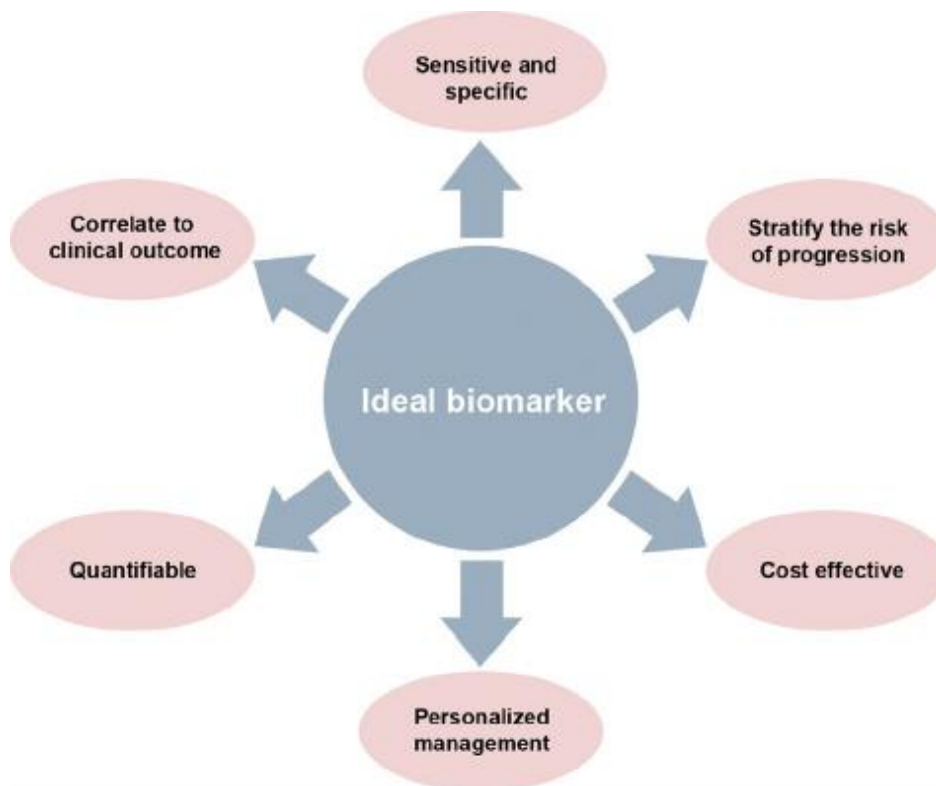
Με λίγα λόγια, ένας συγκεκριμένος βιοδείκτης ασθένειας ορίζεται ένα μετρήσιμο χαρακτηριστικό σε ένα βιολογικό σύστημα που αλλάζει λόγω ασθένειας, έκθεσης σε χημικά ή άλλους παράγοντες. Τόσο οι πρωτεϊνωμικές, όσο και οι γονιδιωματικές μελέτες εφαρμόζονται στην αναζήτηση νέων και ειδικών βιοδεικτών για κάθε μορφής ασθένεια, καθώς αποτελούν βασικοί δείκτες που μπορούν να παράσχουν ζωτικές πληροφορίες για την ανίχνευση του κινδύνου ασθένειας, την εξέλιξη της ασθένειας, τη δράσης της ασθένειας, αλλά ακόμη και για την πρόβλεψη της απόκρισης των ασθενών στις θεραπείες ή των ανεπιθύμητων ενεργειών και των αλληλεπιδράσεων φαρμάκων και τέλος, τον καθορισμό του βασικού κινδύνου.

Οι βιοδείκτες κατατάσσονται στις εξής τρεις κατηγορίες:

- **Βιοδείκτες έκθεσης:** εξωγενείς ουσίες (ξеноβιοτικά) ή οι μεταβολίτες τους ή το προϊόν της αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός ξеноβιοτικού και ενός μοριακού ή κυτταρικού στόχου που μετράται σε ένα διαμέρισμα εντός ενός οργανισμού (NRC, 1989).
- **Βιοισθητήρες επίδρασης:** μια μετρήσιμη αλλοίωση σε έναν οργανισμό (βιοχημική, δομική, λειτουργική, συμπεριφορική ή και άλλες) που σύμφωνα με το μέγεθός της μπορεί να συσχετιστεί με καθιερωμένη ή δυνητική βλάβη της υγείας ή ασθένεια.
- **Βιοδείκτες ευαισθησίας:** Ένας δείκτης μη εμπλεκόμενης ή επίκτητης ικανότητας ενός οργανισμού να ανταποκρίνεται στην πρόκληση της έκθεσης σε χημική ή ξеноβιοτική ουσία.

Η κατανομή ενός βιοδείκτη σε μία από τις παραπάνω κατηγορίες εξαρτάται από τη τοξικολογική σημασία του και από το ειδικό πλαίσιο στο οποίο χρησιμοποιείται η δοκιμασία [14].

Ένας βιοδείκτης, λοιπόν, για να κριθεί ιδανικός χρήσιμος πρέπει να συσχετίζεται με κλινικές παραμέτρους, όπως συγκεκριμένα συμπτώματα, κλινικά σημεία και επικυρωμένες διαγνωστικές εξετάσεις, να είναι συγκεκριμένος και να προμηνύει την εξέλιξη της νόσου. Επίσης, όποτε είναι δυνατόν, πρέπει να χρησιμοποιούνται μη επεμβατικά δείγματα τόσο για τη διευκόλυνση των ασθενών, όσο και για την εύκολη διαχείριση και ανάλυση των δειγμάτων.



Εικόνα 10. Χαρακτηριστικά ιδανικού βιοδείκτη [g]

Παρατηρώντας την **Εικόνα 10**, καθίστανται ευδιάκριτα ορισμένα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού και χρήσιμου βιοδείκτη [14]. Ανακεφαλαιώνοντας, λοιπόν, αυτά τα χαρακτηριστικά είναι τα ακόλουθα:

- ο βιοδείκτης πρέπει να είναι ευαίσθητος και συγκεκριμένος
- πρέπει να προμηνύει την εξέλιξη της ασθένειας
- πρέπει να είναι αποτελεσματικός
- πρέπει να χρήζει εξατομικευμένης διαχείρισης
- πρέπει να είναι ποσοτικοποιημένος
- πρέπει να συσχετίζεται με κλινικές παραμέτρους

1.4 Το Δακρυϊκό Υγρό για Μελέτη Βιοδεικτών

Την τελευταία δεκαετία, οι τεχνολογίες μέσω των οποίων δημιουργούνται τα προφίλ των ασθενών παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ευαισθησία. Για το λόγο, αυτό, έχουν σημειωθεί τεράστιες βελτιώσεις στην ευαισθησία ανίχνευσης, επιτρέποντας έτσι την ποσοτικοποίηση δειγμάτων, όπως για παράδειγμα των σωματικών υγρών, που προηγουμένως ήταν δύσκολο να προσδιοριστούν. Κατά συνέπεια, σημειώθηκε τεράστια αύξηση του ενδιαφέροντος για τη διερεύνηση του δακρυϊκού υγρού, κυρίως στο πεδίο της ασθένειας της οφθαλμικής επιφάνειας [13].

Δεδομένου ότι το δάκρυ είναι ένα πιο προσιτό σωματικό υγρό, καθώς και το γεγονός ότι υπάρχουν περισσότερες από 1500 πρωτεΐνες, καθιστούν το δάκρυ λιγότερο περίπλοκο σωματικό υγρό συγκριτικά με τον ορό ή το πλάσμα, η δειγματοληψία είναι πολύ λιγότερο επεμβατική, και καθώς τα δάκρυα αντιπροσωπεύουν το «εγγύς υγρό», δηλαδή το τελικό προϊόν της δακρυϊκής λειτουργικής μονάδας, η έρευνα γύρω από τη σύνθεσή τους αποτελεί ιδανική πηγή για την ανακάλυψη βιοδεικτών που σχετίζονται με τα διάφορα συστατικά τους [4]. Επιπλέον, ανατομικά τα δάκρυα βρίσκονται κοντά στο σημείο της νόσου, αυξάνοντας την εξειδίκευση για φλεγμονώδη νόσο της οφθαλμικής επιφάνειας. Ακόμη, η παρατήρηση και η αξιολόγηση του τρόπου με τον οποίο οι ασθενείς επηρεάζουν τη σύνθεση του δακρυϊκού φιλμ και τέλος, με τον προσδιορισμό των αλλαγών στα προφίλ των δακρύων, καθώς οι πρωτεϊνικές αναλύσεις παρέχουν πληροφορίες για την παθογένεια, την εξέλιξη, αλλά και τη δράση της ασθένειας και των ανεπιθύμητων παρενεργειών, είναι δυνατό να αναγνωριστούν κρίσιμες οδοί στην εξέλιξη της νόσου, επιτρέποντας πιο προβλέψιμη και εξατομικευμένη θεραπεία του ατόμου [8]. Όλοι οι παραπάνω λόγοι καθιστούν το δακρυϊκό υγρό ιδανική πηγή για την ανακάλυψη βιοδεικτών που σχετίζονται με τα συστατικά τους, με αυξημένο ενδιαφέρον κυρίως για τις οφθαλμικές παθήσεις.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πρωτεΐνες που περιέχονται στο δακρυϊκό υγρό έχουν διερευνηθεί εκτενώς στο παρελθόν και έχουν αποδειχθεί ξεχωριστές σχέσεις μεταξύ των επιπέδων ορισμένων πρωτεϊνών αυτών με ποικίλες οφθαλμικές διαταραχές και μη. Η ανάλυση του δακρυϊκού υγρού έχει αποδειχθεί ότι είναι ελπιδοφόρα για την ανάκτηση περισσότερων πληροφοριών σχετικά με την παθογένεια ποικίλων ασθενειών και ότι μπορεί να οδηγήσει σε νέες διαγνωστικές δυνατότητες. Επιπλέον, οι βιοδείκτες αντιπροσωπεύουν πολλά υποσχόμενους στόχους για την ανάπτυξη φαρμάκων και, κατά συνέπεια, τη βελτίωση των προτύπων περίθαλψης των ασθενών. Παρόλα αυτά, οι έρευνες για πιθανούς βιοδείκτες ασθενειών στο δακρυϊκό υγρό βρίσκονται ακόμα σε πρώιμο στάδιο, καθώς αποτελεί αντικείμενο μελέτης των τελευταίων χρόνων, με όλο και αυξανόμενο ενδιαφέρον γύρω από το όνομά τους [13].

Στην παρούσα επισκόπηση, λοιπόν, έχουν αναπτυχθεί ορισμένοι πιθανοί βιοδείκτες δακρυϊκού υγρού που σχετίζονται με οφθαλμικές νόσους κυρίως στο πεδίο της οφθαλμικής επιφάνειας και συγκεκριμένα αυτής της ξηροφθαλμίας.

1.5 Ασθένειες προς διάγνωση μέσω ανάλυσης του Δακρυϊκού Υγρού

Οι ασθένειες που μπορούν να μελετηθούν από την ανάλυση του δακρυϊκού υγρού χωρίζονται στις εξής κατηγορίες :

1. Ασθένειες Οφθαλμικής Επιφάνειας
2. Συστηματικές Ασθένειες με Οφθαλμική Επιπλοκή
3. Συστηματικές Ασθένειες χωρίς Οφθαλμική Επιπλοκή
4. Συστηματικές Νευρολογικές Ασθένειες

Στην πρώτη κατηγορία, ανήκει η ασθένεια της ξηροφθαλμίας, η οποία αποτέλεσε και αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής, καθώς και ασθένειες όπως οφθαλμική αλλεργία, κερατόκωνος, κερατοπάθεια, τράχωμα, ανιριδία και γλαύκωμα. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η κυστική ίνωση, στην τρίτη ο καρκίνος και τέλος, στην τελευταία κατηγορία ανήκουν η σκλήρυνση κατά πλάκας και η νόσος Πάρκινσον.

Οι οφθαλμικές και συστηματικές ασθένειες μπορούν να αλλάξουν τα πρότυπα σύστασης των δακρύων. Επομένως, η μελέτη της σύνθεσης του δακρυϊκού φιλμ μπορεί να θεωρηθεί ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση διαφόρων ασθενειών. Αυτά τα ευρήματα μπορεί να οδηγήσουν σε καλύτερο τρόπο κατανόησης ή παρακολούθησης της εξέλιξης της νόσου. Για παράδειγμα, τα δάκρυα των ασθενών που πάσχουν από κερατόκωνο, φαίνεται να έχουν αλλοιωμένο προφίλ πρωτεϊνών, που μπορεί να αλλάξει με τη σοβαρότητα της νόσου [15].

1.5.1 Ασθένειες Οφθαλμικής Επιφάνειας

Η οφθαλμική επιφάνεια αποτελεί το εξωτερικό όριο του βολβού του οφθαλμού. Είναι μία λειτουργική μονάδα που αποτελείται από τα βλέφαρα, τους επιπεφυκότες, ταρσικό και βολβικό (που επενδύουν την εσωτερική επιφάνεια των βλεφάρων και την εξωτερική του βολβού, αντίστοιχα), τον κερατοειδή χιτώνα και βέβαια τους δακρυϊκούς αδένες. Κύριοι ρόλοι του λειτουργικού συστήματος είναι η διατήρηση των ανατομικών και φυσιολογικών ιδιοτήτων των συστατικών του, η διατήρηση των οπτικών συνθηκών της διοπτρικής επιφάνειας του οφθαλμού και η προστασία των ματιών από τραυματισμούς λόγω εξωγενών και ενδογενών παραγόντων [16, 17,18]. Σημαντικό ρόλο στην υγεία της οφθαλμικής επιφάνειας παίζει και η δακρυϊκή μονάδα ή στοιβάδα, δηλαδή τα δάκρυα που επαλείφουν την επιφάνεια του οφθαλμού ανάμεσα στα βλέφαρα. Ο ρόλος τους είναι κυρίως προστατευτικός και λιπαντικός για την οφθαλμική επιφάνεια, καθώς είναι διαρκώς εκτεθειμένη στο εξωτερικό περιβάλλον [16]. Συνεπώς, ένα υγιές δακρυϊκό φιλμ είναι θεμελιώδες για την υποστήριξη της ακεραιότητας του λειτουργικού συστήματος και των διαθλαστικών λειτουργιών [16].

Κάθε μια από τις επιμέρους δομές που συναποτελούν την οφθαλμική επιφάνεια μπορεί να δυσλειτουργεί ή να προσβληθεί από πλήθος νοσημάτων, μικροβιακών, ιογενών, αλλά και αυτοάνοσων. Παθογόνα συμβάντα που διαταράσσουν μια τέτοια ομοιόσταση και δεν εξουδετερώνονται αμέσως από τις κατάλληλες αντιδράσεις του οφθαλμικού επιφανειακού συστήματος, μπορούν να ταξινομηθούν ως διαταραχή της οφθαλμικής επιφάνειας και περιλαμβάνουν καταστάσεις, όπως:

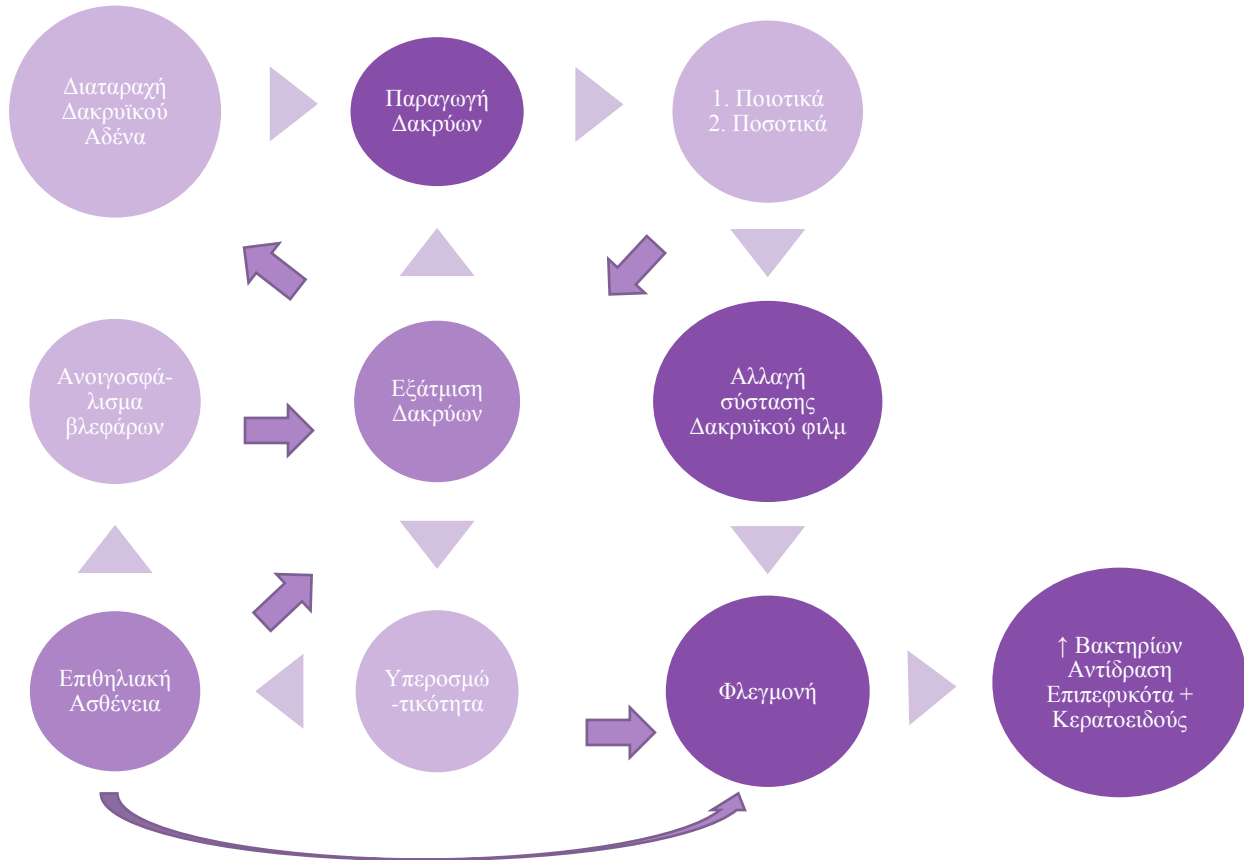
- ξηροφθαλμία
- οφθαλμικές αλλεργίες
- κερατοπάθεια
- περιφερική ελκώδης κερατίτιδα
- τράχωμα
- θυροειδική οφθαλμοπάθεια
- γλαύκωμα

Το αποτέλεσμα της κάθε διαταραχής, τα οποία θα αποτελέσουν τα συμπτώματα της εκάστοτε οφθαλμικής επιφανειακής νόσου είναι συνήθως, ανάλογα με τη φύση και τη βαρύτητα του υποκείμενου νοσήματος, τα εξής:

- υποκειμενική ενόχληση, η οποία ποικίλλει από απλό αίσθημα ξένου σώματος και εκκρίσεις (κοινώς «τσίμπλες») μέχρι και δυσφορία ή/και πόνος
- φωτοφοβία
- αίσθηση ξηρότητας του οφθαλμού
- ερυθρά μάτια
- κνησμός
- δυσχέρεια στο ανοιγοκλείσιμο των ματιών
- δακρύρροια
- και βέβαια θόλωση ή μείωση της όρασης κατά τη διάρκεια της ημέρας
- τύφλωση, σε ακραίες περιπτώσεις

Μια μικρή αλλαγή στη σταθερότητα ή/και στον όγκο των δακρυϊκών μεμβρανών θα έχει ως αποτέλεσμα σημαντική αλλαγή της ποιότητας της εικόνας του αμφιβληστροειδούς (**Εικόνα 11**).

Συνεπώς, η συντήρηση ενός σταθερού φιλμ δακρύων είναι απαραίτητη για την όραση [19, 20].



Εικόνα 11. Διάσπαση του συστήματος της οφθαλμικής επιφανειακής που οδηγεί σε επιθηλιακή βλάβη και κλινική εμφάνιση νόσου.

Με το πέρασμα των χρόνων και λόγω του σύγχρονου τρόπου ζωής, άρχισαν να γίνονται όλο και πιο συχνές οι περιπτώσεις εμφάνισης ασθενειών της οφθαλμικής επιφάνειας. Δυστυχώς, οι περιπτώσεις συχνά δεν διαγιγνώσκονται, με αποτέλεσμα να μην αντιμετωπίζονται, λόγω έλλειψης κατανόησης των συμπτωμάτων και ανακριβούς αξιολόγησης. Καθώς οι άνθρωποι ζουν περισσότερο, αυτές οι διαταραχές γίνονται πιο διαδεδομένες, αλλά η ευαισθητοποίηση σχετικά με

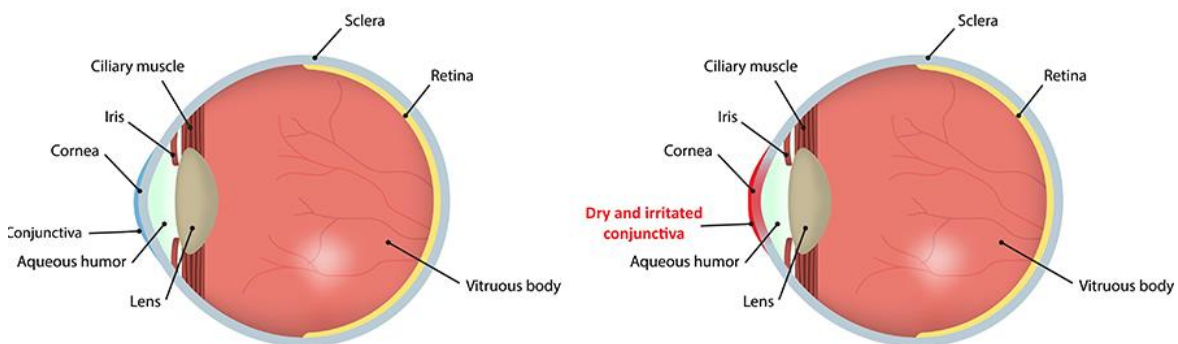
αυτές είναι αρκετά περιορισμένη. Για το λόγο, αυτό, η μελέτη των βιοδεικτών στην ανάλυση του δακρυϊκού υγρού ασθενών οι οποίοι πάσχουν από ασθένειες που επηρεάζουν την επιφάνεια του οφθαλμού μπορεί να επιφέρει σημαντικές αλλαγές σε αυτόν τον τομέα, έχοντας ως αποτέλεσμα την έγκαιρη διάγνωση της νόσου και την αντιμετώπισή της.

Οι οφθαλμικές ασθένειες μπορούν να αλλάζουν τα πρότυπα πρωτεϊνών του δακρυϊκού υγρού. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη της σύνθεσης του δακρυϊκού φιλμ μπορεί να είναι ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση των παραπάνω ασθενειών. Αυτά τα ευρήματα μπορεί να οδηγήσουν στον τρόπο κατανόησης ή ακόμη και στην παρακολούθηση της εξέλιξης της εκάστοτε νόσου [8]. Στην παρούσα διατριβή, αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε η ξηροφθαλμία. Επομένως, στις επόμενες υποενότητες παρουσιάζονται ορισμένα χαρακτηριστικά της ξηροφθαλμίας και των ποικίλων τύπων της, καθώς και σημαντικοί βιοδείκτες που έχουν μελετηθεί έως τώρα και παρέχουν σημαντικές γνωστικές πληροφορίες για τις ασθένειες αυτές.

1.5.2 Ξηροφθαλμία

Η δακρυϊκή μεμβράνη, οι αδένες και τα κύτταρα που παράγουν το δακρυϊκό υγρό, η οφθαλμική επιφάνεια, τα βλέφαρα, καθώς και τα αισθητήρια και κινητικά νεύρα που τα συνδέουν έχουν ονομαστεί ως δακρυϊκή λειτουργική μονάδα (LFU) [3]. Ασθένεια ή βλάβη σε οποιοδήποτε συστατικό της δακρυϊκής λειτουργικής μονάδας μπορεί να αποσταθεροποιήσει το φιλμ δακρύων και να οδηγήσει σε σύνδρομο ξηροφθαλμίας (DES: Dry Eye Syndrome ή DED: Dry Eye Disease).

Η ξηροφθαλμία είναι μια πολυπαραγοντική φλεγμονώδης ασθένεια των δακρύων και της οφθαλμικής επιφάνειας που έχει ως αποτέλεσμα συμπτώματα δυσφορίας, διαταραχής της όρασης και αστάθεια του φιλμ με πιθανή βλάβη στην οφθαλμική επιφάνεια (**Εικόνα 12**). Συνοδεύεται επίσης από αυξημένη οσμωτικότητα του δακρυϊκού φιλμ και φλεγμονή της οφθαλμικής επιφάνειας [3, 17].



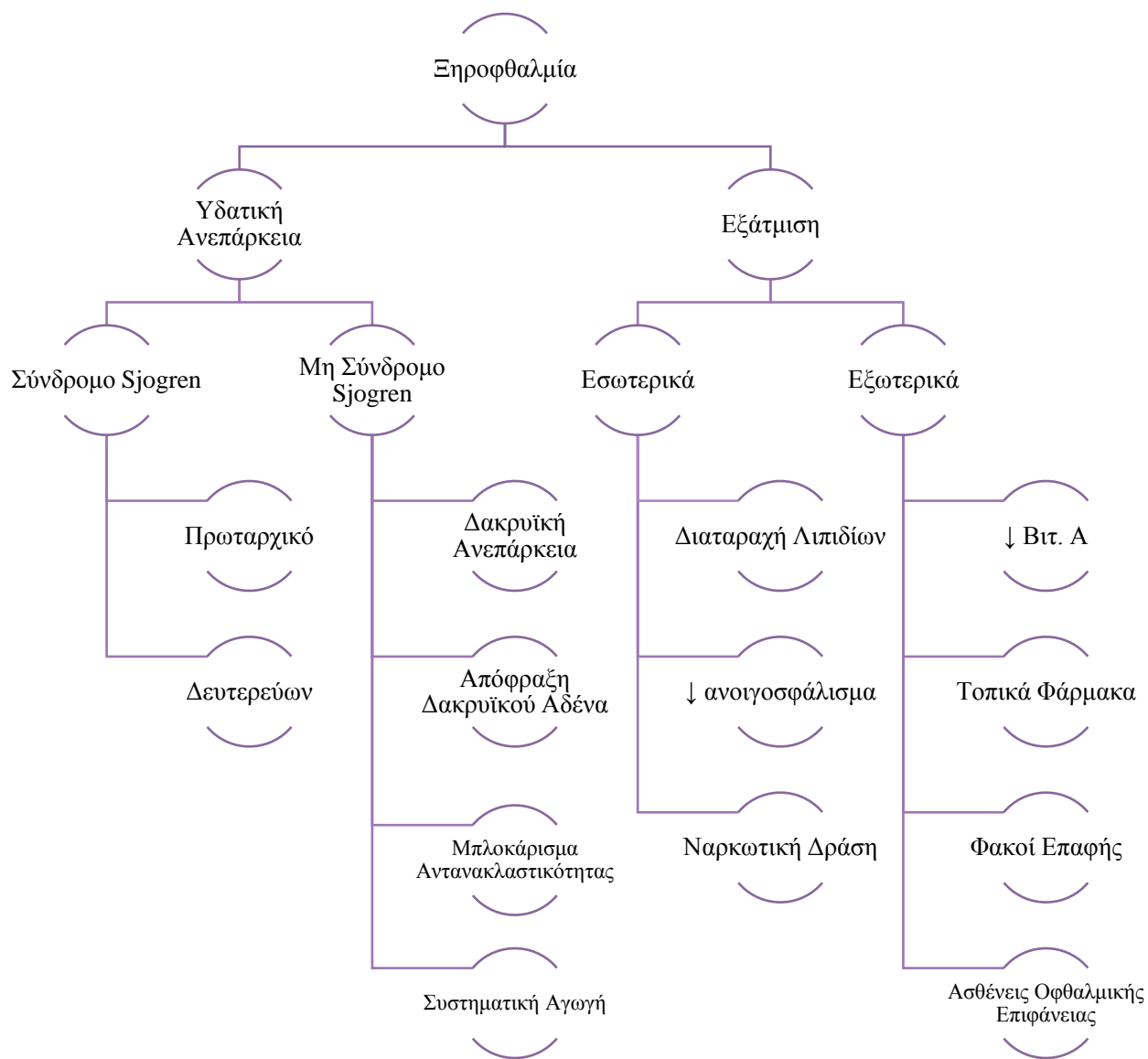
Εικόνα 12. Χαρακτηριστικά ξηροφθαλμίας. [h]

Αριστερά: υγιής οφθαλμός, Δεξιά: οφθαλμός με ξηροφθαλμία

Η ξηροφθαλμία εκτός από μια οφθαλμική κατάσταση με σοβαρές συνέπειες που κυμαίνονται από οφθαλμική δυσφορία στην απλούστερη μορφή του, μπορεί να προκαλέσει έως και προβλήματα όρασης αλλά και έλκος του κερατοειδούς σε σοβαρές περιπτώσεις [21]. Δεδομένα από επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η ξηροφθαλμία είναι μια κοινή ασθένεια, ειδικά στον ηλικιωμένο πληθυσμό, που προσβάλλει έως και το 20% των ενηλίκων ηλικίας 45 ετών και άνω [22, 23], και είναι ένας από τους πιο συχνούς λόγους επίσκεψης σε οφθαλμίατρο. Ακόμη, παράγοντες κινδύνου για πάθηση από ξηροφθαλμία εκτός από τη γήρανση, είναι το κάπνισμα, η χρήση φαρμάκων, η χρήση φακών επαφής, η διαθλαστική χειρουργική επέμβαση με λέιζερ, οι καιρικές συνθήκες, οι περιβαλλοντικοί ρύποι, ορμονικές διαταραχές, ασθένειες του ανοσοποιητικού συστήματος και σαφώς η χρήση Η/Υ και γενικά η έκθεση σε οθόνες [22]. Στις περισσότερες περιπτώσεις της ξηροφθαλμίας υπάρχουν μόνο περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές εκτός από τη συμπτωματική θεραπεία, συνήθως με τεχνητά δάκρυα ή λιποσωμικά σπρέι ματιών με αποτέλεσμα την αποτροπή της αφυδάτωσης του κερατοειδούς και των επιπεφυκότων και την προσωρινή ανακούφιση των ασθενών.

1.5.2.1 Υποκατηγορίες Ξηροφθαλμίας

Υπάρχουν δύο κύριες κλινικές μορφές ξηροφθαλμίας: ο ανεπαρκής τύπος παραγωγής υδατικών δακρύων λόγω της δυσλειτουργίας του δακρυϊκού αδένου (ADDE: Aqueous tear-Deficient Dry Eye) και ο αυξημένος τύπος απώλειας εξάτμισης που είναι και ο πιο συνηθέστερος (EDE: Evaporative Dry Eye). Ο πρώτος τύπος περιλαμβάνει δύο μεγάλες υποκατηγορίες, την ξηροφθαλμία με σύνδρομο Sjogren (SS) και την ξηροφθαλμία χωρίς σύνδρομο Sjogren [differential effect], όπως παρουσιάζονται και στην **Εικόνα 13**. [8].

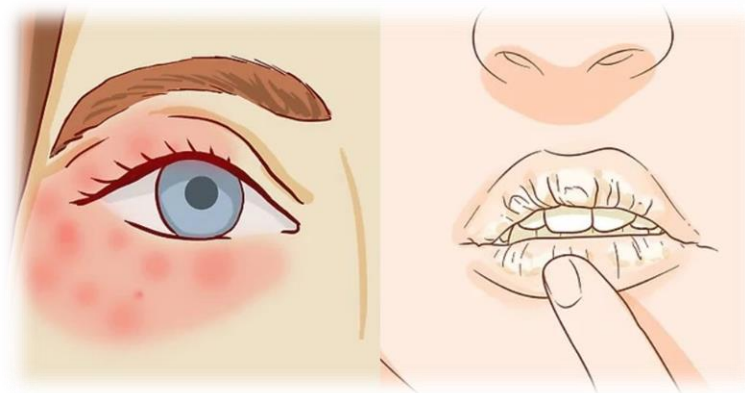


Εικόνα 13. Υποκατηγορίες Ξηροφθαλμίας [i]

Επίσης, να σημειωθεί ότι η οφθαλμική ξηρότητα είναι ένα συνηθισμένο παράπονο ιδίως στους χρήστες φακών επαφής και επιβεβαιώνεται αντικειμενικά μέσω της εξέτασης σχισμής και της δοκιμής Schirmer (= δοκιμή βασικής εκκριτικής), επομένως αυτό συνεπάγεται και μία τρίτη κατηγορία ξηροφθαλμίας [24].

ο **Σύνδρομο Sjögren:**

Το σύνδρομο Sjögren (SS: Sjögren Syndrome), γνωστό και ως αυτοάνοση επιθηλίτιδα, μια κύρια υποκατηγορία ξηρού οφθαλμού με έλλειψη δακρύων (ADDE), είναι ένα χρόνια αυτοάνοσο νόσημα του συνδετικού ιστού που προσβάλλει κατεξοχήν τους εξωκρινείς αδένες (**Εικόνα 14**). Δεδομένου ότι οι κύριοι εκπρόσωποι των εξωκρινών αδένων είναι οι σιελογόνοι και οι δακρυϊκοί αδένες, σε αυτού του είδους την εξωκρινοπάθεια, οι σιελογόνοι και οι δακρυϊκοί αδένες στοχεύονται από μια αυτοάνοση διαδικασία, λόγω της παρουσίας κυκλοφορόντων αντισωμάτων (π.χ. το αντίσωμα αντι-M3), τα οποία στρέφονται κατά των μουσκαρινικών υποδοχέων εντός των αδένων [25] ή λόγω της επίδρασης φλεγμονωδών διαμεσολαβητών, απελευθερώνονται από τους δακρυϊκούς αδένες στα δάκρυα.



Εικόνα 14. Χαρακτηριστικά του συνδρόμου Sjögren [j]

Η κύρια κλινική έκφραση του συνδρόμου είναι η ξηροστομία και η ξηροφθαλμία [26]. Άλλα συχνά κλινικά συμπτώματα αποτελούν η φωτοευασθησία, η ξηρή γλώσσα, εξανθήματα στο δέρμα και η διόγκωση των εξωκρινών αδένων. Ενώ η ακριβής αιτία είναι ασαφής, πιστεύεται ότι περιλαμβάνει συνδυασμό γενετικής και περιβαλλοντικής αιτίας, όπως η έκθεση σε ιό ή σε βακτήρια. Μπορεί να εμφανιστεί ανεξάρτητα από άλλα προβλήματα υγείας (πρωτογενές σύνδρομο Sjögren) ή ως αποτέλεσμα άλλης διαταραχής του συνδετικού ιστού (δευτερογενές σύνδρομο Sjögren). Η φλεγμονή που προκύπτει καταστρέφει σταδιακά τους αδένες. [7].

Το εύρος των συμπτωμάτων που μπορεί να εκδηλώσει ένας ασθενής που νοσεί από το σύνδρομο αυτό, καθώς και από την ομοιότητα μεταξύ των συμπτωμάτων του συνδρόμου αυτού και των υπόλοιπων καταστάσεων καθιστούν τη διάγνωση του συνδρόμου Sjögren αρκετά δύσκολη. Επίσης, οι ασθενείς με συμπτώματα του συνδρόμου προσεγγίζουν διαφορετικές ειδικότητες για θεραπεία, γεγονός που μπορεί να κάνει τη διάγνωση δύσκολη. Η διάγνωση γίνεται με βιοψία αδένων που παράγουν υγρασία και εξετάσεις αίματος για την αναζήτηση συγκεκριμένων αντισωμάτων, επομένως η διάγνωση της ασθένειας καθίσταται δύσκολη. Στη βιοψία συναντάται συνήθως η ύπαρξη λεμφοκυττάρων στους αδένες.

Εφόσον το σύνδρομο Sjögren είναι μία υποκατηγορία της ξηροφθαλμίας, η φλεγμονή θα αποτελεί και σε αυτή την ασθένεια χαρακτηριστικό-κλειδί, άρα οι περισσότερες μελέτες βιοδεικτών για αυτή τη νόσο επικεντρώνονται στην ανάλυση των φλεγμονωδών μορίων.

- **Μη σύνδρομο Sjögren (NSDE: Non-Sjögren Dry Eye).**

Η ξηροφθαλμία μη-Sjögren, είναι ένας όρος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κάλυψη μιας ομάδας τοπικών και συστημικών διαταραχών, εξαιρουμένου του συνδρόμου Sjögren που προκαλεί τα συμπτώματα και τα σημάδια της ξηροφθαλμίας. Η κατάσταση μπορεί να οριστεί ως μια διαταραχή της οφθαλμικής επιφάνειας, που περιλαμβάνει κυρίως, χωρίς να περιορίζεται στη διαπολιτική ζώνη, λόγω της ανεπάρκειας των δακρυϊκών συστατικών ή της κατανομής τους. Εμφανίζεται απουσία της συστηματικής αυτοάνοσης νόσου που χαρακτηρίζει το σύνδρομο Sjögren. Οι διάφορες μορφές έχουν κοινές βλάβες μεταξύ των οφθαλμικών επιφανειακών οφθαλμών.

Η ξηροφθαλμία μη-Sjögren περιλαμβάνει διαταραχές που οφείλονται σε ελλιπή συστατικά του δακρυϊκού υγρού όπως λιπίδια, βλεννίνες και πρωτεΐνες, καθώς και διαταραχές κατά το άνοιγμα και κλείσιμο του οφθαλμού και της τοποθέτησης του καπακιού, απουσία χαρακτηριστικών Sjögren. Μπορεί να προκληθεί από ανεπάρκεια οποιουδήποτε από τα κύρια συστατικά των δακρύων [27].

- **Ξηροφθαλμία από Φακούς Επαφής:**

Οι αλλαγές στα επίπεδα των πρωτεϊνών που περιέχονται στο δακρυϊκό υγρό μπορούν να διαταράξουν την προστατευτική φύση και τη δυναμική του δακρυϊκού φιλμ. Πολλές από τις μακροπρόθεσμες παρενέργειες της χρήσης φακών επαφής αποτελεί το σύνδρομο ξηροφθαλμίας και συνδέονται με αλλαγές στη σύσταση του δακρυϊκού φιλμ. Η ξηροφθαλμία που προκαλείται από φακούς επαφής συμβαίνει, διότι το λεπτό στρώμα υλικού φακού επαφής στον αμφιβληστροειδή χιτώνα περιορίζει τη ροή οξυγόνου προς τον οφθαλμό. Χωρίς σταθερή ροή οξυγόνου, τα μάτια δεν αναπτύσσουν εύκολα φυσικά

δάκρυα. Εκτός από τα τυπικά συμπτώματα ξηροφθαλμίας όπως η δυσφορία, η θολή όραση, το κάψιμο ή η φωτοφοβία, είναι πιθανό να οδηγήσει σε λοίμωξη του κερατοειδούς και ακόμη και σε μη αναστρέψιμη βλάβη στην οφθαλμική επιφάνεια [28].

Αρκετές μελέτες έδειξαν σταθερή μεταβολή στα πρωτεϊνικά προφίλ των δακρύων σε φορείς φακών επαφής. Έχει αποδειχθεί ότι η φθορά των μαλακών φακών επαφής μεταβάλλει τα προφίλ δακρύων διαφορετικά από ότι σε άτομα-μη χρήστες φακών επαφής [29]. Επίσης, σημαντικό ρόλο κατέχει και η φθορά των φακών επαφής, καθώς μπορεί να μεταβάλλει την παραγωγή ορισμένων φλεγμονωδών μεταβολιτών στα δάκρυα. Ύστερα από αξιολόγηση συγκεντρώσεων δακρυϊκού υγρού σε κυτταροκίνες εντός των πρώτων 6 μηνών της φθοράς των φακών επαφής σε νέους χρήστες είτε φακών υδρογέλης σιλικόνης, είτε συμβατικών φακών υδρογέλης, διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων κυτταροκινών, και συγκεκριμένα των IL-6 και IL-8, και στις δύο περιπτώσεις. Ακόμη, ενδιαφέρον παρουσιάζει μία μελέτη σε ασθενείς που αφαίρεσαν τους φακούς επαφής για διάστημα 6 ημερών και η IL-6 ήταν μη ανιχνεύσιμη, ενώ όταν οι ίδιοι ασθενείς χρησιμοποίησαν ξανά τους φακούς επαφής, τα επίπεδα IL-6 αυξήθηκαν στα αρχικά τους επίπεδα εντός 24 ωρών.

Εκτός από τη χρήση διαφορετικών τύπων φακών επαφής, η χρήση υγρού διαλύματος καθαρισμού φακών επαφής διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βελτίωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης δακρύων [30]. Υγρά διαλύματα που περιέχουν το μεταβολίτη ταυρίνη φαίνεται να έχουν ευεργετική επίδραση στην ξηροφθαλμία που προκαλείται από φακούς επαφής [32].

Για όλους τους παραπάνω λόγους, η έρευνα γύρω από τους βιοδείκτες δακρύων αυξάνεται, κυρίως λόγω της δύσκολης διάγνωσης της ασθένειας αυτής, λόγω του γεγονότος ότι σε αυτό το πολυπαραγοντικό σύνδρομο υπάρχει έλλειψη συνάφειας μεταξύ κλινικών και απτών συμπτωμάτων, καθώς και λόγω της ύπαρξης τόσων κλινικών μορφών αυτής της νόσου [33, 34]. Για αυτούς τους λόγους, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εύρεση αντικειμενικών βιοδεικτών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικά εργαλεία για την ανίχνευση της ασθένειας, για αντικειμενική παρακολούθηση της εξέλιξης και της θεραπείας σε κλινικές δοκιμές, αλλά ακόμη και για πρόβλεψη παρενεργειών και αλληλεπιδράσεων φαρμάκων.

1.6 Βιοδείκτες Ξηροφθαλμίας

Η φλεγμονή αποτελεί σύμπτωμα-κλειδί της ξηροφθαλμίας, επομένως οι περισσότερες μελέτες βιοδεικτών για αυτή τη νόσο επικεντρώνονται στην ανάλυση των φλεγμονωδών μορίων, όπως είναι οι κυτταροκίνες/χημειοκίνες. Οι κυτταροκίνες/χημειοκίνες είναι πρωτεΐνες που σχετίζονται με φλεγμονώδεις αντιδράσεις και με το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς οι κυτταροκίνες παράγονται από τα λευκοκύτταρα, ενώ οι χημειοκίνες είναι εκείνες που προσελκύουν τα λευκοκύτταρα στο σημείο της φλεγμονής. Ακόμη, έρευνες γίνονται και σε άλλα μόρια, όπως για παράδειγμα σε αυξητικούς παράγοντες, βλεννίνες, νευροδιαβιβαστές και λιπίδια. Πολλές από αυτές τις μελέτες έχουν δείξει διαφορές σε πολλά μόρια δακρύων σε ασθενείς που πάσχουν από ξηροφθαλμία σε σύγκριση με υγιή άτομα ή μεταξύ των διαφορετικών τύπων της ξηροφθαλμίας. Επομένως, η χρήση δακρύων ως πηγή για μελέτη βιοδεικτών, συμπεριλαμβανομένων ακόμη και των μη-οφθαλμικών παθήσεων [8, 35, 36], αλλά κυρίως για το σύνδρομο της ξηροφθαλμίας έχει προκαλέσει αυξημένο ενδιαφέρον τόσο για την μελέτη αυτής

της ασθένειας σε κλινικό επίπεδο, όσο και για την έγκαιρη διάγνωση της ασθένειας, την παρακολούθηση και την εξατομικευμένη θεραπεία της [36, 37].

Ύστερα από μελέτες, έχουν προταθεί ως βιοδείκτες για την ξηροφθαλμία, εκτός από τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με φλεγμονώδεις αντιδράσεις και διάφορες πρωτεΐνες του δακρυϊκού υγρού, όπως η λυσοζύμη και η λακτοφερρίνη. Παρακάτω έχουν κατασκευαστεί τρεις συγκεντρωτικοί πίνακες που απεικονίζουν όλους τους τρέχοντες πιθανούς βιοδείκτες των δακρύων, ανάλογα το μόριο, που έχουν προταθεί συγκεκριμένα για την ασθένεια της ξηροφθαλμίας (**Πίνακες 1-3**). Εκτός από τις πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν λοιπόν, έχουν αναγνωριστεί και ορισμένοι μεταβολίτες ως πιθανοί βιοδείκτες της ξηροφθαλμίας με τη διαφορά ότι ο αριθμός των αναγνωρισμένων μεταβολιτών είναι πιο περιορισμένος και έχουν πραγματοποιηθεί λίγες μελέτες σχετικά με την ανάλυση δακρυϊκών μεταβολιτών στην ξηροφθαλμία. Τέτοιοι μεταβολίτες που περιέχουν τα δάκρυα είναι οι εξής: χοληστερόλη, γλυκόζη, χολίνη, ακετυλοχολίνη, κρεατινίνη, αργινίνη, φαινυλαλανίνη, σεροτονίνη και ουρία. Μελέτες που έχουν γίνει γύρω από τους παραπάνω μεταβολίτες απέδειξαν ότι σε σύγκριση με υγιή άτομα, υπήρχαν διαφορές στη δακρυϊκή σύσταση των ατόμων που έπασχαν από ξηροφθαλμία.

Έχει αποδειχθεί ότι οι διαφορετικοί κλινικοί φαινότυποι των ασθενών με ξηροφθαλμία σχετίζονται με συγκεκριμένα πρότυπα δακρύων και ειδικά η ανεπάρκεια της υδατικής φάσης του δακρυϊκού φιλμ φαίνεται να επηρεάζει έντονα τα πρότυπα έκφρασης πολλών πρωτεϊνών. Η επιτυχής διάκριση μεταξύ των υποομάδων ξηροφθαλμίας και των υγιών ατόμων από βιοδείκτες θα μπορούσε να οδηγήσει τόσο σε νέους καινοτόμους στόχους φαρμάκων, όσο και σε ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο για την ξηροφθαλμία, το οποίο θα μπορεί να οδηγήσει σε βελτιστοποιημένες στρατηγικές θεραπείας [7].

Πίνακας 1. Πρωτεΐνες ως τρέχοντες πιθανοί βιοδείκτες στα δάκρυα για την ασθένεια της ξηροφθαλμίας.

ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ	ΜΟΡΙΑ	ΠΗΓΕΣ
Πρωτεΐνες	Λυσοζύμη, λακτοφερρίνη	[38-40]
	LPRR4	[41-43]
	Calgranulin A/S100 A8	[41, 43-45]
	LPRR3, PRP 4 που σχετίζεται με ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, α-1 αντιτροψίνη α-ενολάση, α-1 όξινο γλυκοπρωτεΐνη 1	[41]
	S100 A4, S100 A11 (calcizzarin)	[44]
	S100 A9/calgranulin B	[44, 45]
	LCN-1	[45]
	Mammaglobin B, lipophilin A, B2M	[43]
	S100A6, annexin A1 annexin A11, CST4, PLAA	[46]
	Τρανσφερρίνη,	[47]
	Defensin-1, clusterin, lactotransferrin	[48]
	Καθεψίνη S	[49]
	Anti-SS-A, anti-SS-B, anti-α-fodrin αντισώματα	[50-52]
	Μαλατική αφυδρογονάση (MDH) 2	[53]
	Palate lung nasal clone—PLUNC	[54]

Πίνακας 2. Κυτταροκίνες/Χημειοκίνες ως τρέχοντες πιθανοί βιοδείκτες στα δάκρυα για την ασθένεια της ξηροφθαλμίας.

ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ	ΜΟΡΙΑ	ΠΗΓΕΣ
Κυτταροκίνες/ Χημειοκίνες	IL-1	[55-59]
	IL-2, IL-5	[60]
	IL-6	[57-66]
	IL-8/CXCL8	[57-58, 60, 63, 66-67]
	IL-10	[60, 64]
	IL-12	[63, 59]
	IL-16, IL-33, GCSF, MCP1/CCL2, MIP1d (CCL15), ENA-78/CXCL5, sILR1, sIL-6R, sgp. sEGFR, sTNFR	[59]
	IL-17A	[59, 64, 68-69]
	IL-21	[70]
	IL-22	[69]
	IL-1RA	[66-67, 71]
	CXCL9/MIG, CXCL11/I-TAC	[72]
	CXCL10/IP-10	[71-72]
	MIP-1β/CCL4	[73]
	RANTES/CCL5	[63, 73]
	EGF	[55, 63, 65-66, 71, 74]
	TNF-α	[57-58, 60, 63-64, 72]
	INF-γ	[57, 60, 64]

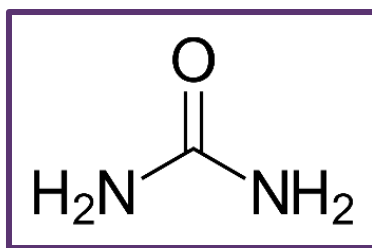
	MMP-9	[58, 65, 66,75-78]
	MIP1- α /CCL3	[63, 73]
	VEGF	[71]
	Φρακταλκίνη	[59, 71]

Πίνακας 3. Άλλα μόρια ως τρέχοντες πιθανοί βιοδείκτες στα δάκρυα για την ασθένεια της ξηροφθαλμίας.

ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ	ΜΟΡΙΑ	ΠΗΓΕΣ
Βλεννίνες	(MUC)5AC	[79]
Νευροδιαβιβαστές	NGF, CGRP, NPY	[80]
	Serotonin	[81]
Λιπίδια	ΟΑΗFA, λυσοφωσφολιπίδια, PUFA που περιέχουν είδη διακυλογλυκεριδίων	[82-83]
	HEL	[84]
	HNE, MDA	[85]
Μεταβολίτες	Χοληστερόλη, γλυκόζη, χολίνη, ακετυλοχολίνη, κρεατινίνη, αργινίνη, φαινυλαλανίνη, ουρία	[86]

1.6.1 Ουρία

Η ουρία είναι μία οργανική ένωση, η οποία βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος σε τιμές αναφοράς 10-50 mg/dL. Αποτελεί μεταβολίτη αζωτούχων ενώσεων, καθώς θεωρείται το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των αζωτούχων ενώσεων που παράγονται στον κύκλο της ουρίας. Εκκρίνεται από τα νεφρά στο 90%, ενώ το υπόλοιπο μέρος της παράγεται μέσω του ιδρώτα και της εντερικής έκκρισης. Στη δερματολογία, ωστόσο, η ουρία δεν είναι γνωστή μόνο ως μεταβολικό προϊόν «αποβλήτων». Παρέχει ένα υδρόφιλο διαμέρισμα με σύνδεση στο νερό, το οποίο εξασφαλίζει την οργάνωση των διπολικών λιπιδίων στη μεσοκυτταρική μήτρα λιπιδίων, με αποτέλεσμα σχηματισμό μεμβράνης [87, 88]. Η ίδια η ουρία δεν έχει επιφανειακή δραστηριότητα. Ωστόσο, μπορεί να επηρεάσει την επιφάνεια των μορίων δεσμεύοντας τις επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες.



Σχήμα 1. Ουρία

Μια ανεπάρκεια στην ουρία μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες παθολογικές δερματικές διαταραχές. Κατά την κερατοποίηση των κυττάρων, η ουρία σχηματίζεται με αποικοδόμηση συγκεκριμένων αμινοξέων και ειδικότερα του αμινοξέος αργινίνη. Ιδιαίτερα οι συνθήκες κερατοποίησης συνοδεύονται από έλλειψη αργινίνης. Αυτό οδηγεί σε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης ουρίας με αποτέλεσμα να μειώνεται η φυσική λειτουργία κατακράτησης υγρασίας του δέρματος. Έχει βρεθεί ότι σε κλινικά σχετικά ξηρό δέρμα, η συγκέντρωση ουρίας ήταν περίπου 50% χαμηλότερη από ό, τι στο υγιές δέρμα [89].

Είναι αξιοσημείωτο ότι παρόλο που ο συγκεκριμένος μεταβολίτης είναι δεδομένο ότι αποτελεί συστατικό του δακρυϊκού φιλμ από το 1930 [90, 91], η φυσιολογική ή παθολογική λειτουργία του δεν έχει μελετηθεί μέχρι στιγμής. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η ουρία βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος σε τιμές αναφοράς 10-50 mg/dL, ενώ έρευνες έχουν αποδείξει

ότι η συγκέντρωση της ουρίας στο δάκρυ είναι ίση με τη συγκέντρωση της στο πλάσμα του αίματος [92]. Ωστόσο, η ουρία στο δακρυϊκό φιλμ θα μπορούσε να έχει παρόμοια λειτουργία με αυτήν που έχει στο δέρμα, δηλαδή να συμβάλει στην οργάνωση των λιπιδίων και κατά συνέπεια στον σχηματισμό της λιπιδικής στιβάδας στο φιλμ δακρύων. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι τα λιπίδια των δακρυϊκών μεμβρανών διαφέρουν σημαντικά από τα λιπίδια του δέρματος, καθώς αποτελούνται κυρίως από λιπίδια Meibomian αδένα. Παρ'όλα αυτά, είναι πολύ αναμενόμενη μια λειτουργία ουρίας στο σχηματισμό στρώματος λιπιδίων με δακρυϊκή μεμβράνη, καθώς η ουρία παρέχει από την υγροσκοπική ιδιότητά της ένα υδρόφιλο διαμέρισμα που οδηγεί στην οργάνωση της μεσοκυττάριας μήτρας λιπιδίων και έτσι στον σχηματισμό μεμβράνης.

Μία μειωμένη συγκέντρωση ουρίας θα οδηγούσε σε αποδιοργάνωση των λιπιδίων του δακρυϊκού φιλμ, η επιφανειακή τάση θα μειωνόταν και το φιλμ δακρύων θα αρχίσει να αποσυντίθεται, με αποτέλεσμα ξηρές κηλίδες. Με δέσμευση σε επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες όπως, για παράδειγμα, επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες Β και C που έχουν αποδειχθεί ότι εμφανίζονται στο δακρυϊκό φιλμ [93], η ουρία μπορεί να αλλάξει τη χωρική δομή των επιφανειοδραστικών πρωτεϊνών με τον μεταβαλλόμενο χαρακτήρα της [94]. Κατά συνέπεια, μπορούν να χάσουν την ικανότητά τους να μειώσουν την επιφανειακή τάση και το φιλμ δακρύων μπορεί να αρχίσει να σχίζεται, προκαλώντας ξηρά σημεία.

Καταλήγουμε επομένως στο συμπέρασμα ότι είτε η αυξημένη συγκέντρωση ουρίας, όπως βρίσκεται σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, είτε η μείωση της ουρίας μπορεί να είναι η αιτία για το σύνδρομο της ξηροφθαλμίας. Η ομοίωση της ουρίας φαίνεται να είναι πολύ σημαντική για τις φυσικοχημικές ιδιότητες του δακρυϊκού φιλμ και πρέπει να ελέγχεται αυστηρά. Επομένως, η συγκέντρωση ουρίας στο δακρυϊκό υγρό μπορεί να είναι μια χρήσιμη πρόσθετη διαγνωστική παράμετρος για την ξηροφθαλμία, εκτός από τα καθιερωμένα διαγνωστικά εργαλεία όπως είναι

το Schirmer test, το BUT και το OSDI. Ωστόσο, η παρουσία μεταβολικών ασθενειών που επηρεάζουν τη συγκέντρωση της ουρίας στο αίμα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη.

1.7 Χαλκός

1.7.1 Χημεία του Χαλκού

Ο χαλκός είναι το πρώτο από τα μέταλλα που χρησιμοποίησε ο άνθρωπος για την κατασκευή σκευών, εργαλείων και όπλων. Εκτιμάται ότι έγινε γνωστός περίπου το 9.000 π.Χ., πιθανόν επειδή απαντά ως αυτοφυής και δεν απαιτεί μεταλλουργική διαδικασία για την παρασκευή του σε καθαρή μορφή. Χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα την Εποχή του Χαλκού, κυρίως ως κράμα με ψευδάργυρο (ορείχαλκος) και με κασσίτερο (μπρούτζος) [95].

Τα κυριότερα υλικά από όπου εξάγεται ο χαλκός είναι χαλκοπυρίτης, CuFeS_2 , και ο χαλκοσίνης, Cu_2S . Άλλα ορυκτά του χαλκού είναι ο βορνίτης, Cu_3FeS_3 , ο κυπρίτης, Cu_2O , ο μαλαχίτης, $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$, ο αζουρίτης, $2\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$, ο ατακαμίτης, $\text{CuCl}_2 \cdot 3\text{CuO}$, η χρυσόκολλα, $\text{CuSiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και ο μελακονίτης, CuO . Αυτοφυής χαλκός υπάρχει στα Ουράλια και τον Καναδά.

Ο χαλκός συναντάται σε ίχνη σε ζωντανούς οργανισμούς. Στον άνθρωπο βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο ήπαρ, στον εγκέφαλο και στους πνεύμονες και σε μειωμένες ποσότητες στους νεφρούς. Ακόμη, υπάρχει σε χρωστικές ουσίες του οφθαλμού που σχετίζονται με τη μελανίνη [96].

Όσον αφορά τις φυσικοχημικές του ιδιότητες, ο χαλκός είναι μέταλλο με ατομικό αριθμό 29, ατομικό βάρος 63,546 g/mol, ανήκει στην 11^η ομάδα του Περιοδικού Πίνακα, έχει

ηλεκτρονική απεικόνιση $3d^{10} 4s^1$ και έχει δύο σταθερά ισότοπα, το ^{63}Cu και το ^{65}Cu . Ακόμη, έχει θερμοκρασία τήξης $1084,6^\circ\text{C}$ και θερμοκρασία βρασμού 2567°C . Το χρώμα του είναι κοκκινωπό και είναι όλκιμος και ελατός. Αποτελεί μαλακό μέταλλο με υψηλή θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα, μετά τον άργυρο.

Όταν ο χαλκός εκτεθεί στον υγρό αέρα καλύπτεται επιφανειακά από το βασικό ανθρακικό χαλκό $\text{CuCO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ο οποίος έχει πράσινο χρώμα. Εάν η ατμόσφαιρα περιέχει και SO_2 σχηματίζεται επίσης και πράσινο βασικό θειικό άλας του τύπου $\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2$. Τα δύο αυτά άλατα σχηματίζουν επιφανειακό επίστρωμα στο μεταλλικό χαλκό, το οποίο παρεμποδίζει την παραπέρα προσβολή. Τα χάλκινα αγάλματα στις πόλεις καλύπτονται με τα στρώματα αυτά.

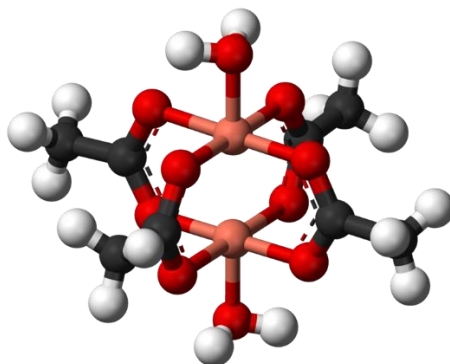
Γενικά ο χαλκός απαντάται στις οξειδωτικές καταστάσεις +3,+2,+1. Η σπουδαιότερη οξειδωτική κατάσταση για το χαλκό είναι η +2 που αντιστοιχεί σε ηλεκτρονική απεικόνιση της εξώτατης στιβάδας του ιόντος $3d^9$. Έγχρωμα ιόντα δίνουν μόνο οι οξειδωτικές καταστάσεις +2 και +3 οι οποίες αντιστοιχούν σε χημεία στοιχείων μετάπτωσης με δομή $3d^9$ και $3d^8$ αντίστοιχα. Αυτό συμβαίνει γιατί σε αυτές τις δομές είναι δυνατή d-d ηλεκτρονική μετάπτωση.

Σημαντικές ενώσεις του Cu^{+2} είναι το οξείδιο του χαλκού CuO , το υδροξείδιο του χαλκού $\text{Cu}(\text{OH})_2$, ο θειικός χαλκός CuSO_4 , ο νιτρικός χαλκός ένυδρος και άνυδρος $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Από τα αλογονίδια του Cu^{+2} είναι γνωστά τα εξής: ο διφθοριούχος χαλκός CuF_2 , ο διχλωριούχος χαλκός CuCl_2 και ο διβρωμιούχος χαλκός CuBr_2 . Ο διωδιούχος χαλκός δεν μπορεί να παρασκευαστεί καθώς ιωδιόντα ανάγονται από τον Cu^{+2} .

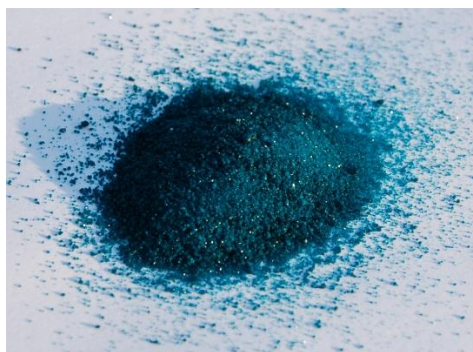


1.7.1.1 Άλας Οξικού Χαλκού

Ο οξικός χαλκός αποτελεί χαρακτηριστικό άλας του Cu^{+2} όπου παρατηρείται σχηματισμός διπυρηνικής ένωσης στην οποία παρουσιάζονται μαγνητικές ανωμαλίες. Συναντάται ως γαλαζοπράσινο κρυσταλλικό στερεό (**Εικόνα 16**) και από το παρελθόν είναι γνωστό ως μυκητοκτόνο και προληπτικό ούδιο. Το άλας αποδίδεται με τον τύπο $[\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και η δομή του απεικονίζεται στην εικόνα 16. Επειδή υπάρχει αλληλεπίδραση του ενός ατόμου του χαλκού με το άλλο προκαλείται μείωση της μαγνητικής ροπής της ένωσης από αμοιβαία εξουδετέρωση των spin των ατόμων του χαλκού, $\mu = 1,4 \text{ BM}$ κατ' άτομο χαλκού στους 25°C . Οι συνηθισμένες ενώσεις του χαλκού παρουσιάζουν χαρακτηριστική τιμή μαγνητικής ροπής $1,9 \text{ BM}$ και οφείλεται στην ύπαρξη ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου.



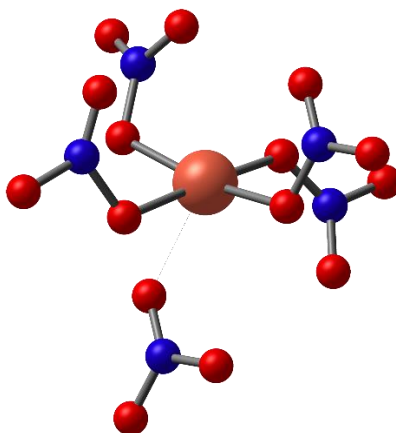
Εικόνα 15. Δομή $[\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$



Εικόνα 16. Κρύσταλλοι $[\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1.7.1.2 Άλας Νιτρικού Χαλκού

Ο νιτρικός χαλκός είναι μια ανόργανη ένωση που σχηματίζει ένα μπλε κρυσταλλικό στερεό και αποδίδεται με τον τύπο $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ [97]. Ο νιτρικός χαλκός εμφανίζεται σε ένυδρη και άνυδρη μορφή. Συγκεκριμένα, εμφανίζεται ως πέντε διαφορετικά ένυδρα άλατα, εκ των οποίων τα πιο συνηθισμένα είναι το ημιπενταϋδρικό και το τριένυδρο. Το τριένυδρο άλας αποδίδεται με τον τύπο $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Εικόνα 17) και αποτελεί ένα μπλε κρυσταλλικό στερεό, όπως φαίνεται στην Εικόνα 18.



Εικόνα 17. Δομή $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

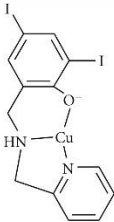
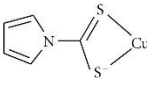

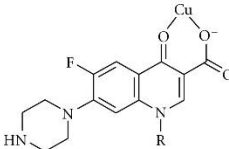
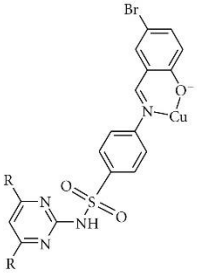


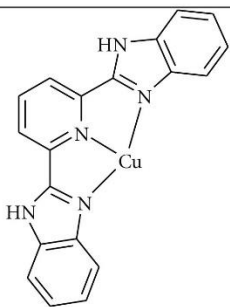
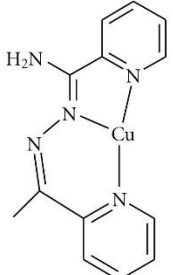
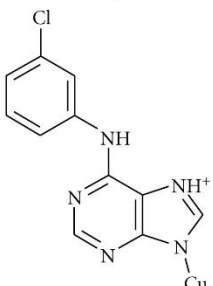
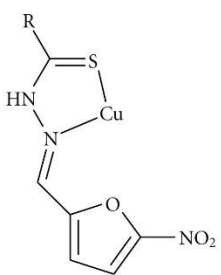
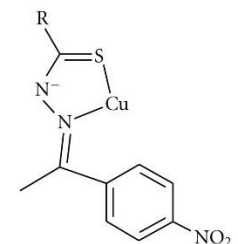
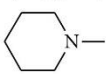
Εικόνα 18. Κρύσταλλοι $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

1.7.2 Σύμπλοκες Ενώσεις του Χαλκού

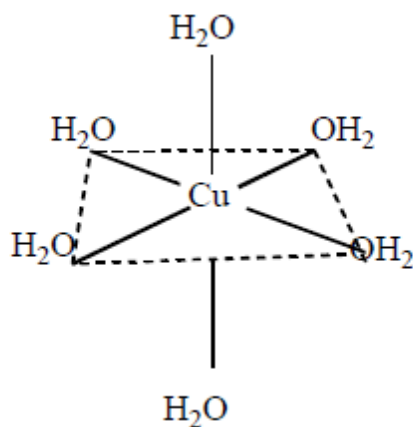
Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πάρα πολλές σύμπλοκες ενώσεις του χαλκού με φάρμακα ή με άλλες ενώσεις που εμφανίζουν αξιοσημείωτη βιολογική δράση, ορισμένα εκ των οποίων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4** [98]. Τα σύμπλοκα του χαλκού είναι γνωστά τις αντικαρκινικές, αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές τους δράσεις. Ωστόσο, είναι γνωστά για τη συνεργιστική τους δράση με άλλα φάρμακα για φαρμακευτική εφαρμογή, όπως για παράδειγμα, αντιφλεγμονώδη φάρμακα, φάρμακα με ραδιοευαισθητοποιητικές ικανότητες για τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του λάρυγγα Hep2, μιμητικές ικανότητες ενζύμων, κλπ. [96].

Πίνακας 4. Σύμπλοκα του Cu (II) που εμφανίζουν βιολογική δράση [k].

Ligand	Coordination mode	Type of complex a	Biological activity
2,4-diiodo-6-(pyridine-2-yl methylamino) methyl phenolate		(L-H)CuCl or [L(L-H)Cu] ⁺	Proteasome inhibitor, apoptosis inducer
Pyrolidine dithiocarbamate		L ₂ Cu	Proteasome inhibitor, apoptosis inducer
Ciproflaxin (R = ) Enoxacin (R = C ₂ H ₅ -)		L ₂ Cu	Antibacterial
[(5-bromo-2-hydroxyphenyl)methylidene] amino-N-(pyrimidin-2-yl)benzene sulfonamides	 R = H-, CH ₃ -	(L-H) ₂ Cu	Antibacterial

Ligand	Coordination mode	Type of complex a	Biological activity
2,6-bis (benzimidazo-2-yl) pyridine		LCuCl ₂ or [LCu(H ₂ O) ₂ (NO ₃) ₂] ⁺	Protease mimetic
Pyridyl-2-carboxamidrazone		LCuCl ₂	Anticancer
6-(2-chlorobenzyl amino) purine		[(LH) ₂ CuCl ₃] ⁺	Potent anticancer, inhibiting cell growth of various types of cancer
5-nitrofuran-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone or thiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone	 R = alkylamino	L ₂ CuCl ₂	Antiamoebic
4-nitroacetophenone thiosemicarbazone	 R = CH ₃ NH-, (CH ₃) ₂ N-, 	L ₂ Cu	Antitrypanosomal

Τα διάφορα σύμπλοκα του χαλκού μπορούν να παρασκευαστούν με αντικατάσταση των μορίων νερού του ένυδρου ιόντος $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, από διάφορους περιφερειακούς υποκαταστάτες. Οι κοινοί αριθμοί σύνταξης του $\text{Cu}(\text{II})$ είναι 4, 5 και 6 αλλά οι κανονικές γεωμετρίες είναι σπάνιες και η διάκριση μεταξύ τετραγωνικών και τετραγωνικώς παραμορφωμένων οκταεδρικών συμπλόκων γενικά είναι ασαφής. Η γεωμετρία του $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ είναι οκταεδρική με τα μήκη των τεσσάρων δεσμών Cu-O που βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με τον Cu να είναι ίσα μεταξύ τους, και μικρότερα από τα μήκη Cu-O των δεσμών που είναι κάθετοι σε αυτό το επίπεδο (αξονικοί δεσμοί) και που είναι επίσης ίσοι μεταξύ τους. Έτσι το ιόν έχει γεωμετρία παραμορφωμένου οκταέδρου 2 όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2** [99].



Σχήμα 2. Δομή του $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$

Το γεγονός αυτό οφείλεται στην επίδραση Jahn-Teller, η οποία προκύπτει από την ανομοιόμορφη κατάληψη του ζεύγους e_g τροχιακών από τα 3 ηλεκτρόνια, με αποτέλεσμα άλλοτε την συμπίεση και άλλοτε την επιμήκυνση του οκταέδρου. Ο χαλκός δίνει με ευκολία μπλε ουδέτερα σύμπλοκα με αμινοξέα.

Κεφάλαιο 2^ο

Σκοπός Μεταπτυχιακής Διατριβής

2. Σκοπός Μεταπτυχιακής Διατριβής:

2.1 Σκοπός Μελέτης

Στον τομέα της προγνωστικής, προληπτικής και εξατομικευμένης ιατρικής, είναι αναγκαίος και επιθυμητός ο εντοπισμός νέων και αξιόπιστων τρόπων πρόβλεψης και διάγνωσης ασθενειών και νόσων, καθώς και η παρακολούθηση της πορείας της νόσου και της ανταπόκρισης των ασθενών στους θεραπευτικούς παράγοντες. Μόνο την τελευταία δεκαετία, η ευαισθησία των τεχνολογιών σχηματισμού προφίλ ασθενειών έχει υποστεί τεράστιες βελτιώσεις στην ευαισθησία ανίχνευσης, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων, ακόμη και μικρής ποσότητας, όπως για παράδειγμα σωματικών υγρών που προηγουμένως ήταν δύσκολο να προσδιοριστούν. Τα σωματικά υγρά σε σύγκριση με τους ιστούς, παρέχουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως χαμηλότερο κόστος και ευκολότερη συλλογή δειγμάτων. Ως αποτέλεσμα, η ανάλυση των σωματικών υγρών του ανθρώπινου σώματος έχει γίνει μια από τις πιο ελπιδοφόρες προσεγγίσεις στην ανακάλυψη βιοδεικτών για τις ανθρώπινες ασθένειες.

Κατά συνέπεια, η έρευνα άρχισε να επικεντρώνεται γύρω από το δακρυϊκό υγρό, κυρίως στον τομέα της οφθαλμικής επιφανειακής νόσου. Καθώς τα δάκρυα είναι πιο προσιτά και λιγότερο πολύπλοκα υγρά, σε αντίθεση με άλλα σωματικά υγρά, και η δειγματοληψία είναι πολύ λιγότερο επεμβατική, η έρευνα αρχίζει να στοχεύει στον τρόπο με τον οποίο οι ασθένειες επηρεάζουν την πρωτεϊμική, λιπιδική και μεταβολική σύνθεση του δακρυϊκού φιλμ. Με τον καθορισμό των συνθετικών αλλαγών στα προφίλ δακρύων μπορούν να εντοπιστούν κρίσιμες οδοί στην εξέλιξη της νόσου, επιτρέποντας μία πιο προγνωστική και εξατομικευμένη θεραπεία ασθενών.

Μία από τις πιο συχνές οφθαλμικές επιφανειακές παθήσεις είναι το σύνδρομο της ξηροφθαλμίας, το οποίο αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας. Στατιστικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των ασθενών που πάσχουν από ξηροφθαλμία αυξάνεται ραγδαία και απασχολεί τόσο τους οφθαλμιάτρους όσο και τα άτομα που ταλαιπωρούνται από αυτού του είδους οφθαλμικής διαταραχής. Το 25% των ασθενών που πραγματοποιούν οφθαλμολογική εξέταση πάσχουν από κάποιας μορφής ξηροφθαλμία. Πιο συγκεκριμένα, στις Ηνωμένες Πολιτείες, περισσότερο από το 6% των ατόμων άνω των 40 ετών υποφέρουν από ξηροφθαλμία, με τον αριθμό αυτό να αυξάνεται έως και 15% σε άτομα άνω των 60 ετών, ενώ δεν είναι μικρότερο το ποσοστό των νεότερων που φαίνεται να πάσχουν από ξηροσφθαλμία.

Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας διατριβής αποτελεί η ανίχνευση και ο προσδιορισμός βιοδεικτών και συμπλόκων ενώσεών τους σε σωματικά υγρά, και πιο συγκεκριμένα στο δακρυϊκό υγρό, κυρίως για το πεδίο της ασθένειας των οφθαλμικών παθήσεων. Συνεπώς, αυτή η Διπλωματική Εργασία θα παρέχει μία επισκόπηση της ανίχνευσης και του προσδιορισμού της ουρίας και των συμπλόκων ενώσεών της στο δακρυϊκό υγρό για την ανίχνευση της ξηροφθαλμίας. Για το λόγο αυτό, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν στο εργαστήριο Εφαρμοσμένης Βιοανόργανης Χημείας δύο νέες ενώσεις του δισθενή χαλκού με την ουρία και αξιολογήθηκαν μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών και χρωματογραφικών αναλύσεων.

2.2 Διαδικασία και Προσέγγιση της Μελέτης

Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση και η αξιολόγηση δύο νέων συμπλόκων ενώσεων του Cu (II) με τον μεταβολίτη ουρία, με τους εξής τύπους: $Cu_2(CH_3COO)_4U_2$ (**1**) και $Cu(NO_3)_2U_4$ (**2**), ($U = \text{ουρία}$). Τα σύμπλοκα αυτά έχουν ως στόχο να αποτελέσουν διαγνωστικούς βιοδείκτες για την ανίχνευση της ξηροφθαλμίας μέσω του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού της ουρίας κατά τη χρωματογραφική ανάλυση.

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελεί η ανίχνευση και ο προσδιορισμός της ουρίας και των συμπλόκων ενώσεων της στο δακρυϊκό υγρό για την ανίχνευση ασθενειών της οφθαλμικής επιφάνειας και συγκεκριμένα της ξηροφθαλμίας. Η ουρία, όμως, ως οργανικό μόριο δεν απορροφά στο ορατό και δε φθορίζει, όπως και το σύνολο σχεδόν όλων των μεταβολιτών. Επομένως, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση η ύπαρξη ενός μετάλλου. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν άλατα του οξικού και του νιτρικού χαλκού, τα οποία συμπλοκοποιήθηκαν με την ουρία και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες μετρήσεις.

Ακολουθούν οι πειραματικές πορείες σύνθεσης των ενώσεων $Cu_2(CH_3COO)_4U_2$ (**1**) και $Cu(NO_3)_2U_4$ (**2**) και ο χαρακτηρισμός τους μέσω στοιχειακής ανάλυσης, κρυσταλλογραφίας, μαγνητικών μετρήσεων, διαφορικής θερμικής ανάλυσης, θερμοβαρυμετρίας, θερμιδομετρίας διαφορικής σάρωσης και φασματοσκοπικών τεχνικών. Τέλος, παρατίθενται οι χρωματογραφικές αναλύσεις των συμπλόκων ενώσεων $Cu_2(CH_3COO)_4U_2$ (**1**) και $Cu(NO_3)_2U_4$ (**2**) για τον προσδιορισμό της ουρίας στο δάκρυ και την αξιολόγηση αυτών των αποτελεσμάτων.

Κεφάλαιο 3^ο

Πειραματικό Μέρος

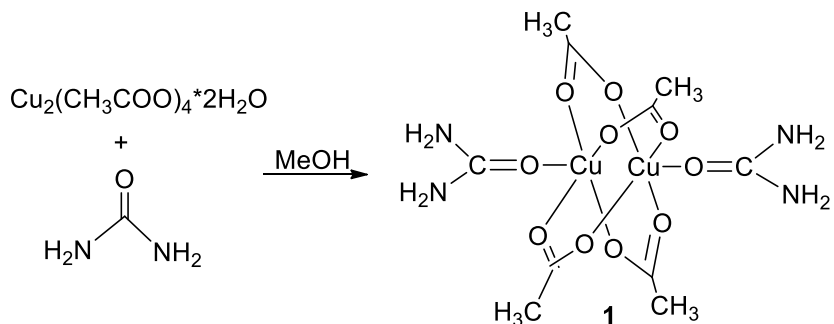
3. Πειραματικό Μέρος

3.1 Συνθετικές Πορείες

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση δύο συμπλόκων ενώσεων του Cu (II), οι οποίες φέρουν τους υποκαταστάτες ουρία (U= ουρία) και το άλας οξικού Cu (II) ($[\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), καθώς και άλας νιτρικού Cu (II) ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) για τις ενώσεις **1** και **2**, αντίστοιχα.

Η ένωση **1** παρασκευάστηκε από την αντίδραση οξικού χαλκού (II) ($\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) με ουρία ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) σε διάλυμα μεθανόλης με τελικό μοριακό τύπο $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**). Η ένωση **2** σχηματίστηκε σε υψηλότερη απόδοση με αναρροή νιτρικού χαλκού (II) ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) με ουρία ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) σε διάλυμα μεθανόλης-ακετονιτριλίου με τελικό μοριακό τύπο $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**). Οι κρύσταλλοι των **1** και **2** αναπτύχθηκαν από τα διηθήματα μεθανόλης για το σύμπλοκο **1** και μεθανόλης-ακετονιτριλίου για το σύμπλοκο **2**. Παρακάτω, ακολουθούν αναλυτικά οι πειραματικές πορείες και οι αντιδράσεις που διεξάχθηκαν για την παρασκευή των συμπλόκων ενώσεων.

3.1.1 Σύνθεση της Σύμπλοκης Ένωσης 1

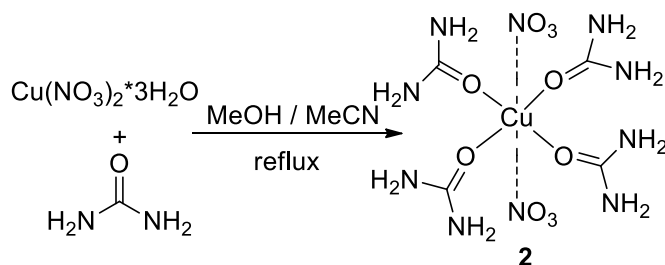


Σχήμα 3. Σύνθεση του συμπλόκου 1

Σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν 0.5 mmol (0.199 gr) $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 1 mmol (0.060 gr) ουρίας σε όγκο 15 mL MeOH. Στη συνέχεια, το ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα για ανάδευση του διαλύματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 min. έως ότου διαλύθηκαν τα στερεά. Τέλος, το διαυγές διάλυμα διηθήθηκε και το διήθημα που προέκυψε αφέθηκε σε κωνική φιάλη των 50 mL overnight. Έπειτα από 4 ημέρες παρατηρήθηκε η δημιουργία πράσινων κρυστάλλων, κατάλληλων για ανάλυση περίθλασης ακτινών-X μονοκρυστάλλου.

Απόδοση Αντίδρασης	60%
Μοριακός Τύπος	$\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{Cu}_2\text{N}_4\text{O}_{11}$
Μοριακό Βάρος	501.317
Σημείο Τήξεως	196-199 °C

3.1.2 Σύνθεση της Σύμπλοκης Ένωσης 2



Σχήμα 4. Σύνθεση του συμπλόκου 2

Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL προστέθηκαν 0.5 mmol (0.1205 gr) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ και 2 mmol (0.12 gr) ουρίας σε 10 mL (1:1 v/v) $\text{MeOH} / \text{MeCN}$. Το διάλυμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο υπό αναρροή (reflux) με κάθετο ψυκτήρα. Ύστερα από 2 ώρες βρασμού, σχηματίστηκε γαλάζιο ίζημα, το οποίο διηθήθηκε και μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη των 50 mL και αφέθηκε overnight προς σχηματισμό κρυστάλλων. Μετά από 10 ημέρες παρατηρήθηκε η δημιουργία γαλάζιων κρυστάλλων, οι οποίοι ήταν κατάλληλοι για ανάλυση περίθλασης ακτίνων-X μονοκρυστάλλου.

Απόδοση Αντίδρασης	70%
Μοριακός Τύπος	$\text{C}_4\text{H}_{16}\text{CuN}_{10}\text{O}_{10}$
Μοριακό Βάρος	427.709
Σημείο Τήξεως	104-109 °C

3.2 Περίθλαση Ακτίνων- Χ Μονοκρυστάλλου

Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα των επιλυμένων δομών **1** και **2** ελήφθησαν σε περιθλασίμετρο Bruker Kappa APEX2 σε θερμοκρασία δωματίου, με πηγή ακτινοβολίας μολυβδαινίου και μονοχρωμάτορα γραφίτη. Οι διαστάσεις μονάδας κελιού προσδιορίστηκαν και βελτιώθηκαν χρησιμοποιώντας τις γωνιακές ρυθμίσεις τουλάχιστον 200 αντανάκλασεων υψηλής έντασης ($> 10 \sigma$ (I)) στην περιοχή $1.6 < 2\theta < 25.9^\circ$ (**1**) $3.0 < 2\theta < 25^\circ$ (**2**). Τα δεδομένα έντασης καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας φ και ω σαρώσεις. Όλοι οι κρύσταλλοι δεν παρουσίασαν καμία φθορά κατά τη συλλογή δεδομένων. Η επίλυση των δομών έγινε με άμεσες μεθόδους με τη χρήση του προγράμματος Bruker SAINT [100]. Τα δεδομένα διορθώθηκαν για απορρόφηση χρησιμοποιώντας την αριθμητική μέθοδο (SADABS) με βάση τις διαστάσεις των κρυστάλλων [101]. Οι δομές επιλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SUPERFLIP [102] και βελτιστοποιήθηκαν με τεχνικές ελαχίστων τετραγώνων πλήρους πλέγματος βασισμένες σε F^2 . Όλα τα άτομα, πλην των υδρογόνων, βελτιώθηκαν ανισοτροπικά. Τα άτομα υδρογόνου προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια χαρτών Fourier διαφορικής πυκνότητας.

3.3 Σημείο Τήξεως

Για την εύρεση του σημείου τήξεως κάθε ένωσης χρησιμοποιήθηκαν τα τριχοειδή σωληνάρια BRIS micro haematocrit tubes (Soda Lime Glass, Vitrex Medical A/S), όπου φέρουν μια χαρακτηριστική ένδειξη για την εισαγωγή του δείγματος. Αφού σφραγιστεί η μια άκρη του τριχοειδούς σωληνίσκου με χρήση φλόγας, τοποθετείται το δείγμα στο εσωτερικό και στη συνέχεια αναποδογυρίζεται ο σωληνίσκος, ώστε το δείγμα να μεταφερθεί στο σφραγισμένο άκρο του τριχοειδούς. Τέλος, το τριχοειδές με το δείγμα τοποθετείται στην αναλογική συσκευή μέτρησης Melting Point SMP1-Bibby Stuart Scientific για την εύρεση του σημείου τήξεως και η θερμοκρασία μετράται με θερμόμετρο. Και στα δύο σύμπλοκα παρατηρήθηκε αλλαγή φάσης, από τη στερεή μορφή των κρυστάλλων σε υγρή μορφή σε κανονικές συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, επομένως παρατηρήθηκε τήξη.

3.4 Διαλυτότητα

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος διαλυτότητας στους εξής διαλύτες: Et₂O, n-Hexane, Toluene, CHCl₃, CH₂Cl₂, Acetone, EtOH, MeOH, DMF, MeCN, DMSO, ddH₂O. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται προκειμένου να εντοπισθούν οι κατάλληλοι διαλύτες για τη διεξαγωγή των επόμενων πειραματικών διαδικασιών. Τοποθετήθηκε ισόποση ποσότητα της ουσίας σε 12 δοκιμαστικούς σωλήνες και στη συνέχεια προστέθηκε η ίδια ποσότητα από κάθε διαλύτη σε κάθε ένα ξεχωριστό δοκιμαστικό σωλήνα. Τέλος, κατόπιν ολιγόλεπτης αναδέυσεως των διαλυμάτων ελέγχθηκε η διαλυτότητα των συμπλόκων.

3.5 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)

Οι σύμπλοκες ενώσεις **1-2**, καθώς και οι υποκαταστάτες τους, χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία Infra Red (I.R.) για την επιβεβαίωση ένταξης των υποκαταστατών στο μεταλλικό κέντρο των συμπλόκων. Για τη λήψη των υπέρυθρων φασμάτων στην περιοχή των 4000-400 cm^{-1} χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο Cary 670 FTIR (Agilent Technologies) και το πρόγραμμα MicroLab Expert. Μετά την ολοκλήρωση της μέτρησης, το αποτέλεσμα αποθηκεύτηκε και επεξεργάστηκε με το κατάλληλο software για τη διεξαγωγή των φασμάτων και τη μετέπειτα μελέτη τους.

3.6 Φασματοσκοπία Υπεριώδους - Ορατού (UV-Vis)

Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο σειράς UV-1600 PC (VWR) για τη λήψη ηλεκτρονικών φασμάτων απορρόφησης με πρόγραμμα M.Wave Professional 1.0. Η συγκεκριμένη φασματοσκοπική μελέτη χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να ελεγχθεί ο σχηματισμός των νέων συμπλόκων ενώσεων, από τους υποκαταστάτες τους, σε διάλυμα DMSO και στη συνέχεια προς μελέτη σταθερότητας των ενώσεων σε διάλυμα σε διαστήματα 0, 24, 48 ώρες και μίας εβδομάδας, ώστε να ελεγχθεί η εγκυρότητα των διαλυμάτων τους σε μεγάλα διαστήματα. Ακόμη, μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis τα νέα σύμπλοκα υποβλήθηκαν σε μελέτη ηλεκτρονιακών διεγέρσεων στο ορατό και τέλος, για τη λήψη φασμάτων στην υπεριώδη περιοχή για το σχεδιασμό πρότυπων καμπυλών των **1-2** (0.00001-0.0001 M) σε διαλύτη DMSO. Όλες οι μετρήσεις UV-Vis πραγματοποιήθηκαν σε κυβελίδα από χαλαζία, πάχους 1 cm και διαλύτες υψηλής καθαρότητας, κατάλληλοι για χρήση σε UV, ενώ όλα τα διαλύματα ήταν όγκου 2 ml.

3.7 Θερμική Ανάλυση

Οι θερμικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με το όργανο Shimadzu DTG-60 ταυτόχρονης μέτρησης DTA-TG, υπό ροή N₂ (50 cm³ min⁻¹) με ρυθμό θέρμανσης 10 °C min⁻¹.

3.8 Φασματοσκοπία Φθορισμού

Τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού Jasco FP-8200 και επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα MicroLab Expert. Η συγκεκριμένη φασματοσκοπική μελέτη χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να ελεγχθεί ο σχηματισμός των νέων συμπλόκων ενώσεων από τους υποκαταστάτες τους σε διάλυμα και τέλος, προς συγκέντρωση περισσότερων δεδομένων σύγκρισης για την αλληλεπίδραση του δακρυϊκού υγρού. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κυψελίδα από χαλαζία, πάχους 1 cm και διαλύτες υψηλής καθαρότητας, ενώ όλα τα διαλύματα ήταν όγκου 2 ml.

3.9 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Η χρωματογραφία TLC πραγματοποιήθηκε σε προσροφητικό πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (SiO₂), το οποίο επικαλύπτεται πάνω σε αλούμινα (Al₂O₃) 20 × 20 cm που αγοράστηκαν από την MERCK. Για την πυκνομετρική αξιολόγηση των πλακών TLC χρησιμοποιήθηκε το σύστημα τεκμηρίωσης γέλης Uvitec Cambridge Gel Documentation, το οποίο λειτουργούσε με λογισμικό UVI-1D. Κάθετα της πλάκας και κατά μήκος της μικρής πλευράς της σημειώνονται μικρές τελείες με μολύβι κοντά στο άκρο της σε κοντινά διαστήματα. Διαλύματα των δειγμάτων

(2 ml) τοποθετούνται με μορφή κηλίδων ξεχωριστά σε κάθε τελεία και ο διαλύτης αφήνεται να εξατμιστεί. Η τοποθέτηση των κηλίδων πραγματοποιήθηκε με αυτόματη πιπέτα. Ως θάλαμος ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε ένα ποτήρι ζέσεως καλυμμένο με μία ύαλο. Ο θάλαμος πρέπει να εξισορροπηθεί πριν από τη χρήση, με την εισαγωγή σε αυτόν διαλύτη ανάπτυξης σε κατάλληλη αναλογία. Στη συνέχεια, παραμένει σε ηρεμία για 5-10 λεπτά μέχρι να τοποθετηθεί η πλάκα και να αναπτυχθεί το χρωματογράφημα. Κατά την ανάπτυξη, ο διαλύτης ανέρχεται στην πλάκα, λόγω τριχοειδούς επίδρασης. Η πλάκα αφήνεται στο θάλαμο μέχρι το επίπεδο του διαλύτη να φθάσει 2 cm από το άνω άκρο της. Τότε, η πλάκα απομακρύνεται από το θάλαμο, σημειώνεται η γραμμή του διαλύτη με μολύβι και αφήνεται να ξηρανθεί. Εφόσον τα διαλύματα των ενώσεων δεν ήταν έγχρωμα, οι κηλίδες εμφανίστηκαν με χρήση φωτός UV.

Κεφάλαιο 4^ο

Χαρακτηρισμός Ενώσεων

4. Χαρακτηρισμός Ενώσεων

4.1 Περίθλαση Ακτίνων-Χ Μονοκρυστάλλου

Στην παρούσα εργασία, επιλύθηκαν οι δομές δύο συμπλόκων ενώσεων, των $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**), οι οποίες φέρουν τους υποκαταστάτες $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (ουρία, U), $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (άλας οξικού χαλκού) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (άλας νιτρικού χαλκού). Όπως διαπιστώθηκε από την ανάλυση και οι δύο ενώσεις αποτελούν πολύμορφα. Τα ήδη γνωστά πολύμορφα του **1** είναι τέσσερα, με το **1** να είναι το πέμπτο, κατά σειρά, πολύμορφο από τα ήδη υπάρχοντα [103, 104]. Η κρυσταλλική δομή του **2**, είναι ίδια με την ήδη γνωστή ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$) με το κωδικό όνομα ZIYVOS [110], σύμφωνα με την κρυσταλλογραφική βάση δεδομένων του Cambridge (CCDC). Ωστόσο, ολοκληρώσαμε την επίλυση του συμπλόκου **2** για σύγκριση αυτών. Η ύπαρξη διαφορετικών πολύμορφων, μας οδηγεί στην ολοκλήρωση της βελτίωσης των δομών, καθώς διαφορετικά πολύμορφα του ίδιου χημικού υλικού είναι γνωστό ότι εμφανίζουν διακριτές φυσικοχημικές ιδιότητες [105]. Στον **Πίνακα 5** παρουσιάζονται όλα τα πολύμορφα που έχουν διαπιστωθεί έως τώρα για τα σύμπλοκα **1** και **2**.

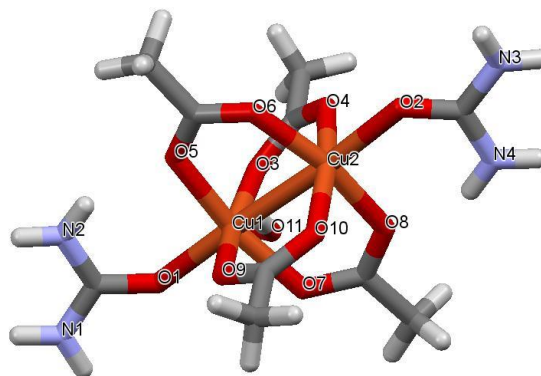
Πίνακας 5. Παράμετροι μοναδιαίας κυψελίδας και αποστάσεις δεσμών των αναφερόμενων πολύμορφων δομών των **1** και **2**.

Σύμπλοκο	Space group	Μοναδιαία Κυψελίδα		d(Cu...Cu) (Å)	Διαλύτης	Πηγές
		a, b, c (Å)	α, β, γ (°)			
1	P-1	8.3408(7), 9.0619(8), 13.6570(2)	105.504(4), 92.910(4), 109.925(4)	2.613(1)	MeOH	*
ACURCU 01	P 2 ₁ /c	8.758(1), 14.152(2), 8.502(1)	90, 109.01(1), 90	2.6244(4)	EtOH	[106]
ACURCU 10	P 1 1 2 ₁ /b	8.759(1), 8.506(1), 14.130(1)	90, 90, 109.03(4)	2.624	H ₂ O	[107]
pt4_cpd2	P 2 ₁	8.472(2), 14.097(3), 8.725(1)	90.00, 109.03(1), 90.00		-	[108]
ACURCU 02	P 2 ₁	8.472(2), 14.097(3), 8.725(1)	90, 109.03(1), 90	2.6132	H ₂ O	[109]
2	P 2 ₁ /c	7.0694(5), 15.7183(2), 7.1541(6)	90, 106.399(2), 90		MeOH/MeCN	*
ZIYVOS	P 2 ₁	7.000(1), 15.610(3), 7.100(1)	90, 106.40(3), 90		EtOH	[110]
1CCDC1	P 2 ₁ /m	9.489(3), 13.059(3), 7.103(2)	90, 100.28(3), 90		70% aqueous ethanol	[111]

$\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$

Το σύμπλοκο $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) είναι ένα διμεταλλικό σύμπλοκο με δύο ιόντα χαλκού(II) και γεωμετρία τετραγωνικής πυραμίδας, με γέφυρες οξικών ανιόντων και τερματικά μόρια ουρίας (Εικόνα 19).

Δύο αποπροτονιωμένα άτομα καρβοξυλικού οξυγόνου από τα οξικά γεφυρώνουν τα δύο ιόντα χαλκού (II), δύο άτομα οξυγόνου καρβοξυλικού και δύο άτομα οξυγόνου καρβονυλίου των οξικών σχηματίζουν ένα ισημερινό επίπεδο γύρω από κάθε Cu (II) (O3, O5, O7, O9 γύρω από Cu1 και O4, O6,

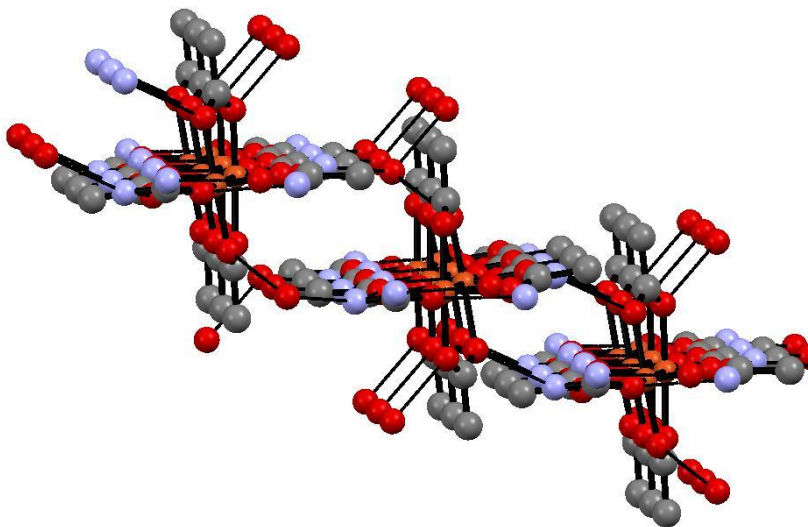


Εικόνα 19. Δομή του συμπλόκου **1**

O8, O10 γύρω από το Cu2), ενώ ένα άτομο οξυγόνου από την ουρία καταλαμβάνει την αξονική θέση (O1 για Cu1 και O2 για Cu2). Η απόσταση Cu ... Cu είναι 2,613 (1) Å και είναι μικρότερη από τη διπλάσια ακτίνα van der Waals του Cu, (2,00-2,27 Å) [112] υποδεικνύοντας d-d αλληλεπίδραση μεταξύ των ατόμων χαλκού. Αυτή η απόσταση Cu ... Cu στο σύμπλοκο **1** είναι η μικρότερη που συναντάται μεταξύ των tetrakis(μ_2 -Acetato-O,O')-bis(urea)-di-copper(II) πολύμορφα (Πίνακας 5). Με βάση την ομάδα χώρου, οι δομές των πολύμορφων $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ μπορούν να ταξινομηθούν σε αυτές που κρυσταλλώνονται στην (i) ομάδα χώρου $P2_1/c$, (ii) $P2_1$ και (iii) $P112_1/b$. Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου **1**, ωστόσο, επιλύεται σε ομάδα χώρου P-1 (Πίνακας 6). Αυτή είναι μια νέα πολυμορφική μορφή μεταξύ των αντίστοιχων tetrakis(μ_2 -Acetato-O,O')-bis(urea)-di-copper(II).

Οι αποστάσεις δεσμού Cu – O του **1** του ισημερινού επιπέδου είναι παρόμοιες (Cu1-O3 = 1,968 (5), Cu1-O5 = 1.959 (4), Cu1-O7 = 1.953 (4) και Cu1-O9 = 1.985 (5) Å αντίστοιχα. Το αντίστοιχο μήκος δεσμού Cu – O για το αξονικό άτομο O₂ (ουρία) είναι Cu1-O1 = 2.141 (5), μεγαλύτερο από τα αντίστοιχα του ισημερινού επιπέδου, λόγω του φαινομένου Jahn Teller. Ομοίως, το Cu2-O4 = 1.958 (5) Å, Cu2-O6 = 1.966 (4) Å, Cu2-O8 = 1.976 (4) Å και Cu2-O10 = 1.981 (5) Å είναι μικρότερα από το αντίστοιχο του Cu2-O2 = 2.147 (5).

Διαμοριακές συνδέσεις, στην περίπτωση του συμπλόκου **1**, μέσω αλληλεπίδρασης σύνδεσης N [H] ... O και O [H] ... O (N1 [H12] ... O2 = 2.990 (8), N2 [H21] ... O5 = 2.935 (8) , N2 [H22] ... O9 = 3.029 (9), N3 [H31] ... O1 = 3.057 (8), N3 [H32] ... O11 = 3.159 (8), N4 [H113] ... O8 = 2.905 (9), N4 [H114] ... O11 = 2.930 (9), O11 [H111] ... O3 = 2.913 (8), O11 [H112] ... O10 = 2.897 (8) Å) οδηγούν σε πολυμερικό συγκρότημα που σχηματίζει 3D δίκτυο (**Εικ. 20**) Οι πόροι δημιουργούνται από αυτές τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις με διαστάσεις 4.549 × 6.723 Å².



Εικόνα 20. Διαμοριακοί δεσμοί, μέσω N [H] ... O και O [H] ... O. Οι πόροι δημιουργούνται από αυτές τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις στο 1 με διαστάσεις 4.549 × 6.723 Å².

Πίνακας 6. Κρυσταλλικά δεδομένα του συμπλόκου **1**.

M.T.	$C_{10}H_{22}Cu_2N_4O_{11}$
M.B.	501.317
T (K)	295
Κρυσταλλικό Σύστημα	Τρικλινές
Space Group	P-1
a (Å)	8.3408(7)
b (Å)	9.0619(8)
c (Å)	13.6570(2)
α (°)	105.504(4)
β (°)	92.910
γ (°)	109.925
V (Å) ³	923.60(2)
Z	2
P_{calc} (mg/m ³)	1.803
F (000)	512.16,079
Τελικές ενδείξεις R [$I > 2.0 \sigma(I)$]	$R_1 = 0.0520$ $wR_2 = 0.1179$

Πίνακας 7. Επιλεγμένα μήκη και γωνίες δεσμών.

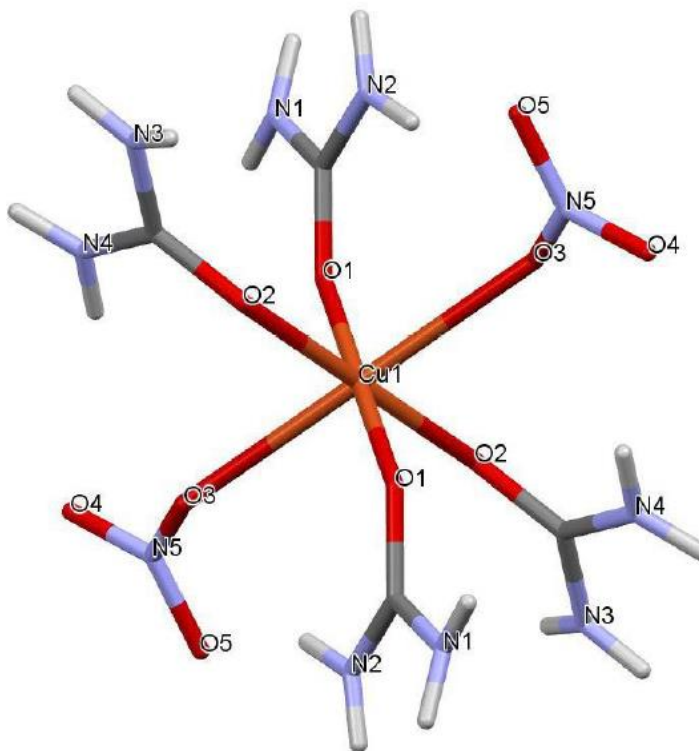
Αποστάσεις Δεσμών (Å)		Γωνίες Δεσμών (°)	
Cu1-O1	2.141(5)	O1-Cu1-O3	95.7(2)
Cu1-O3	1.968(5)	O1-Cu1-O5	97.6(2)
Cu1-O5	1.959(4)	O1-Cu1-O7	92.4(2)
Cu1-O7	1.953(4)	O1-Cu1-O9	96.8(2)
Cu1-O9	1.985(5)	O3-Cu1-O5	89.0(2)
Cu2-O2	2.147(5)	O3-Cu1-O7	88.6(2)
Cu2-O4	1.958(5)	O3-Cu1-O9	167.5(2)
Cu2-O6	1.966(4)	O5-Cu1-O7	169.6(2)
Cu2-O8	1.976(4)		
Cu2-O10	1.981(5)		

Ακολουθούν οι αποστάσεις δεσμών των υπόλοιπων πολύμορφων προς σύγκριση με τις αντίστοιχες του συμπλόκου **1: ACURCU01**: Cu1-O1 = 1.983 (1), Cu1-O2 = 1.967 (2), Cu1-O3 = 1.956 (2), Cu1-O4 = 1.972 (1), Cu1-O5 (ουρία) = 2.135 (1), Cu1B-O1B = 1.983 (1), Cu1B-O2B = 1.967 (2), Cu1B-O3B = 1.956 (2), Cu1B-O4B = 1.972 (1) και Cu1B-O5B (ουρία) = 2.135 (1) Å αντίστοιχα, **ACURCU10**: Cu1-O1 = 1.9835, Cu1-O2 = 1.970, Cu1-O3 = 1.948, Cu1-O4 = 1.9741, Cu1-O5 (ουρία) = 2.130 Å, **pt4_cpd2**: Cu1-O1 (ουρία) = 2.1249, Cu1-O11 = 1.9457, Cu1-O31 = 1.9636 Å αντίστοιχα, **ACURCU02**: Cu1-O1 (ουρία) = 2.116, Cu1-O3 = 1.909, Cu1-O5 = 1.934, Cu1-O9 = 1.969, Cu 1-O7 (ουρία) = 2.004, Cu2-O2 = 2.148 (4), Cu2-O4 = 1.995 (6), Cu2-O6 = 1.983 (7), Cu2-O8 = 1.972 (7), Cu2-O10 = 1.927 (7) Å αντίστοιχα.

Cu(NO₃)₂U₄

Η δομή της ένωσης είναι ήδη γνωστή, καθώς ένα πολύμορφο έχει ήδη απομονωθεί για την ένωση **2** [110] με το κωδικό όνομα **CCDC ZIYVOS** και επιβεβαιώνεται ότι η κρυσταλλική δομή του Cu(NO₃)₂U₄ (**2**) είναι ίδια με την προαναφερθείσα. Ωστόσο, ολοκληρώσαμε την επίλυση του συμπλόκου **2** για σύγκριση αυτών των δομών.

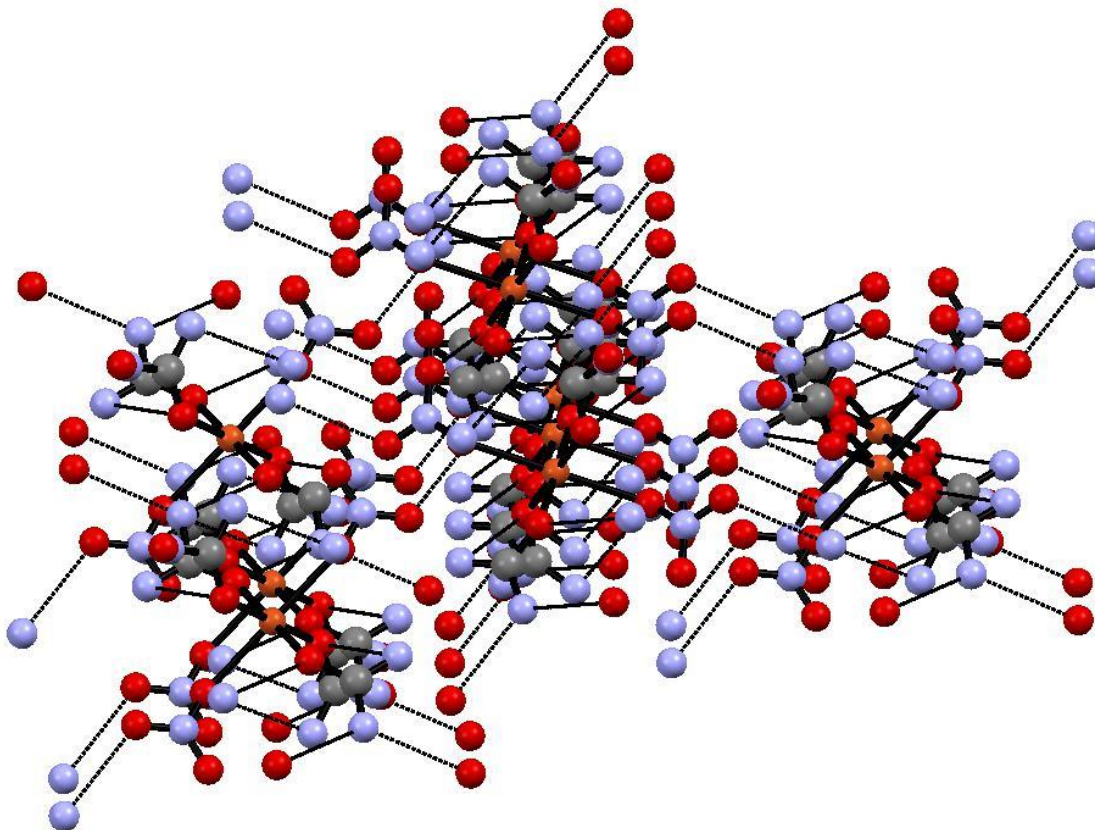
Δύο άτομα O₂ από τις νιτρικές ομάδες και τέσσερα άτομα O₂ από τις ουρίες σχηματίζουν ένα οκτάεδρο γύρω από το ιόν χαλκού (II). Συνεπώς, το σύμπλοκο **2** είναι ένα οκταεδρικό σύμπλοκο με την ουρία πάνω στο ισημερινό επίπεδο και τις τέσσερις νιτρικές ρίζες στις αξονικές θέσεις (**Εικόνα 21**).



Εικόνα 21. Δομή του συμπλόκου **2**

Οι αποστάσεις δεσμού Cu-O στο **2** είναι Cu1-O1 = 1.9363 (2), Cu1-O2 = 1.9705 (2) και Cu1-O3 = 2.500 (2) Å αντίστοιχα. Οι γωνίες σύνδεσης O1 – Cu1 – O2 και O1 – Cu1 – O3 είναι 95.23 (7)° και 84.16 (7)° αντίστοιχα, ποικίλλουν από την ιδανική τιμή (90°), δείχνοντας παραμόρφωση από την ιδανική οκταεδρική γεωμετρία. Οι αντίστοιχες αποστάσεις δεσμών Cu – O, σύμφωνα με αυτές της ένωσης **2**, για το σύμπλοκο **ZIYVOS** είναι οι εξής: Cu1-O1 = 1.97, Cu1-O2 = 1.86, Cu1-O3 = 1.93, Cu1-O4 = 2.43, Cu1-O5 = 2.53, Cu1-O8 = 1.97 Å και για το πολύμορφο **1_CCD1**: Cu1-O1 = 1.938, Cu1-O1W = 1.930, Cu1-O2W = 1.930 Å.

Οι δεσμοί υδρογόνου του **2**, N [H] \cdots O (N1 [H11] \cdots O4 = 3.079 (3), N2 [H21] \cdots O5 = 3.178 (3), N2 [H22] \cdots O3 = 3.037 (3), N2 [H22] \cdots O5 = 3.375 (3), N3 [H31] \cdots O4 = 2.960 (3), N3 [H32] \cdots O2 = 2.966 (3), N4 [H41] \cdots O3 = 3.092 (3), N4 [H42] \cdots O5 = 3.189 (3) Å) δημιουργούν μια 3D πολυμερική αρχιτεκτονική (**Εικ. 22**).



Εικόνα 22. Διαμοριακοί δεσμοί, μέσω N [H] \cdots O.

Πίνακας 8. Κρυσταλλικά δεδομένα του συμπλόκου **2**.

M.T.	$C_4H_{16}CuN_{10}O_{10}$
M.B.	427.709
T (K)	295
Κρυσταλλικό Σύστημα	Μονοκλινές
Space Group	P-2 _{1/c}
a (Å)	7.0694(5)
b (Å)	15.7183(2)
c (Å)	7.1541(6)
β (°)	102.399(2)
V (Å) ³	762.62(2)
Z	2
P _{calc} (mg/m ³)	1.863
F (000)	438.5639
Τελικές ενδείξεις R [I>2.0 sigma (I)]	R ₁ = 0.0304 wR ₂ = 0.0526

Πίνακας 9. Επιλεγμένα μήκη και γωνίες δεσμών.

Γωνίες Δεσμών (°)		Αποστάσεις Δεσμών (Å)	
O2-Cu1-O6	84.15(6)	Cu1-O2	1.9363(2)
O2-Cu1-O10	95.22(6)	Cu1-O6	2.500(2)
O2-Cu1-O2_a	180.00	Cu1-O10	1.9702(2)
O2-Cu1-O6_a	95.85(6)	Cu1-O2_a	1.9363(2)
O2-Cu1-O10_a	84.78(6)	Cu1-O6_a	2.500(2)
O6-Cu1-O10	85.96(7)	Cu1-O10_a	1.9702(2)
O2_a-Cu1-O6	95.85(7)		
O6-Cu1-O6_a	180.00		
O6-Cu1-O10_a	94.04(7)		
O2_a-Cu1-O10	84.78(6)		
O6_a-Cu1-O10	94.04(7)		
O10-Cu1- O10_a	180.00		
O2_a-Cu1-O6_a	84.15(7)		
O2_a -Cu1-O10_a	95.22(6)		
O6_a -Cu1-O10_a	85.96(7)		

4.2 Σημείο Τήξεως

Προσδιορίστηκε το σημείο τήξεως των συμπλόκων $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**) υπό κανονικές συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης με εφαρμογή θερμότητας. Όπως παρατηρούμε από τις τιμές του **Πίνακα 10**, τα σύμπλοκα τήκονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες από τους αντίστοιχους υποκαταστάτες.

Πίνακας 10. Τιμές σημείων τήξεως υποκαταστατών, **1**, **2**.

	$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	$\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1	2
Σ.Τ.	133°C	114.5°C	114°C	196-199°C	104-109°C

4.3 Διαλυτότητα

Πριν την έναρξη των πειραμάτων, οι νέες σύμπλοκες ενώσεις $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**) μελετήθηκαν ως προς τη διαλυτότητα τους στους εξής διαλύτες: Et_2O , n-Hexane, Toluene, CHCl_3 , CH_2Cl_2 , Acetone, EtOH, MeOH, DMF, MeCN, DMSO και ddH₂O. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε προκειμένου να εντοπισθούν οι κατάλληλοι διαλύτες των συμπλόκων για τη διεξαγωγή των επόμενων πειραματικών διαδικασιών.

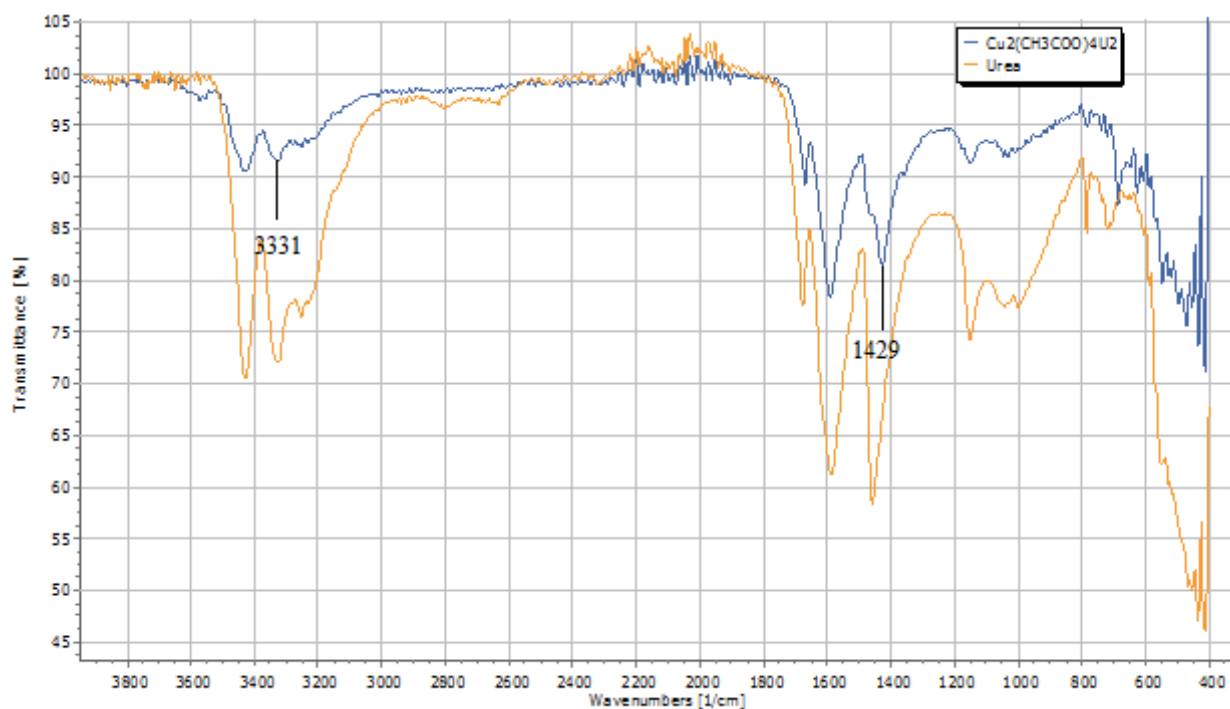
Πίνακας 11. Μελέτη διαλυτότητας των συμπλόκων **1**, **2**.

Διαλύτες	1	2
n-Hexane		
Toluene		
CH ₂ Cl ₂		
CHCl ₃		
Acetone		
MeOH	+++	+++
MeCN	+	+
DMSO	+	+++
ddH ₂ O	+++	+++
Et ₂ OH		
EtOH		
DMF		

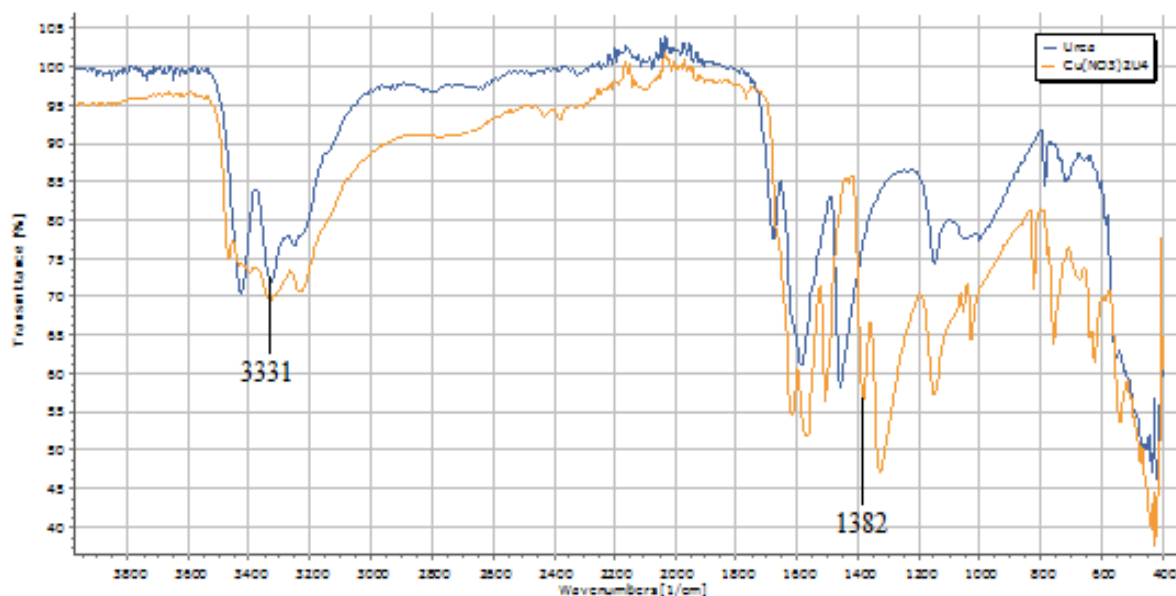
Είναι ευδιάκριτο ότι και τα δύο σύμπλοκα είναι διαλυτά στους ίδιους διαλύτες.

4.4 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)

Οι κύριες δονήσεις του υποκαταστάτη ουρία είναι στους: 3331, 1454 και 1471 cm^{-1} . Οποιαδήποτε μετατόπιση τους αποδεικνύει τη σύνθεση των συμπλόκων $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**) με επιτυχία. Όπως φαίνεται στα **Σχήματα 5, 6** οι ισχυρές ταινίες δόνησης στους 3331 cm^{-1} στα φάσματα υπερύθρων της ουρίας και των συμπλόκων **1** και **2**, οφείλονται σε δονήσεις δεσμών N – H [113]. Η ταινία δόνησης στους 1454 cm^{-1} στο φάσμα IR της ουρίας, που αποδίδεται στον δεσμό ν (C=O), έχει μετατοπιστεί στους 1429 (**1**) και 1382 (**2**) cm^{-1} αντίστοιχα, υποδηλώνοντας την ένταξη του υποκαταστάτη στο μεταλλικό κέντρο των συμπλόκων.



Σχήμα 5. Φάσμα IR του συμπλόκου **1** με τον υποκαταστάτη ουρία

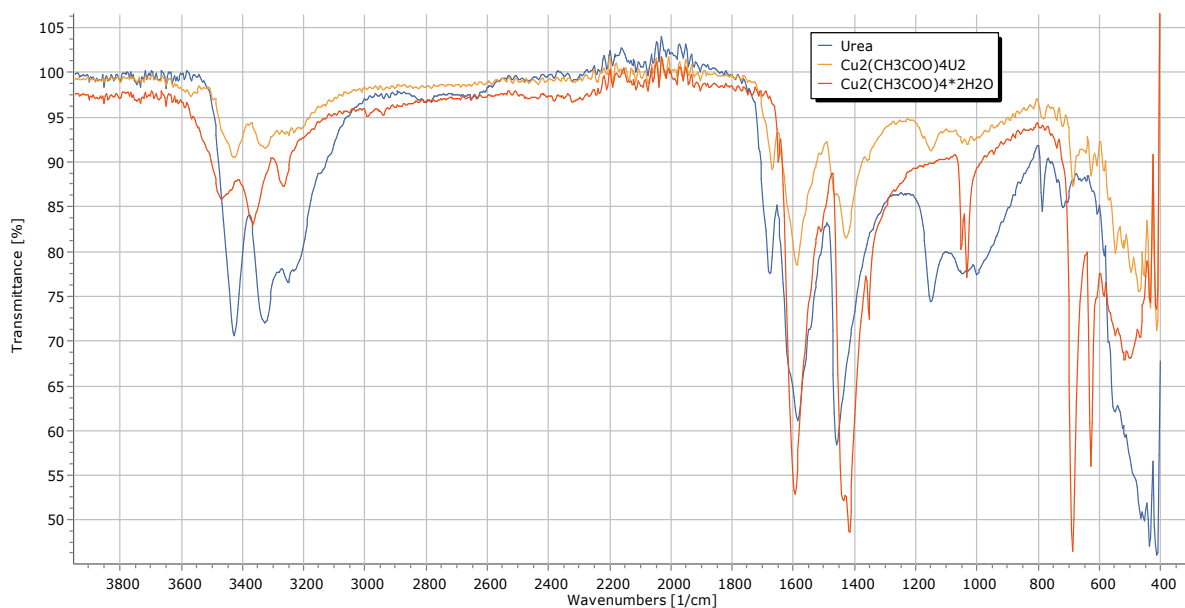


Σχήμα 6. Φάσμα IR του συμπλόκου **2** με τον υποκαταστάτη ουρία

$\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$

Η δόνηση $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ στο φάσμα IR του συμπλόκου $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) παρατηρείται στους 1530 cm^{-1} , ενώ η ταινία στους 1352 cm^{-1} αντιστοιχεί στο $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ (Σχ. 5). Η τιμή $\Delta\nu$ [$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$] είναι 178 cm^{-1} . Ο μονοδοντικός συντονισμός της καρβοξυλικής ομάδας έχει ως αποτέλεσμα σημαντικά υψηλότερες τιμές διαφοράς $\Delta\nu$ από αυτές που παρατηρούνται για τις ιοντικές ενώσεις του υποκαταστάτη [114, 115], ενώ όταν ο υποκαταστάτης χηλικοποιεί, το $\Delta\nu$ είναι σημαντικά μικρότερο από αυτό που παρατηρείται για τις ιοντικές ενώσεις του. Για ασύμμετρο συντονισμό, οι τιμές κυμαίνονται σε αυτές του μονοδοντικού. Όταν η ομάδα $-\text{COO}^-$ γεφυρώνει μεταλλικά ιόντα, οι τιμές $\Delta\nu$ είναι υψηλότερες από εκείνες του τρόπου χηλίωσης και σχεδόν ίδιες με αυτές που παρατηρούνται για τις ιοντικές ενώσεις. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του οξικού νατρίου, η τιμή $\Delta\nu$ [$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$] είναι 170 cm^{-1} . Δεδομένου ότι η τιμή $\Delta\nu$ στο **1** (178 cm^{-1}) είναι στην περιοχή του αντίστοιχου οξικού νατρίου, ο τρόπος συντονισμού γεφύρωσης ολοκληρώνεται για την καρβοξυλική ομάδα στο **1** (Σχ. 5).

Ακολούθως, δίνεται το συγκεντρωτικό φάσμα της ένωσης $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$, του υποκαταστάτη ουρία και του υποκαταστάτη $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Συγκρίνοντας το φάσμα του συμπλόκου με αυτό των υποκαταστατών παρατηρούνται μικρές, αλλά σημαντικές μετατοπίσεις. Οι κύριες μετατοπίσεις της ουρίας αναφέρθηκαν παραπάνω, ενώ οι δονήσεις στους 1671 cm^{-1} μεγάλης έντασης, 1588 και 1433 cm^{-1} πολύ μεγάλης έντασης, καθώς και στους $686, 546, 495$ και 476 cm^{-1} μέτριας έντασης οφείλονται στην ύπαρξη των οξικών ιόντων.

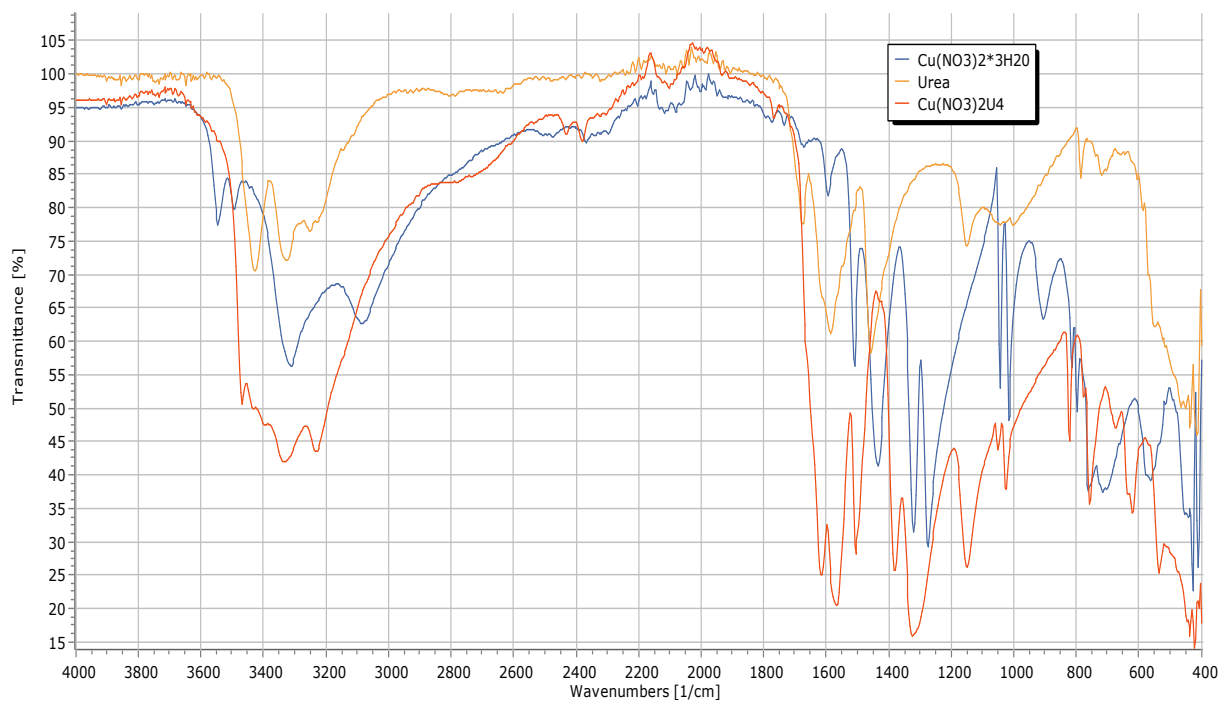


Σχήμα 7. Συγκεντρωτικό φάσμα της ένωσης **1** με τους υποκαταστάτες

✚ Cu(NO₃)₂U₄

Οι ισχυρές ταινίες στους 1377 και 1318 cm⁻¹, από την άλλη πλευρά, αποδίδονται στις δονητικές ζώνες ν_{as}(N – O) και ν_s(N – O) της ομάδας νιτρικών στο **2** [116]. Η τιμή Δν [ν_{as}(N – O) - ν_s(N – O)] είναι 59 cm⁻¹. Δεδομένου ότι ο συντονισμός της νιτρικής ομάδας προς το χαλκό (II) οδηγεί σε: Δν [ν_{as}(N – O) - ν_s(N – O)] τιμές ~ 30 cm⁻¹, μονοδοντικό έως ~ 10 cm⁻¹, γεφύρωση έως ~ 60 cm⁻¹, και τη λειτουργία ιοντικού συντονισμού του σε 0 cm⁻¹. Επομένως, η τιμή των 59 cm⁻¹ στην περίπτωση της ένωσης **2** προτείνει έναν τρόπο συντονισμού γεφύρωσης της ομάδας NO₃⁻. Αυτό δεν έρχεται σε αντίθεση με την κρυσταλλική δομή ακτίνων-X (**Εικ. 20**), αφού η νιτρική ομάδα συμμετέχει σε ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου που γεφυρώνουν τις σύνθετες μονάδες στο υπερμοριακό συγκρότημα (**Εικ. 22**).

Ακολουθεί το συγκεντρωτικό φάσμα της ένωσης **2**, του υποκαταστάτη ουρία και του υποκαταστάτη Cu(NO₃)₂*3H₂O. Συγκρίνοντας το φάσμα του συμπλόκου με αυτό των υποκαταστατών, εντοπίζονται ορισμένες ευδιάκριτες μετατοπίσεις. Στους 3329 cm⁻¹, μέτριας έντασης, εμφανίζεται μια χαρακτηριστική δόνηση που αντιστοιχεί στη δόνηση δεσμών N-H της ουρίας, όπως και η ταινία δόνησης στους 1382 cm⁻¹, μέτριας έντασης, που αποδίδεται στο δεσμό C=O της ουρίας. Χαρακτηριστικές ταινίες δόνησης αποτελούν και οι εξής: στους 2379 cm⁻¹ μικρής έντασης, στους 1323 cm⁻¹ πολύ μεγάλης έντασης και τέλος, στους 422 cm⁻¹ μέτριας έντασης που οφείλονται στα νιτρικά ιόντα.



Σχήμα 8. Συγκεντρωτικό φάσμα της ένωσης **2** με τους υποκαταστάτες

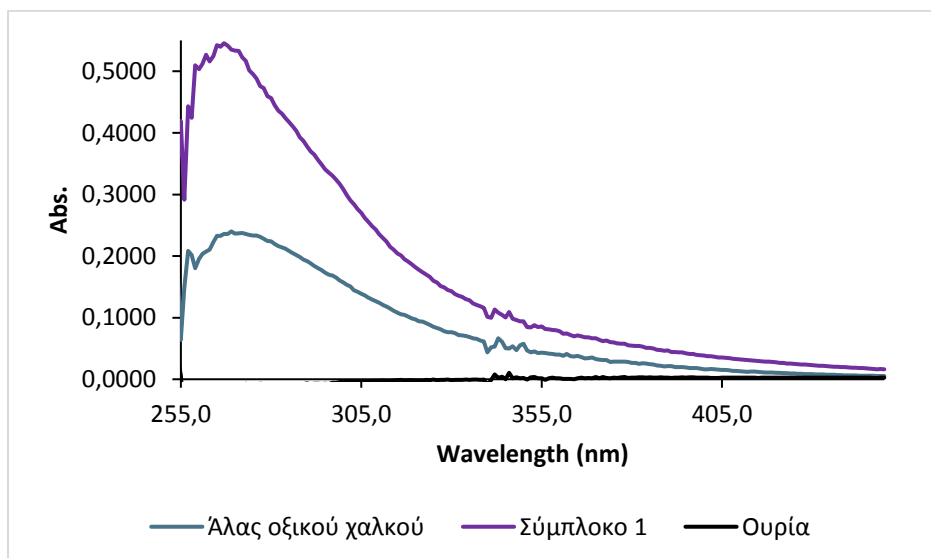
4.5 Φασματοσκοπία Υπεριώδους - Ορατού (UV-Vis)

4.5.1 Χαρακτηρισμός Συμπλόκων

Η ύπαρξη των συμπλόκων $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**) σε διάλυμα επαληθεύεται από τα υπεριώδη φάσματα τους προς τα αντίστοιχα των υποκαταστατών τους, ουρία, άλατος οξικού και άλατος νιτρικού χαλκού, αντίστοιχα. Για το λόγο, αυτό, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα των συμπλόκων **1-2** και των αντίστοιχων υποκαταστατών, συγκέντρωσης 10^{-4} M σε διαλύτη DMSO και λήφθηκαν τα φάσματα στην υπεριώδη περιοχή (Σχ. **9, 10**).

$\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$

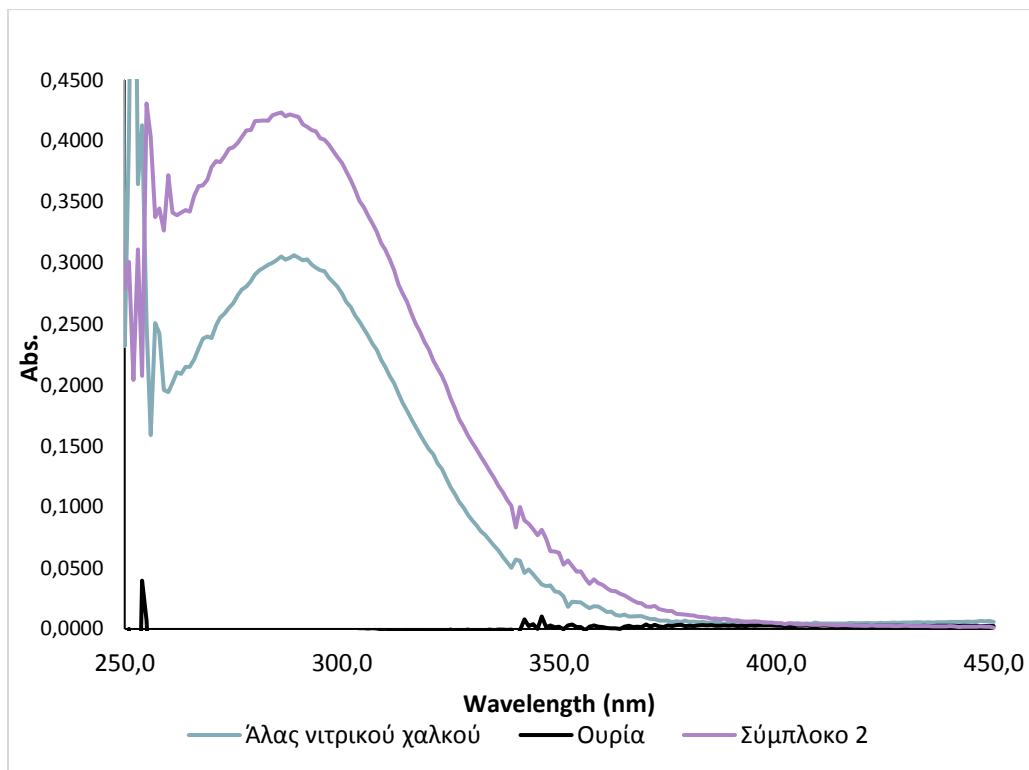
Ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης ($\log(\epsilon)$) φαίνεται να αυξάνεται από 3.38 για το άλας οξικού χαλκού με $\lambda_{\text{max}} = 270$ nm, σε 3.73 για τη σύμπλοκη ένωση **1** ($\lambda_{\text{max}} = 260$ nm).



Σχήμα 9. Φάσμα UV της ένωσης **1** και των υποκαταστατών της, συγκέντρωσης 10^{-4} M σε διαλύτη DMSO

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$

Ομοίως, ο συντελεστής απόσβεσης ($\log(\epsilon)$) αυξάνεται από 3.48 για το άλας νιτρικού χαλκού ($\lambda_{\text{max}} = 288 \text{ nm}$), σε 3.63 για τη σύμπλοκη ένωση **2** ($\lambda_{\text{max}} = 290 \text{ nm}$).

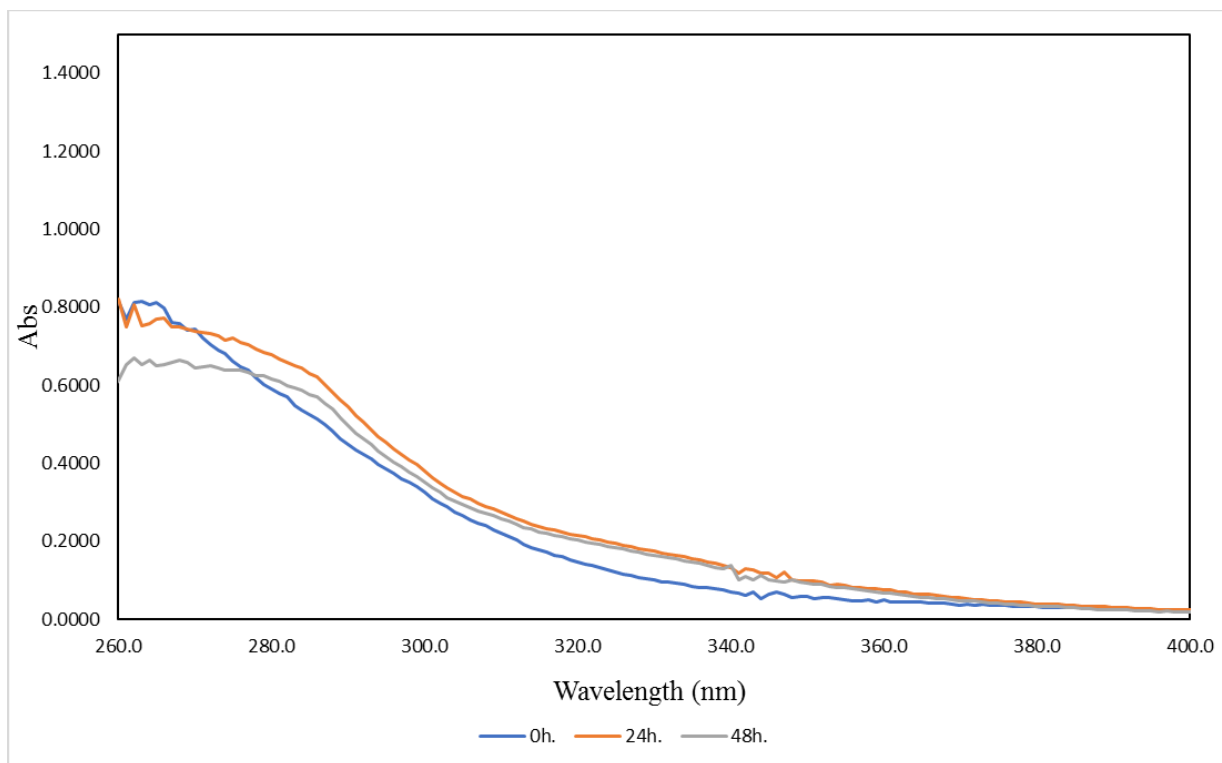


Σχήμα 10. Φάσμα UV της ένωσης **2** και των υποκαταστατών της, συγκέντρωσης 10^{-4} M σε διαλύτη DMSO

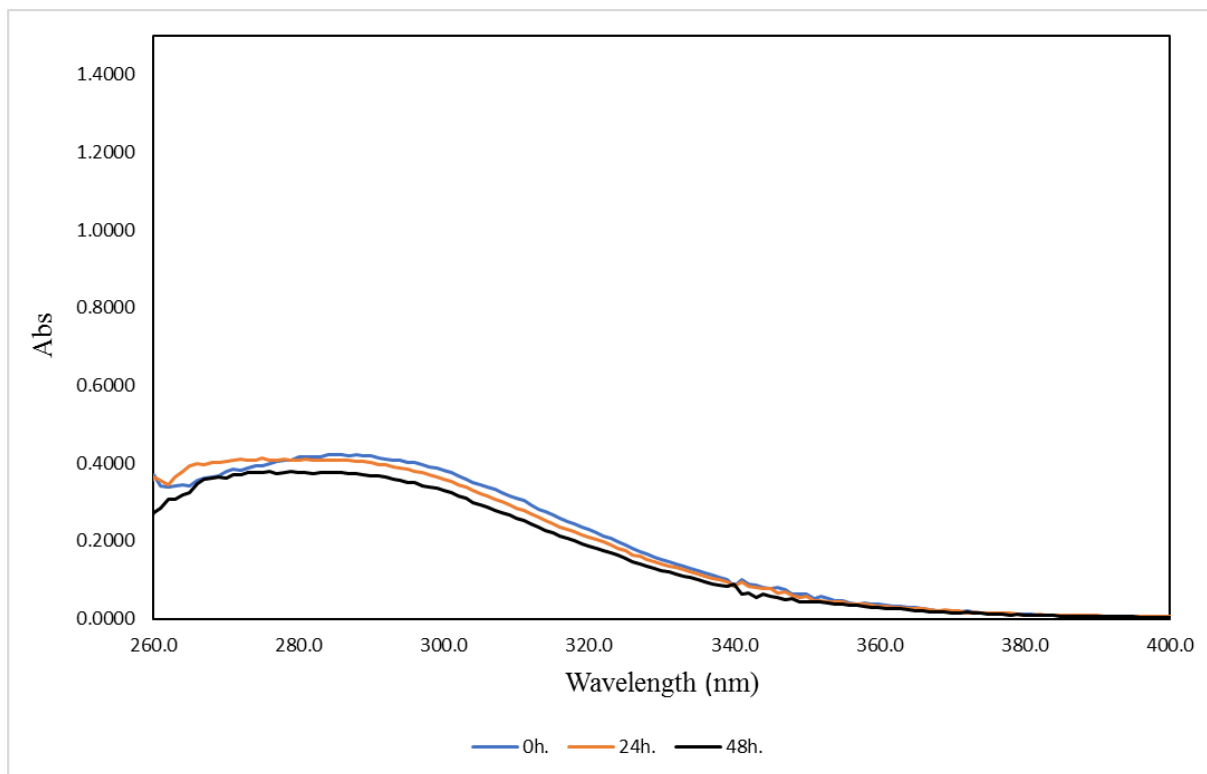
Η διαφορά στο συντελεστή μοριακής απόσβεσης των συμπλόκων σε σχέση με των υποκαταστατών υποδεικνύει το σχηματισμό των συμπλόκων.

4.5.2 Μελέτη Σταθερότητας

Η μελέτη σταθερότητας των συμπλόκων σε διάλυμα πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα των συμπλόκων $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}_2(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**), συγκέντρωσης 10^{-4} M, σε διαλύτη DMSO και υποβλήθηκαν σε μελέτη σταθερότητας για 0, 24, 48 ώρες και 1 εβδομάδα (Σχ. 11, 12).



Σχήμα 11. Μελέτη σταθερότητας για την ένωση 1

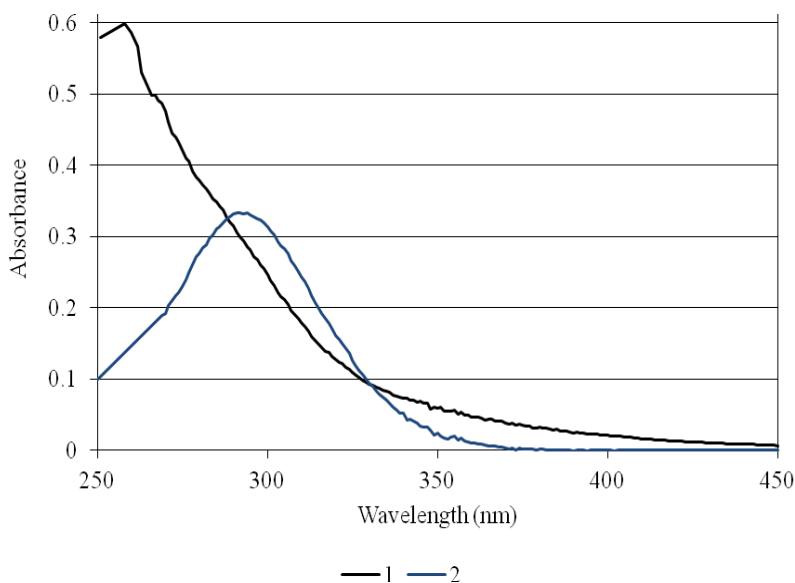


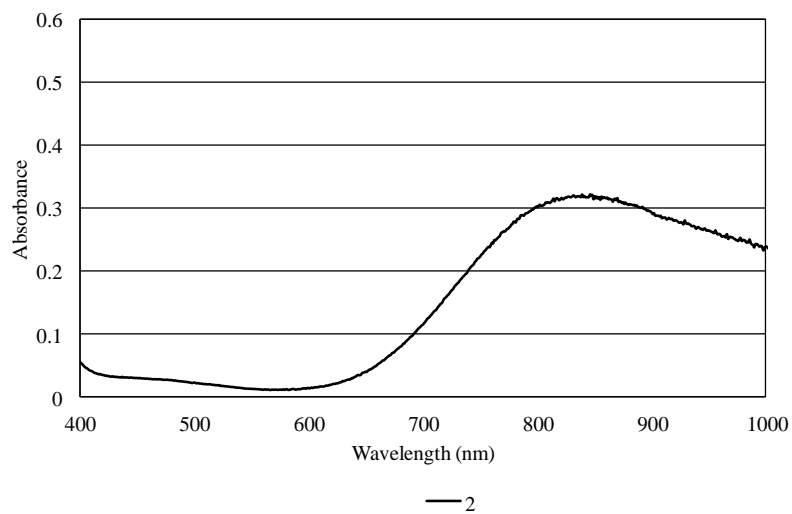
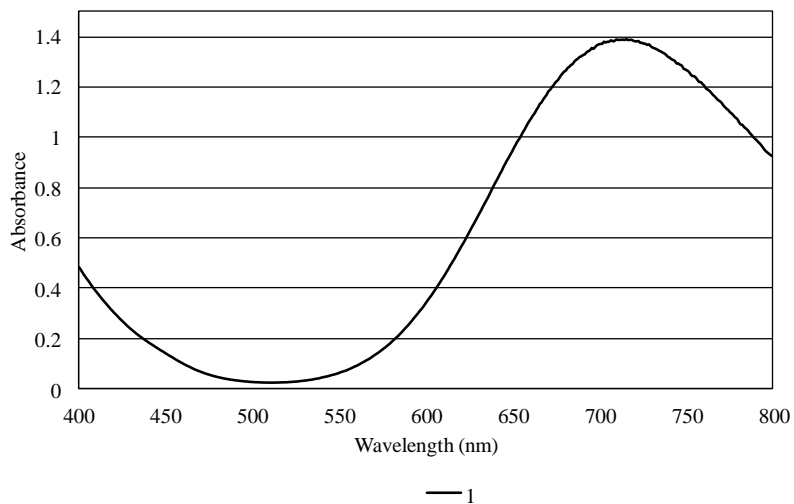
Σχήμα 12. Μελέτη σταθερότητας για την ένωση **2**

Δεν παρατηρείται κάποια σημαντική αλλαγή ή μετατόπιση στην απορρόφηση και των δύο ενώσεων για χρονικό διάστημα τριών ημερών. Άρα, οι ενώσεις **1-2** είναι σταθερές σε διάλυμα DMSO έως και για 3 ημέρες. Η μικρή διαφορά στην κορυφή απορρόφησης οφείλεται στο όργανο.

4.5.2 d-d Ηλεκτρονιακές Διεγέρσεις στο Ορατό

Η ύπαρξη των συμπλόκων $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**) σε διάλυμα επαληθεύεται επίσης από τα φάσματα UV-Vis. Τα φάσματα των ενώσεων **1-2** κυριαρχούνται από ταινίες στα 257 nm για το **1** και στα 294 nm για το **2**, που αποδίδονται σε μεταπτώσεις ηλεκτρονίων $\pi^* \leftarrow n$ των ομάδων COO^- ή NO_3^- των οξικών ή νιτρικών ομάδων, αντίστοιχα (Σχ. 13). Τα φάσματα στο ορατό για τις ενώσεις **1-2** κυριαρχούνται από τη μετάπτωση ηλεκτρονίων στα $\lambda_{\text{max}} = 716$ nm και $\lambda_{\text{max}} = 835$ nm αντίστοιχα, τα οποία αποδίδονται σε φασματοσκοπικούς όρους $T_{2g}(\text{D}) \leftarrow E_g(\text{D})$.





Σχήμα 13. Φάσματα UV (440-250 nm) των ενώσεων **1** και **2** σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-4} M (άνω). Φάσματα (800-400 nm) της ένωσης **1** συγκέντρωσης 5×10^{-3} M (μέση) και της ένωσης **2** συγκέντρωσης 10^{-2} M (κάτω) σε DMSO.

4.6 Θερμική Ανάλυση

4.6.1 Θερμοβαρτομετρική Ανάλυση (TG)

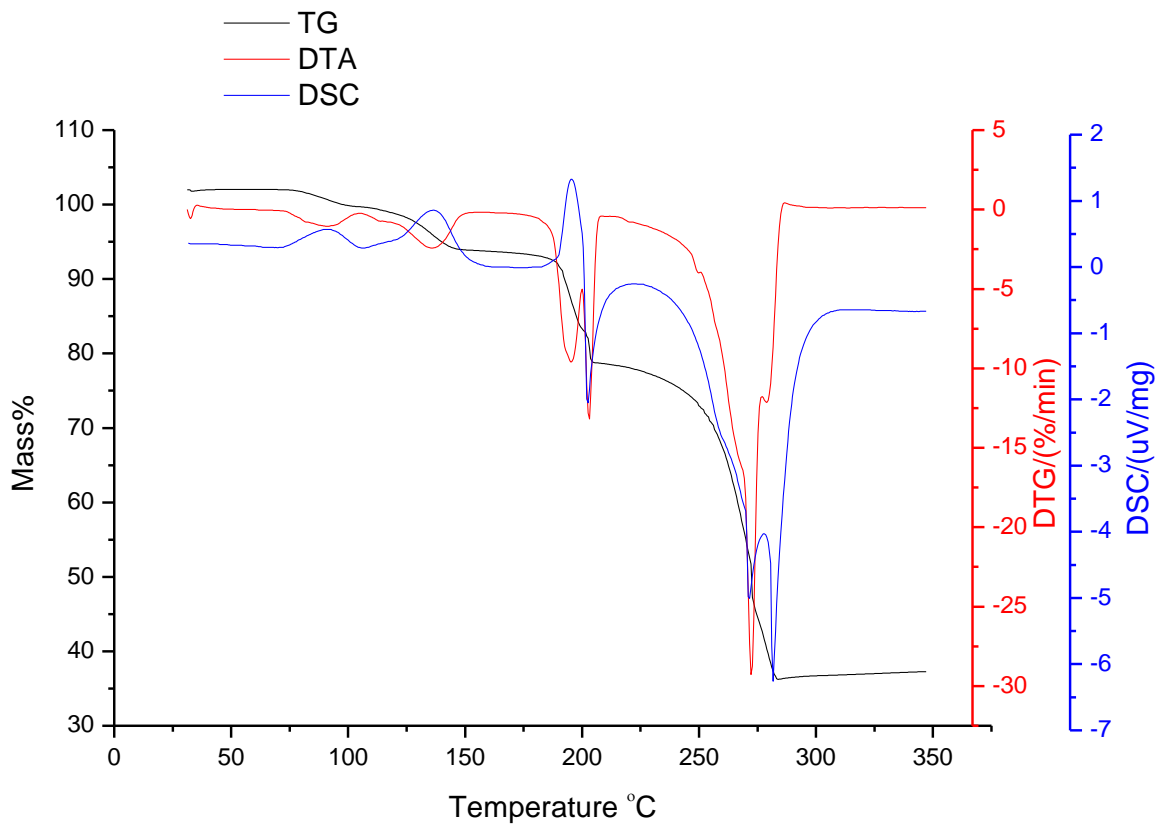
Η ανάλυση αυτή βασίζεται στην απώλεια μάζας μίας ένωσης, η οποία μετράται συναρτήσει της θερμοκρασίας, ενώ η ένωση υποβάλλεται σε προγραμματισμένη μεταβολή της θερμοκρασίας, συνήθως με σταθερό ρυθμό. Οι τεχνικές TG δίνουν πληροφορίες για την αρχική και την τελική θερμοκρασία αντίδρασης, καθώς και ποσοτική ανάλυση της διαφοράς μάζας. Το διάγραμμα μάζας ή του ποσοστού της μάζας ως συνάρτηση του χρόνου ή/και της θερμοκρασίας ονομάζεται θερμογράφημα ή καμπύλη θερμικής διάσπασης.

4.6.2 Διαφορική Θερμική Ανάλυση (DTA)

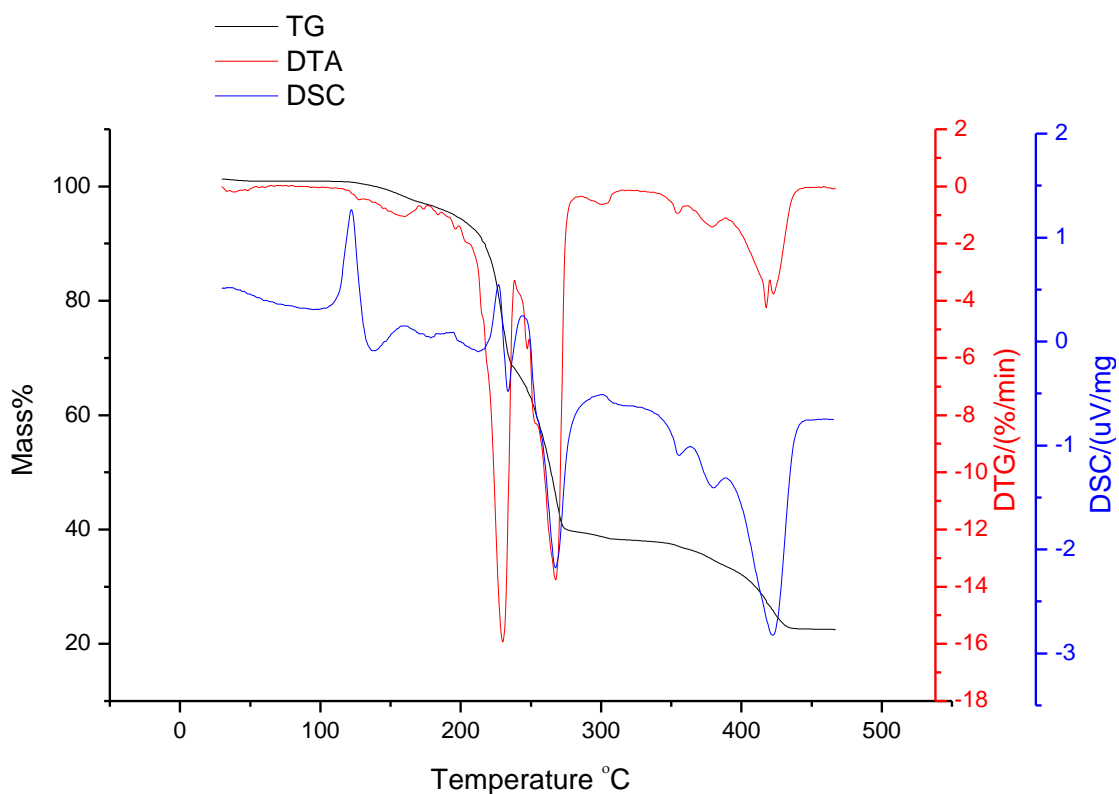
Κατά την ανάλυση αυτή, η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ μίας ένωσης και ενός υλικού αναφοράς μετριέται συναρτήσει της θερμοκρασίας, καθώς η ένωση και το υλικό αναφοράς υποβάλλονται σε προγραμματισμένη μεταβολή της θερμοκρασίας. Η DTA μπορεί να δείξει θερμικά φαινόμενα, που δε συνοδεύονται από μεταβολή μάζας, όπως τήξη, κρυστάλλωση, υαλώδης μετάβαση. Ως υλικό αναφοράς χρησιμοποιείται συνήθως α-αλούμινα. Το εξεταζόμενο δείγμα μαζί με το δείγμα αναφοράς υπόκεινται σε ένα ελεγχόμενο πρόγραμμα θέρμανσης, το οποίο είναι συνήθως γραμμικό σε σχέση με το χρόνο. Αρχικά, εφ' όσον το δείγμα δεν υπόκειται σε καμία φυσική ή χημική μεταβολή, δεν υπάρχει θερμοκρασιακή διαφορά ανάμεσα στο δείγμα και το υλικό αναφοράς, ενώ με την πάροδο του χρόνου αυτή αναπτύσσεται κατά Δt , κατά την αφυδάτωση ή την τήξη του δείγματος, οπότε και λαμβάνει χώρα ενδόθερμη μεταβολή, η θερμοκρασία του δείγματος είναι χαμηλότερη από αυτήν του υλικού αναφοράς.

4.6.3 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

Είναι μία θερμοαναλυτική τεχνική, κατά την οποία μετριέται η διαφορά θερμότητας που απαιτείται για την αύξηση της θερμοκρασίας μίας ένωσης και της ουσίας αναφοράς, συναρτήσει της θερμοκρασίας. Και οι δύο ουσίες – δείγμα και αναφορά – διατηρούνται στην ίδια θερμοκρασία κάθε στιγμή κατά τη διεξαγωγή της μέτρησης. Γενικά, κατά την ανάλυση η θερμοκρασία του δείγματος αυξάνεται γραμμικά με τον χρόνο. Επιπλέον, η ένωση αναφοράς θα πρέπει να έχει μία καλά ορισμένη θερμοχωρητικότητα, υψηλότερη από το εύρος θερμοκρασίας του πειράματος. Η βασική αρχή της DSC είναι ότι όταν το δείγμα υφίσταται έναν φυσικό μετασχηματισμό (αλλαγή κατάστασης), ώστε να μπορέσουν να διατηρηθούν οι δύο ουσίες στην ίδια θερμοκρασία, θα υπάρξει περισσότερη ή λιγότερη ροή θερμότητας στο εξεταζόμενο δείγμα, αναλόγως με το αν η διαδικασία είναι εξώθερμη, π.χ. κρυσταλλοποίηση, ή ενδόθερμη π.χ. τήξη. Παρατηρώντας τη διαφορά στη ροή θερμότητας μεταξύ του δείγματος και της αναφοράς, είναι δυνατόν να μετρηθεί η ποσότητα της θερμότητας που απορροφάται ή απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια αυτών των μεταβάσεων.



Σχήμα 14. TG-DTA DSC διάγραμμα του συμπλόκου **1**



Σχήμα 15. TG-DTA DSC διάγραμμα του συμπλόκου **2**

Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, θερμική ανάλυση στις σκόρες των συμπλόκων ενώσεων $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**), υπό αέρα, ενώ ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας είναι $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ από το περιβάλλον έως $500\text{ }^\circ\text{C}$ (**Σχ. 14, 15**). Οι ενώσεις **1** και **2** αποσυντίθενται με πέντε ενδοθερμικά (ένδο) ή εξωθερμικά (έξω) βήματα σε μέσες θερμοκρασίες. Για τη σύμπλοκη ένωση **1**: 92.7 (ένδο), 138.2 (ένδο) 197.8 (ένδο), 205.0 (έξω) και 274.0 (έξω) $^\circ\text{C}$ (**Σχ. 14**) και για τη σύμπλοκη ένωση **2**: 161.7 (ένδο), 228.3 (ένδο), 268.9 (έξω), 357.5 (έξω) και 424 (έξω) (**Σχ. 15**). Οι συνολικές απώλειες μάζας είναι 65,26 % (**1**) και 78,38 % (**2**). Το υπόλοιπο 34,34% (**1**) και 21,62 % (**2**) αντιστοιχεί στο οξείδιο του χαλκού (θεωρητικός υπολογισμός: 32,10 % (**1**) και 18,83 % (**2**)).

4.7 Μαγνητικές Μετρήσεις

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις μαγνητικής ευαισθησίας για τις σύμπλοκες ενώσεις $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**), προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση d-d στη σύμπλοκη ένωση **1**, καθώς το σύμπλοκο αυτό είναι διμεταλλικό όπως αποδείχθηκε από την περίθλαση ακτινών-X μονοκρυστάλλου, αλλά και για να εξακριβωθεί η ηλεκτρονική διαμόρφωση d^9 του Cu (II) και στα δύο σύμπλοκα (**1** και **2**).

Η υπολογισμένη μαγνητική διπολική ροπή ισούται με 1.23 B.M για τη σύμπλοκη ένωση **1** και αποδείχθηκε χαμηλότερη από τη θεωρητικά αναμενόμενη 1.73 B.M. για ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο. Αυτή η διαπίστωση επιβεβαιώνει τη μαγνητική ανταλλαγή μεταξύ των δύο ιόντων Cu (II) [117], άρα υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο μεταλλικών κέντρων. Αυτό οφείλεται στη στενή απόσταση χαλκού-χαλκού, γνωστή ως χαλκοφιλία, η οποία βρέθηκε ίση με 2.613(1) Å.

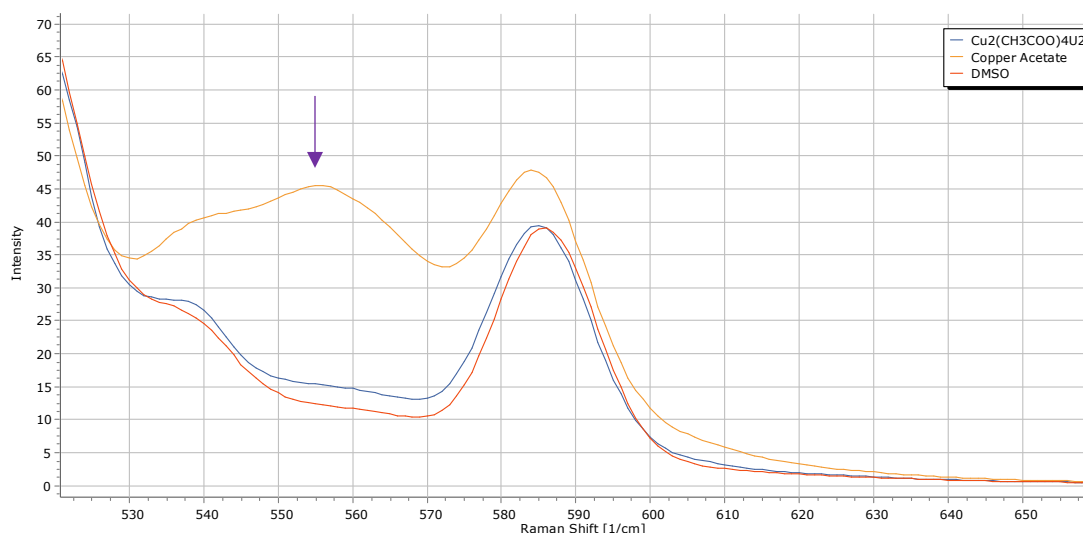
Η μαγνητική διπολική ροπή που υπολογίστηκε για το σύμπλοκο **2** ισούται με 1.48 B.M., τιμή που επιβεβαιώνει το ένα ζεύγος ηλεκτρονίων, όπως ήταν αναμενόμενο.

4.8 Φασματοσκοπία Φθορισμού

Η ύπαρξη των συμπλόκων $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**) σε διάλυμα επαληθεύεται επίσης μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν διαλύματα 2 ml των συμπλόκων ενώσεων **1-2**, συγκέντρωσης 10^{-4} M σε διαλύτη DMSO, καθώς και τα αντίστοιχα διαλύματα των υποκαταστατών τους και λήφθηκαν τα ακόλουθα φάσματα (Σχ. 16, 17).

$\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$

Το **σχήμα 16** απεικονίζει το φάσμα εκπομπής της σύμπλοκης ένωσης **1** και του υποκαταστάτη $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ σε διαλύτη DMSO κατά τη διέγερσή τους με ακτινοβολία σε μέγιστη διέγερση $\lambda_{\text{max}}^{\text{exc}} = 500$ nm. Παρατηρείται απόσβεση κατά 66% στο φθορισμό του οξικού χαλκού που εκπέμπεται σε μέγιστη εκπομπή $\lambda_{\text{max}}^{\text{exc}} = 555$ nm, λόγω του συντονισμού του με τον υποκαταστάτη ουρία.

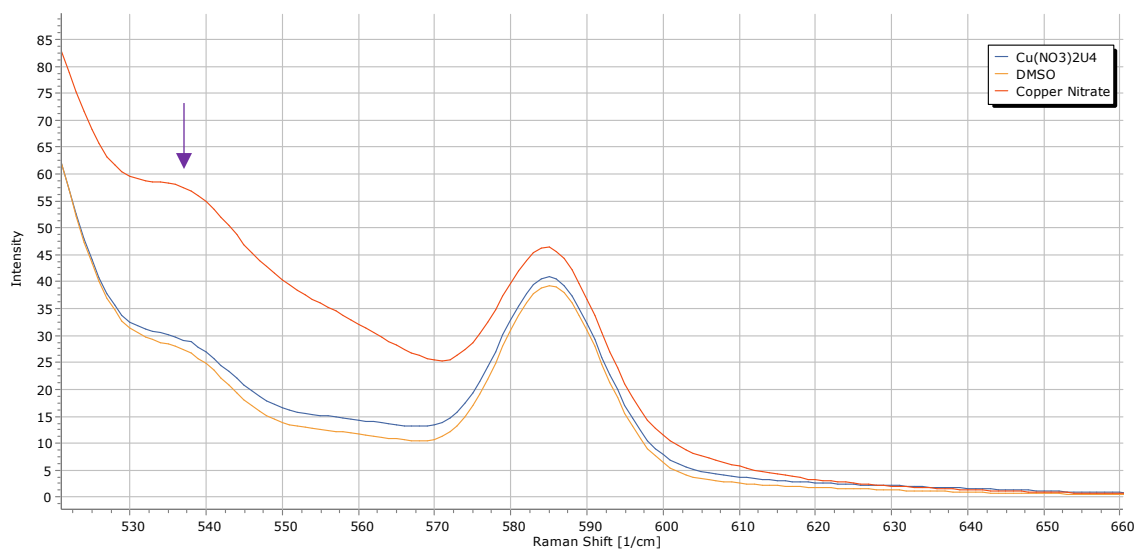


Σχήμα 16. Φάσμα φθορισμού του συμπλόκου **1** με τον υποκαταστάτη οξικό χαλκό σε διαλύτη

DMSO

Cu(NO₃)₂U₄

Το **σχήμα 17** απεικονίζει, ομοίως, το φάσμα εκπομπής της σύμπλοκης ένωσης **2** με τον υποκαταστάτη Cu(NO₃)₂*3H₂O σε διαλύτη DMSO κατά τη διέγερσή τους με ακτινοβολία σε μέγιστη διέγερση $\lambda_{\max}^{\text{exc}} = 500$ nm. Παρατηρείται απόσβεση κατά 48% στο φθορισμό του νιτρικού χαλκού που εκπέμπεται σε μέγιστη εκπομπή $\lambda_{\max}^{\text{exc}} = 535$ nm, λόγω του συντονισμού του με τον υποκαταστάτη ουρία.



Σχήμα 17. Φάσμα φθορισμού του συμπλόκου **2** με τον υποκαταστάτη νιτρικό χαλκό σε διαλύτη DMSO

Κεφάλαιο 5^ο

Πειραματικά Αποτελέσματα

5. Πειραματικά Αποτελέσματα

Σκοπός της παρούσας διατριβής αποτελεί η ανίχνευση και ο προσδιορισμός της ουρίας και των συμπλόκων ενώσεων της στο δακρυϊκό υγρό για την ανίχνευση ασθενειών της οφθαλμικής επιφάνειας και συγκεκριμένα της ξηροφθαλμίας. Η ουρία, όμως, ως οργανικό μόριο δεν απορροφά στο ορατό και δε φθορίζει. Για το λόγο αυτό, προστέθηκαν τα μέταλλα οξικού και νιτρικού χαλκού, τα οποία συμπλοκοποιήθηκαν με την ουρία και προέκυψαν οι σύμπλοκες ενώσεις **1-2** που αναλύθηκαν και χαρακτηρίστηκαν παραπάνω.

Επόμενο βήμα για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αποτέλεσε η χρήση δείγματος δακρυϊκού υγρού, το οποίο χορηγήθηκε, εθελοντικά, από υγιείς συνεργάτες-μέλη του εργαστηρίου. Δακρυϊκό υγρό είναι δυνατό να συλλεχθεί με δύο τρόπους, οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε κλινική ρουτίνα για τον προσδιορισμό της υδατικής ανεπάρκειας παραγωγής δακρύων. Αυτοί οι τρόποι είναι οι εξής:

- Μέσω γυάλινων μικροσωληνίσκων [118, 119]
- Μέσω ταινιών Schirmer και μετέπειτα έκλουση των δακρύων από τις ταινίες μέσω συμβατού buffer κατάλληλο για περαιτέρω ανάλυση [120]



Εικόνα 23. Λήψη δακρυϊκού υγρού μέσω ταινίας Schirmer [1]

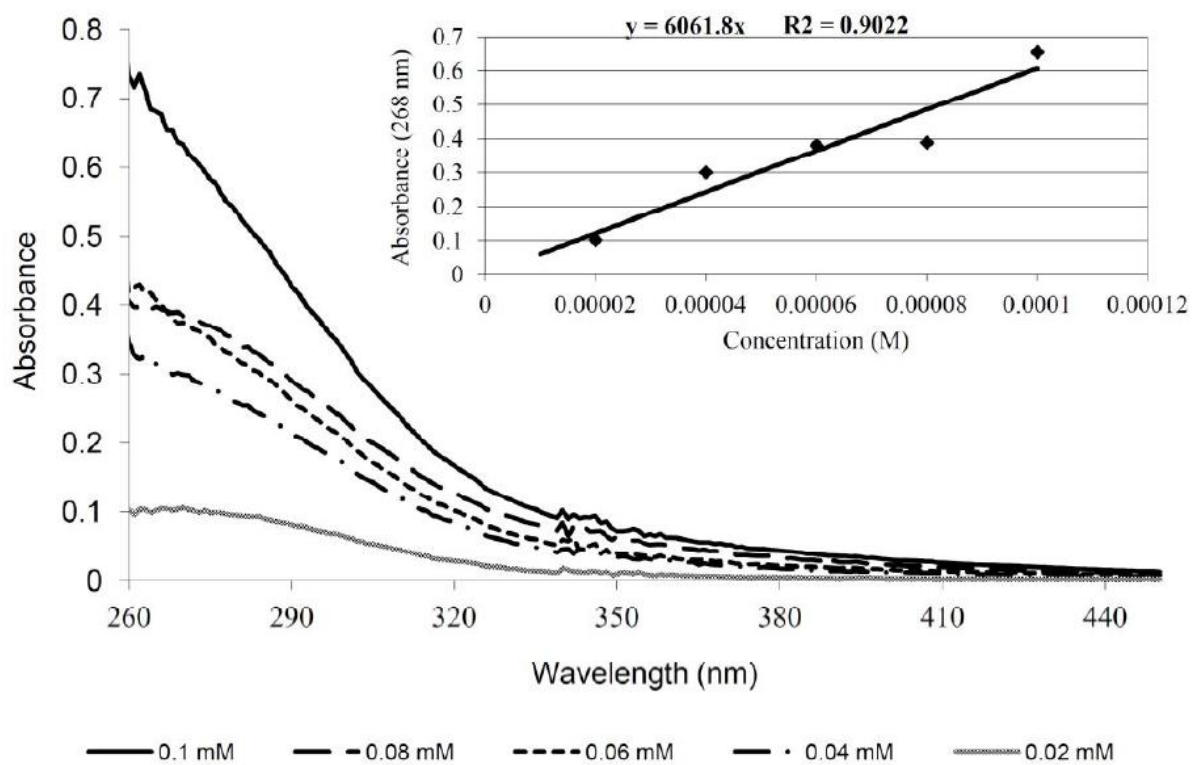
Στο εργαστήριο πιθανά μέσα για τη λήψη δακρυϊκού υγρού αποτελούσαν οι βατονέτες και το διηθητικό χαρτί Whatman. Επιλέχθηκε το τελευταίο, καθώς πλησιάζει περισσότερο τις ταινίες Schirmer που χρησιμοποιούνται ευρέως κλινικά.

Κατά τη λήψη των δειγμάτων δακρυϊκού υγρού, οι εθελοντές βρίσκονταν σε ηρεμία με σκοπό τη λήψη βασικών δακρύων, καθώς οποιοδήποτε ερέθισμα θα προκαλούσε αλλαγή στη σύσταση του δακρυϊκού υγρού και θα οδηγούμασταν σε διαφορετικά αποτελέσματα [9].

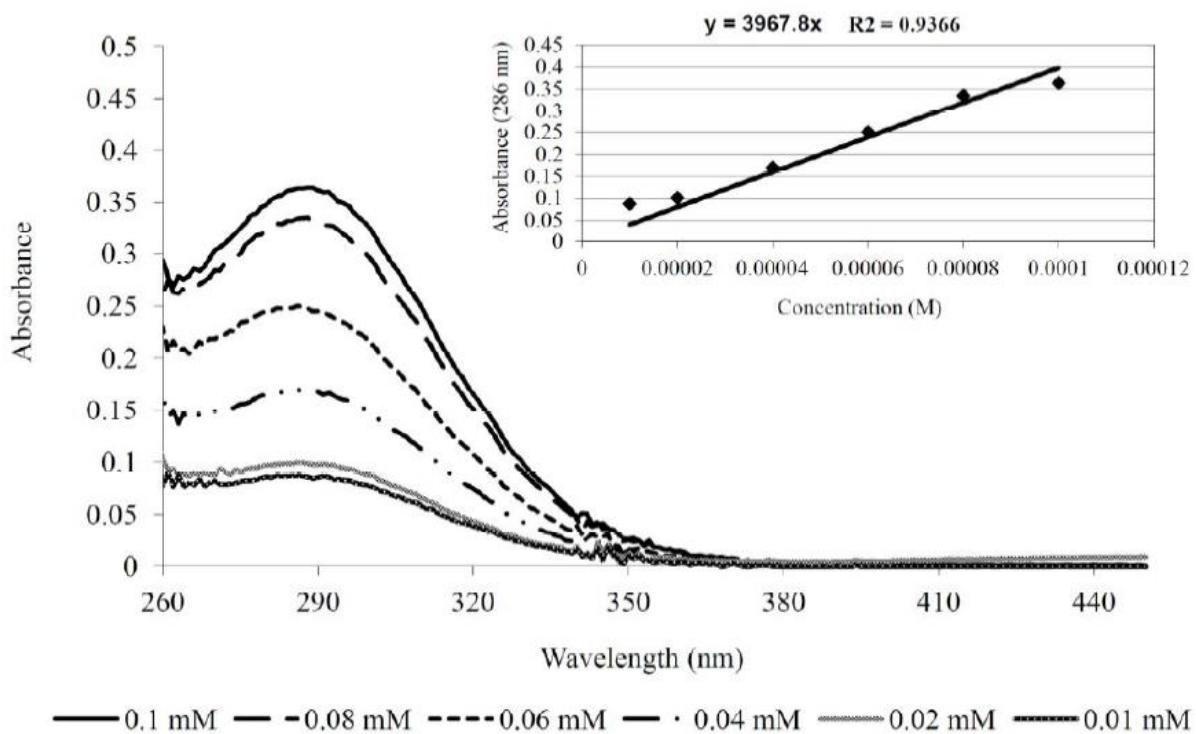
5.1 Φασματοσκοπία Υπεριώδους - Ορατού (UV-Vis)

Η ύπαρξη των συμπλόκων $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**) σε διάλυμα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, επαληθεύεται από τα υπεριώδη φάσματα τους προς τα αντίστοιχα των υποκαταστατών τους, ουρία, άλας οξικού και άλας νιτρικού χαλκού αντίστοιχα. Για το λόγο, αυτό, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα των συμπλόκων **1-2** και των αντίστοιχων υποκαταστατών, συγκέντρωσης 10^{-4} M σε διαλύτη DMSO και λήφθηκαν τα φάσματα στην υπεριώδη περιοχή (Σχ. **9, 10**).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση των ενώσεων **1-2** σε τελικές συγκεντρώσεις 10^{-4} , 8×10^{-5} , 6×10^{-5} , 4×10^{-5} , 2×10^{-5} και 10^{-5} M και λήφθηκαν τα φάσματα UV στην περιοχή 400-190 nm, εκ των οποίων προέκυψαν οι πρότυπες καμπύλες των ενώσεων **1-2**. Στις πρότυπες καμπύλες απεικονίζεται η απορρόφηση συναρτήσει των συγκεντρώσεων των συμπλόκων **1-2** (Σχ. **18, 19**).



Σχήμα 18. Φάσμα UV του συμπλόκου **1** σε διαλύτη DMSO (10^{-4} , 8×10^{-5} , 6×10^{-5} , 4×10^{-5} , 2×10^{-5} και 10^{-5} M) και Πρότυπη Καμπύλη απορρόφησης συναρτήσει συγκεντρώσεων



Σχήμα 19. Φάσμα UV του συμπλόκου **2** σε διαλύτη DMSO (10^{-4} , 8×10^{-5} , 6×10^{-5} , 4×10^{-5} , 2×10^{-5} και 10^{-5} M) και Πρότυπη Καμπύλη απορρόφησης συναρτήσει συγκεντρώσεων

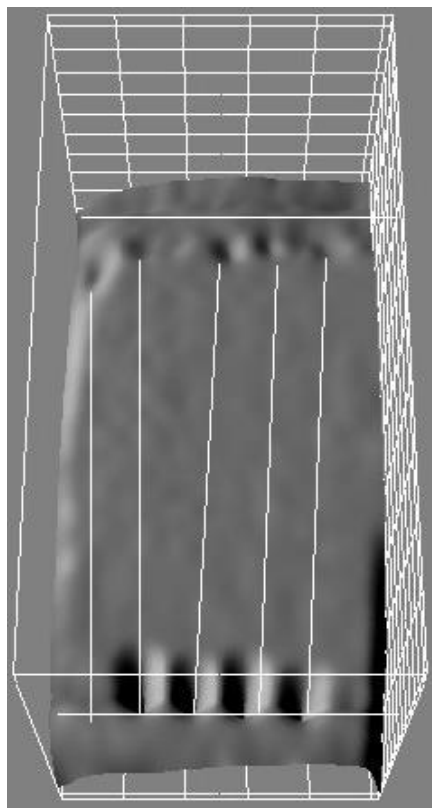
Τέλος, πραγματοποιήθηκε απόπειρα συσχέτισης του δακρυϊκού υγρού με τα σύμπλοκα **1-2**, χωρίς κάποιο αποτέλεσμα, οπότε τα πειράματα με χρήση Φασματοσκοπίας UV-Vis ολοκληρώθηκαν σε αυτό το σημείο.

5.2 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ουρίας σε διάλυμα DMSO προέκυψε από τα γραφήματα που προήρθαν από τις κορυφές της έντασης των σημείων-spots των χρωματογραφημάτων TLC. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων των συμπλόκων ενώσεων $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**), τιτλοδότηση αυτών, παρασκευή διαλυμάτων χαλκών και εμφύσηση σε αυτά δείγμα δακρυϊκού υγρού, καθώς και προετοιμασία του θαλάμου ανάπτυξης. Ο θάλαμος πριν από τη χρήση εξισορροπήθηκε με την εισαγωγή σε αυτόν σύστημα διαλυτών ddH₂O/MeCN σε αναλογία 5:5 (v/v) και αφήθηκε σε ηρεμία για 15 min. Για την πυκνομετρική αξιολόγηση των πλακών TLC χρησιμοποιήθηκε το σύστημα τεκμηρίωσης γέλης Uvitec Cambridge Gel Documentation, το οποίο λειτουργούσε με λογισμικό UVI-1D.

5.2.1 Τιμές R_f

Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουρίας, εξετάστηκαν οι τιμές R_f του κάθε συμπλόκου με τους αντίστοιχους υποκαταστάτες για την επαλήθευση του ποιοτικού προσδιορισμού της ουρίας. Παρασκευάστηκαν, λοιπόν, διαλύματα των συμπλόκων και των υποκαταστατών σε διαλύτη DMSO, συγκέντρωσης 10⁻⁴ M. Στη συνέχεια, σε μία πλάκα TLC τοποθετήθηκαν διαλύματα 2 μl σε μορφή κηλίδων-spots και ο διαλύτης αφήθηκε να εξατμιστεί. Κατά τη διάρκεια αυτή, ο θάλαμος ανάπτυξης εξισορροπήθηκε με σύστημα διαλυτών ddH₂O/MeCN σε αναλογία 5:5 (v/v). Μετά το πέρας 15 min τοποθετήθηκε η πλάκα και αφήθηκε να αναπτυχθεί. Ύστερα από την απομάκρυνσή της από το θάλαμο, αφήθηκε να ξηραθεί από διαλύτες και επεξεργάστηκε με τη χρήση συσκευής γέλης Uvitec Cambridge Gel Documentation.



Εικόνα 24. Πλάκα TLC με τις διαφορετικές τιμές R_f συμπλόκων και υποκαταστατών

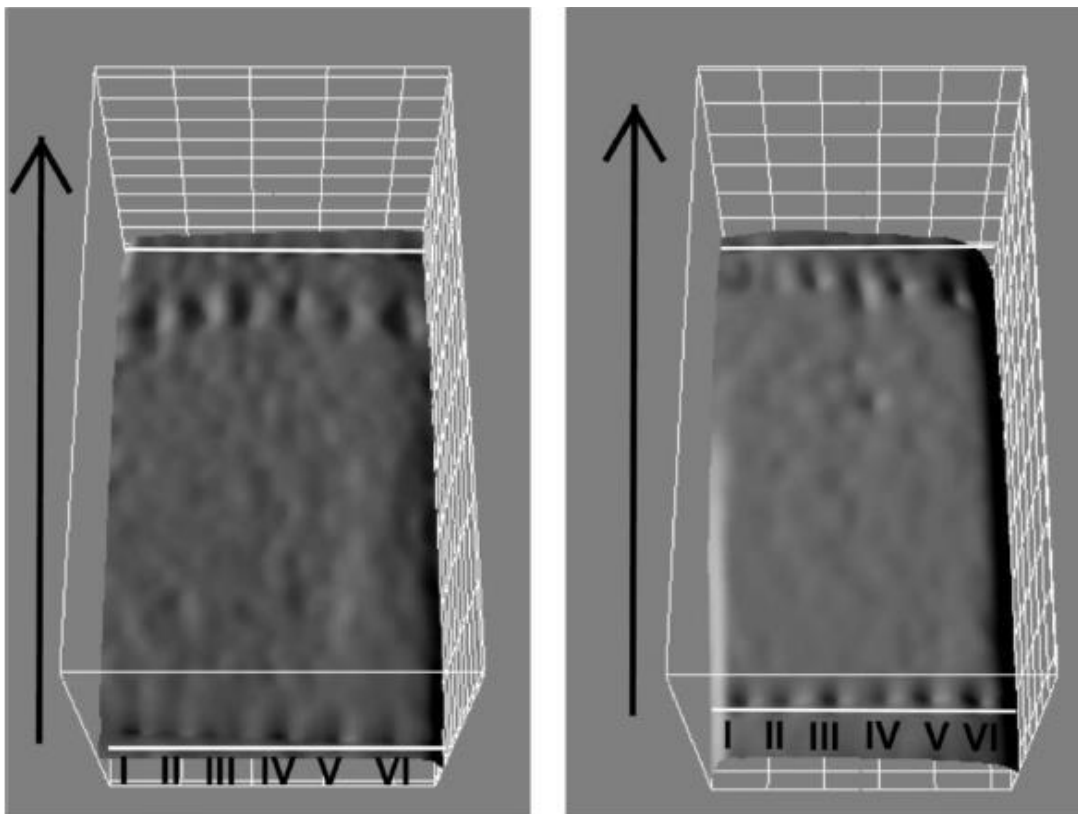
Η απόσταση που διασχίζει κάθε συστατικό εκφράζεται ως παράγοντας ταχύτητας ή καθυστέρησης (R_f). Οι τιμές R_f υπολογίζονται διαιρώντας την απόσταση, που διέσχισε ένα συστατικό, με την απόσταση μεταξύ της αρχής και του μετώπου του διαλύτη, δηλαδή η απόσταση που διένυσε ο διαλύτης. Επομένως, όλες οι τιμές R_f θα βρίσκονται μεταξύ 0 και 1. Οι τιμές R_f μετρώνται από την αρχή όπου τοποθετήθηκε η αρχική κηλίδα έως το κέντρο αυτής [121].

Στην **εικόνα 24** εμφανίζονται με σειρά από αριστερά προς δεξιά οι εξής κηλίδες: (i) ουρία, (ii) νιτρικός χαλκός, (iii) οξικός χαλκός, (iv) σύμπλοκο **2**, (v) σύμπλοκο **1**. Σύμφωνα με τη σχέση υπολογισμού των τιμών R_f βρίσκονται τα εξής αποτελέσματα: (i) 0.86, (ii) 0.97 (iii) 0.88 (iv) 0.90 (v) 0.95.

5.2.2 Αλληλεπίδραση συμπλόκων με διαλύματα δακρυϊκού υγρού

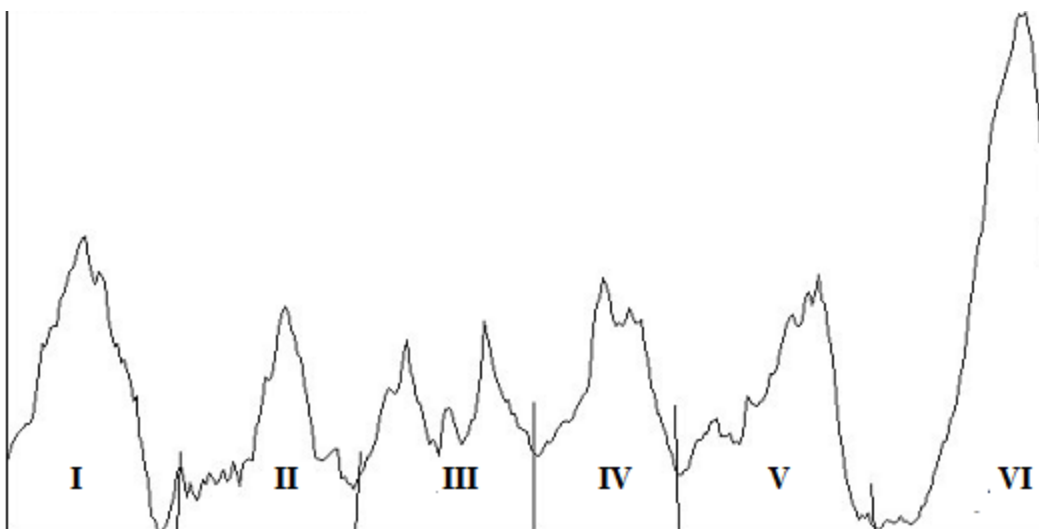
Για τον προσδιορισμό της ουρίας στα δείγματα δακρυϊκού υγρού, χρησιμοποιήθηκαν τα γραφήματα TLC των συμπλόκων $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**) και των αντίστοιχων χαλκών με δείγμα δακρυϊκού υγρού. Από τα γραφήματα αυτά προέκυψαν οι εντάσεις των κορυφών εκ των οποίων κατασκευάστηκαν οι πρότυπες καμπύλες έντασης των συμπλόκων **1-2** συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκαν, αρχικά, διαλύματα των συμπλόκων **1-2** συγκέντρωσης 10^{-4} M και τιτλοδοτήθηκαν στις εξής συγκεντρώσεις: 10^{-4} , 8×10^{-5} , 6×10^{-5} , 4×10^{-5} και 2×10^{-5} , και παράλληλα παρασκευάστηκε διάλυμα οξικού και νιτρικού χαλκού με δείγμα δακρυϊκού υγρού συγκέντρωσης 10^{-4} M. Το δείγμα δακρυϊκού υγρού λήφθηκε από τους υγιείς εθελοντές με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω μέσω διηθητικού χαρτιού Whatman, το οποίο αφέθηκε στα διαλύματα για 20 min. Όταν αφαιρέθηκε ακολούθησε η διαδικασία του πειράματος. Σε δύο πλάκες TLC τοποθετήθηκε ποσότητα 2 μl σε μορφή κηλίδων-spots από κάθε διάλυμα (για το σύμπλοκο **1** οι κηλίδες κατανεμήθηκαν ως εξής: Οξικός χαλκός-δακρυϊκό υγρό, 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 6×10^{-5} , 8×10^{-5} , και 10^{-4} M οι τιτλοδοτήσεις από τα διαλύματα του συμπλόκου **1**. Ομοίως για το σύμπλοκο **2**: Νιτρικός χαλκός-δακρυϊκό υγρό, 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 6×10^{-5} , 8×10^{-5} , και 10^{-4} M οι τιτλοδοτήσεις του συμπλόκου **2**) και ο διαλύτης αφέθηκε να εξατμιστεί. Κατά τη διάρκεια όλης αυτής της διαδικασίας, ο θάλαμος ανάπτυξης εξισορροπήθηκε σε σύστημα διαλυτών ddH₂O/MeCN σε αναλογία 5:5 (v/v). Μετά το πέρας 15 min τοποθετήθηκε η κάθε πλάκα στο εσωτερικό του θαλάμου και αφέθηκε να αναπτυχθεί. Ύστερα από την απομάκρυνσή των πλακών από το θάλαμο, αφέθηκαν προς εξάτμιση των διαλυτών και επεξεργάστηκαν με τη χρήση συσκευής γέλης Uvitec Cambridge Gel Documentation. Μέσω προγράμματος τεκμηρίωσης Image J, οι ανεπτυγμένες πλάκες TLC των **1-2** απεικονίζονται σε 3-D μορφή στην **εικόνα 25**.

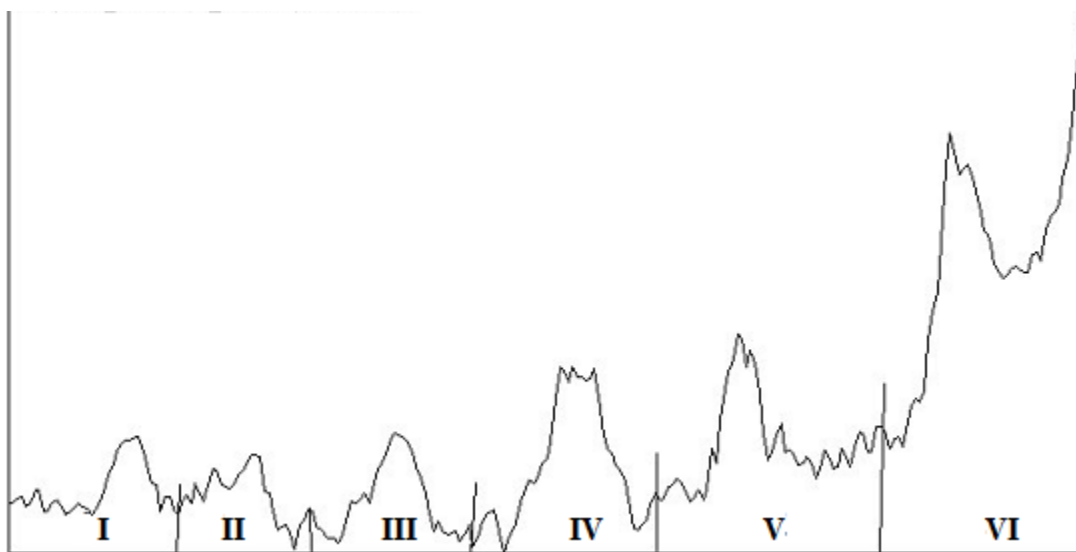


Εικόνα 25. 3D-πυκνομετρία του **1** (αριστερά) και **2** (δεξιά)
(δάκρυα/οξικός χαλκός ή νιτρικός χαλκός) σε διαλύματα DMSO

Η ένταση των κηλίδων (Int: Intensity) των συμπλόκων **1-2** σε 10^{-4} , 8×10^{-5} , 6×10^{-5} , 4×10^{-5} , 2×10^{-5} , και του δείγματος δακρυϊκού υγρού σε διάλυμα του αντίστοιχου χαλκού προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας λογισμικό Image J [122] και εμφανίζονται σε μορφή κορφών (**Εικ. 26, 27**).

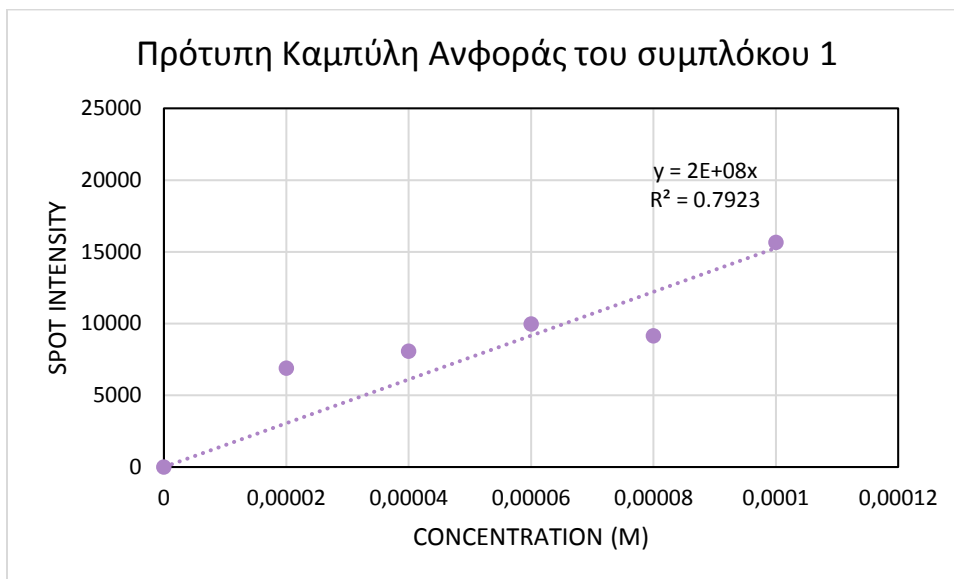


Εικόνα 26. Ένταση των κορυφών του συμπλόκου 1 ((I): δείγμα δακρύων/οξικός χαλκός (II): 2×10^{-5} (III): 4×10^{-5} (IV): 6×10^{-5} (V): 8×10^{-5} (VI): 10^{-4} M).

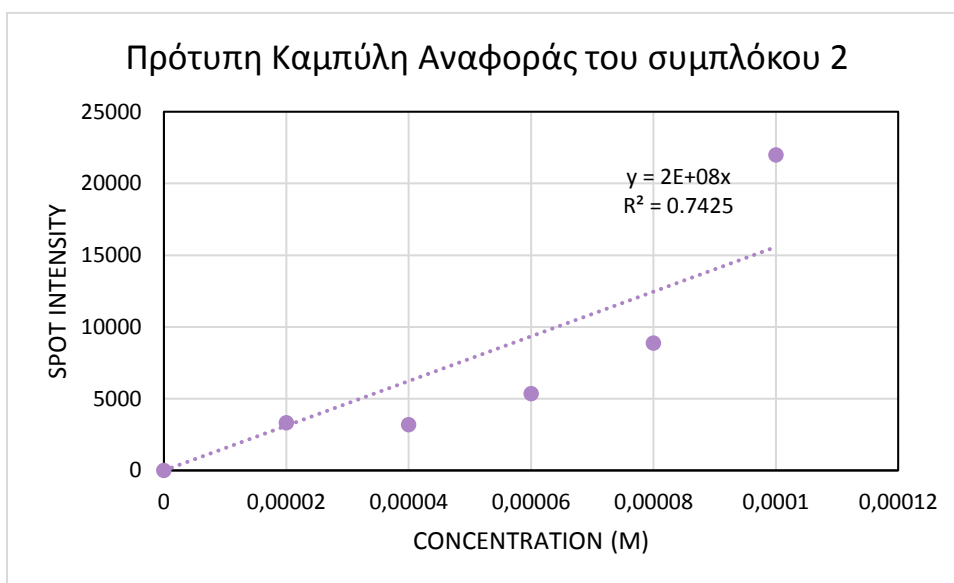


Εικόνα 27. Ένταση των κορυφών του συμπλόκου 2 ((I): δείγμα δακρύων/νιτρικός χαλκός (II): 2×10^{-5} (III): 4×10^{-5} (IV): 6×10^{-5} (V): 8×10^{-5} (VI): 10^{-4} M).

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν δύο πρότυπες καμπύλες αναφοράς για τα δύο σύμπλοκα, αντίστοιχα, έντασης κηλίδων συναρτήσεως των συγκεντρώσεων, που προέκυψαν από τις κορυφές των εντάσεων (Εικ. 26, 27) και απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα:



Σχήμα 20. Ένταση κηλίδων συναρτήσεως κορυφών του συμπλόκου 1



Σχήμα 21. Ένταση κηλίδων συναρτήσεως κορυφών του συμπλόκου 2

Η συγκέντρωση των συμπλόκων **1-2**, λοιπόν, στο διάλυμα δείγματος δακρύων μετά την προσθήκη οξικού ή νιτρικού χαλκού προσδιορίστηκε από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$Int = 2 \times 10^8 \times Conc \text{ (1)}$$

$$Int = 2 \times 10^8 \times Conc \text{ (2)}$$

Συνεπώς, η ποσότητα της ουρίας στα δείγματα καθορίζεται από τη στοιχειομετρία των συμπλόκων, μέσω των εξισώσεων (1) και (2) ως εξής:

- 1:2 για το σύμπλοκο **1**
- 1:4 για το σύμπλοκο **2**.

Οι τιμές για τη συγκέντρωση της ουρίας είναι 102 και 78 μM , αντίστοιχα, οι οποίες μετατρέπονται σε 0.61 και 0.47 mg/dL. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι οι φυσιολογικές τιμές της ουρίας στο πλάσμα του αίματος κυμαίνονται μεταξύ 10-50 mg/dL [123], ενώ σε ασθενείς που πάσχουν από ξηροφθαλμία έχει παρατηρηθεί μειωμένη συγκέντρωση της ουρίας στο δακρυϊκό υγρό ασθενών.

5.2.3 Στατιστική Πειραμάτων

Θεωρήθηκε σημαντικό να επαναληφθούν τα πειράματα και να δημιουργηθεί μία στατιστική των αποτελεσμάτων, καθώς δεν είχαμε στη διάθεσή μας δείγμα δακρυϊκών υγρών από ασθενείς που πάσχουν από ξηροφθαλμία. Για το λόγο, αυτό, λήφθηκαν δώδεκα δείγματα δακρύου από τους εθελοντές με χρήση διηθητικού χαρτιού Whatman και τοποθετήθηκαν σε δώδεκα διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες μαζί με ποσότητα 2 ml οξικού/νιτρικού χαλκού σε τελική συγκέντρωση 10^{-4} M. Σκοπός του πειράματος στατιστικής αποτελεί η έγκυρη εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων προς τη λήψη ορθών αποτελεσμάτων, μέσω της ταξινόμησης, επεξεργασίας, παρουσίασης, ανάλυσης και ερμηνείας των διαφόρων δεδομένων που προέκυψαν από τα πειράματα.

Παρασκευάστηκαν, λοιπόν, έξι διαλύματα οξικού χαλκού σε DMSO και έξι διαλύματα νιτρικού χαλκού σε DMSO και μέσα σε αυτά εμβαπτίστηκαν διηθητικά χαρτιά Whatman που έφεραν δείγματα δακρύων προς τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων 10^{-4} M. Τα δείγματα αφέθηκαν για 20 min και στη συνέχεια διεξήχθησαν τα πειράματα TLC. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν ξανά διαλύματα των συμπλόκων **1-2** αρχικής συγκέντρωσης 10^{-4} M και τιτλοδοτήθηκαν σε τελικές συγκεντρώσεις 10^{-4} , 8×10^{-5} , 6×10^{-5} , 4×10^{-5} , 2×10^{-5} M, όπως ακριβώς πραγματοποιούνταν και τα προηγούμενα πειράματα.

Από τις γραφικές παραστάσεις που κατασκευάστηκαν προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: τέσσερα στα έξι δείγματα για το σύμπλοκο **1** εμφάνιζαν παρόμοια πρότυπη καμπύλη με την ίδια εξίσωση, ενώ για το σύμπλοκο **2** τρία στα έξι δείγματα εμφάνιζαν όμοια πρότυπη καμπύλη με την ίδια εξίσωση. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι υπάρχει στατιστική. Άρα οδηγούμαστε σε ασφαλή αποτελέσματα.

5.3 Φασματοσκοπία Φθορισμού

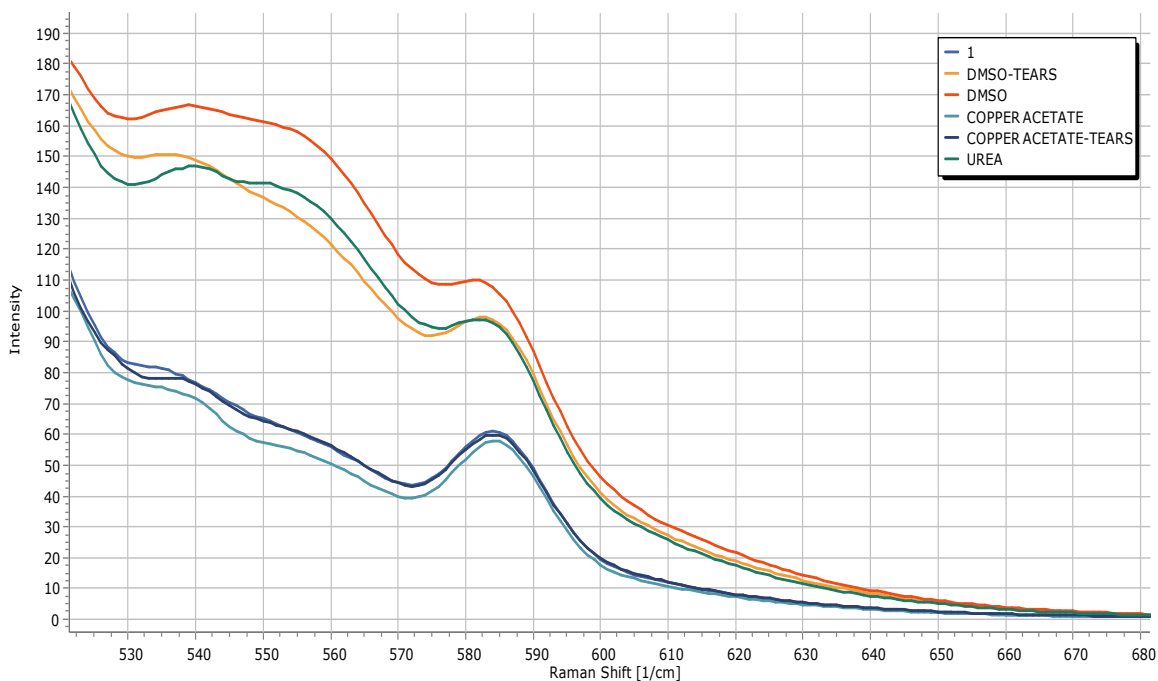
Η ύπαρξη των συμπλόκων $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**) σε διάλυμα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, επαληθεύθηκε επιτυχώς και μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού (βλ. Υποενότητα 4.8). Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της ουρίας, αλλά και προς συγκέντρωση περισσότερων δεδομένων σύγκρισης της αλληλεπίδρασης του δακρυϊκού υγρού με τις ενώσεις **1-2** λήφθηκαν φάσματα φθορισμού στην περιοχή διέγερσης $\lambda_{\text{max}}^{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$. Στην προκειμένη περίπτωση παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

- DMSO
- **1-2**
- Υποκαταστάτες
- DMSO-Δάκρυ
- Οξικός χαλκός-Δάκρυ
- Νιτρικός χαλκός-Δάκρυ

και τοποθετήθηκαν σε 9 διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Όλα τα διαλύματα ήταν όγκου 2 ml και συγκέντρωσης 10^{-4} M σε διαλύτη DMSO. Το διηθητικό χαρτί Whatman τοποθετήθηκε σε όλα τα διαλύματα, διότι όπως παρατηρήθηκε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων φθόριζε. Το χαρτί Whatman αφέθηκε στους δοκιμαστικούς σωλήνες και μετά το πέρας 20 min αφαιρέθηκε από τα διαλύματα και ακολούθησαν οι λήψεις των φασμάτων φθορισμού.

$\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$

Μετά την προετοιμασία των διαλυμάτων, λήφθηκαν τα φάσματα εκπομπής της σύμπλοκης ένωσης **1**, των υποκαταστατών ουρίας και οξικού χαλκού, καθώς και του οξικού χαλκού με δείγμα δακρυϊκού υγρού. Όπως αντιλαμβανόμαστε από τα φάσματα του διαλύτη, υπάρχει διαφορά εκπομπής που οφείλεται στην ύπαρξη του δακρυϊκού υγρού. Τα φάσματα στο **σχήμα 22** με κυανές αποχρώσεις απεικονίζουν το σύμπλοκο, τον οξικό χαλκό και τον οξικό χαλκό με δάκρυ. Παρατηρούνται ορισμένες μικρές διαφορές στην απόσβεση μεταξύ των χαλκών. Παρατηρείται απόσβεση στο φθορισμό του οξικού χαλκού που εκπέμπεται σε μέγιστη εκπομπή $\lambda_{\text{max}}^{\text{exc}} = 540\text{-}545 \text{ nm}$, σε σχέση με τη μέγιστη εκπομπή $\lambda_{\text{max}}^{\text{exc}} = 535 \text{ nm}$ του συμπλόκου **1**, λόγω του συντονισμού του με την ουρία, ενώ η μετατόπιση της ταινίας εκπομπής στα 540 nm του οξικού χαλκού με δείγμα δακρύου οφείλεται στην παρουσία του δακρυϊκού υγρού.

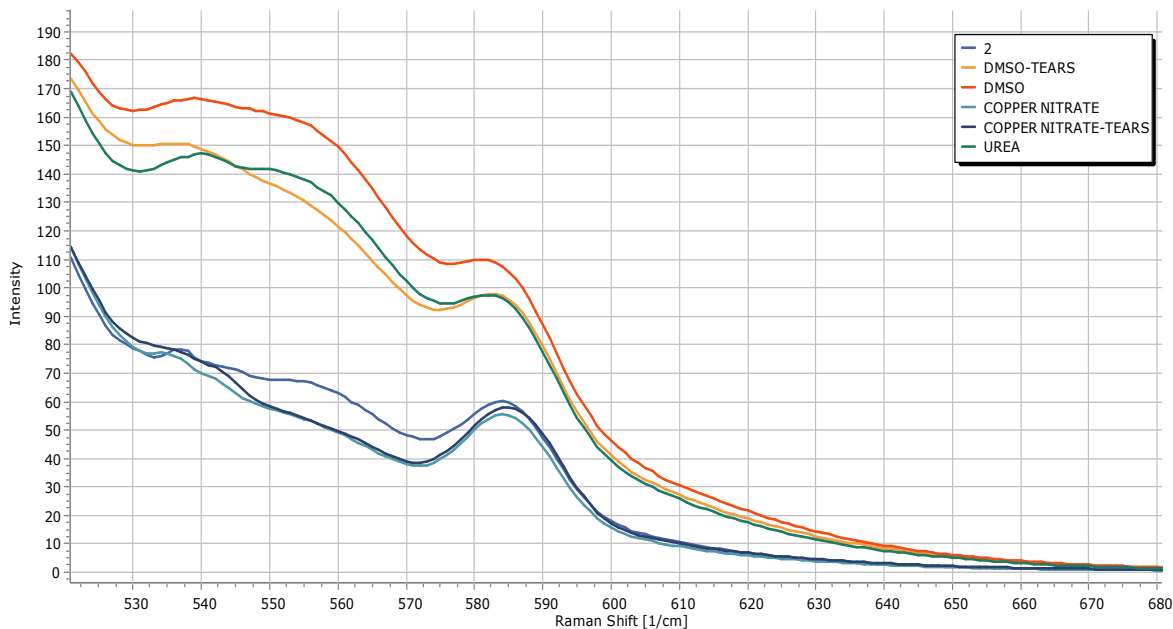


Σχήμα 22. Συγκεντρωτικό φάσμα εκπομπής του συμπλόκου **1**, της ουρίας, του οξικού χαλκού και του οξικού χαλκού με δακρυϊκό υγρό

✚ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$

Μετά την προετοιμασία των διαλυμάτων και για το δεύτερο σύμπλοκο, λήφθηκαν τα φάσματα εκπομπής της σύμπλοκης ένωσης **2**, των υποκαταστατών ουρίας και νιτρικού χαλκού, καθώς και του νιτρικού χαλκού με δακρυϊκό υγρό. Ομοίως, όπως ήταν αναμενόμενο στα φάσματα του διαλύτη, υπάρχει διαφορά εκπομπής που οφείλεται στην ύπαρξη του δακρυϊκού υγρού. Τα φάσματα στο **σχήμα 23** με κυανές αποχρώσεις απεικονίζουν το σύμπλοκο, το νιτρικό χαλκό και το νιτρικό χαλκό με δάκρυ. Παρατηρείται απόσβεση κατά 48% στο φθορισμό του νιτρικού χαλκού που εκπέμπεται σε μέγιστη εκπομπή $\lambda_{\text{max}}^{\text{exc}} = 535$ nm, ενώ η μετατόπιση της κορυφής στα 555 nm του συμπλόκου **2** οφείλεται στο συντονισμό

με την ουρία. Τέλος, η μετατόπιση της ταινίας εκπομπής στα 540 nm στο φάσμα νιτρικού χαλκού με δάκρυ οφείλεται στην ύπαρξη του δακρυϊκού υγρού.



Σχήμα 23. Συγκεντρωτικό φάσμα εκπομπής του συμπλόκου **2**, της ουρίας, του νιτρικού χαλκού και του νιτρικού χαλκού με δακρυϊκό υγρό

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, μας οδηγούν στον ποιοτικό προσδιορισμό της ουρίας, αλλά και προς συγκέντρωση περισσότερων δεδομένων σύγκρισης της αλληλεπίδρασης των δειγμάτων δακρύων με τα σύμπλοκα.

Κεφάλαιο 6^ο

Συζήτηση - Συμπεράσματα

6. Συζήτηση – Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία, συντέθηκαν και μελετήθηκαν δύο νέα σύμπλοκα οξικού και νιτρικού χαλκού (II) με ουρία με τύπους: $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$ (**1**) και $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$ (**2**), (U= ουρία). Τα σύμπλοκα, αυτά, χαρακτηρίστηκαν πλήρως μέσω στοιχειακής ανάλυσης, σημείου τήξεως, κρυσταλλογραφίας, μαγνητικών μετρήσεων, διαφορικής θερμικής ανάλυσης, θερμοβαρυμετρίας και θερμιδομετρίας διαφορικής σάρωσης. Ακολούθησε, επίσης, χαρακτηρισμός μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών IR, UV-Vis και φθορισμού.

Η σύμπλοκη ένωση **1** βρέθηκε να αποτελεί ένα νέο δι-πυρηνικό πολύμορφο. Τέσσερα άτομα οξυγόνου από τα τέσσερα οξικά γεφύρωσης και ένα από την τελική ουρία σχηματίζουν μια τετραγωνική πυραμιδική γεωμετρία γύρω από κάθε μέταλλο. Η μικρή απόσταση δεσμού χαλκού-χαλκού ίση με $2.613(1) \text{ \AA}$, στην περίπτωση της σύμπλοκης ένωσης **1**, συνεπάγεται αλληλεπίδραση d-d μεταξύ των μεταλλικών κέντρων (χαλκοφιλία) και είναι η μικρότερη απόσταση που έχει παρατηρηθεί στη βιβλιογραφία. Οι αλληλεπιδράσεις διαμοριακής σύνδεσης υδρογόνου οδηγούν σε ένα πολυμερικό δίκτυο 3D, σχηματίζοντας πόρους με διαστάσεις $4.549 \times 6.723 \text{ \AA}^2$.

Η κρυσταλλική δομή της σύμπλοκης ένωσης **2**, βρέθηκε να είναι ίδια με την ήδη γνωστή ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$) με το κωδικό όνομα ZIYVOS, σύμφωνα με την κρυσταλλογραφική βάση δεδομένων του Cambridge (CCDC). Ωστόσο, η επίλυση του συμπλόκου **2** ολοκληρώθηκε και ακολούθησε η μεταξύ τους σύγκριση. Δύο άτομα οξυγόνου από ομάδες νιτρικών και τέσσερα άτομα οξυγόνου από το μόριο της ουρίας σχηματίζουν ένα οκτάεδρο γύρω από το ιόν χαλκού (II) στην περίπτωση του συμπλόκου **2**. Διαμοριακές συνδέσεις μέσω αλληλεπιδράσεων σύνδεσης N [H] ... O οδηγούν σε πολυμερικό συγκρότημα που σχηματίζει 3D δίκτυο.

Από τις φασματοσκοπικές τεχνικές επιβεβαιώθηκε ο επιτυχής σχηματισμός των δύο νέων συμπλόκων, οπότε και συνεχίστηκε η μελέτη τους. Σκοπός παρασκευής των συμπλόκων αυτών, αποτελεί η χρήση τους στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της ουρίας, μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών και χρωματογραφικών αναλύσεων. Πιο συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα μελετήθηκαν με φασματοσκοπία φθορισμού για τον ποιοτικό προσδιορισμό και με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της ουρίας.

Η ποσότητα της ουρίας στο δείγμα δακρύων καθορίστηκε από τη στοιχειομετρία των συμπλόκων. Μέσω των φασματοσκοπικών και των χρωματογραφικών χαρακτηριστικών τους, προέκυψε η ανίχνευση και ο προσδιορισμός της ουρίας από τις γραμμομοριακές αναλογίες 1:2 για τη σύμπλοκη ένωση **1** και 1:4 για τη σύμπλοκη ένωση **2**, όπου 1:2 και 1:4 = σύμπλοκο : ουρία.

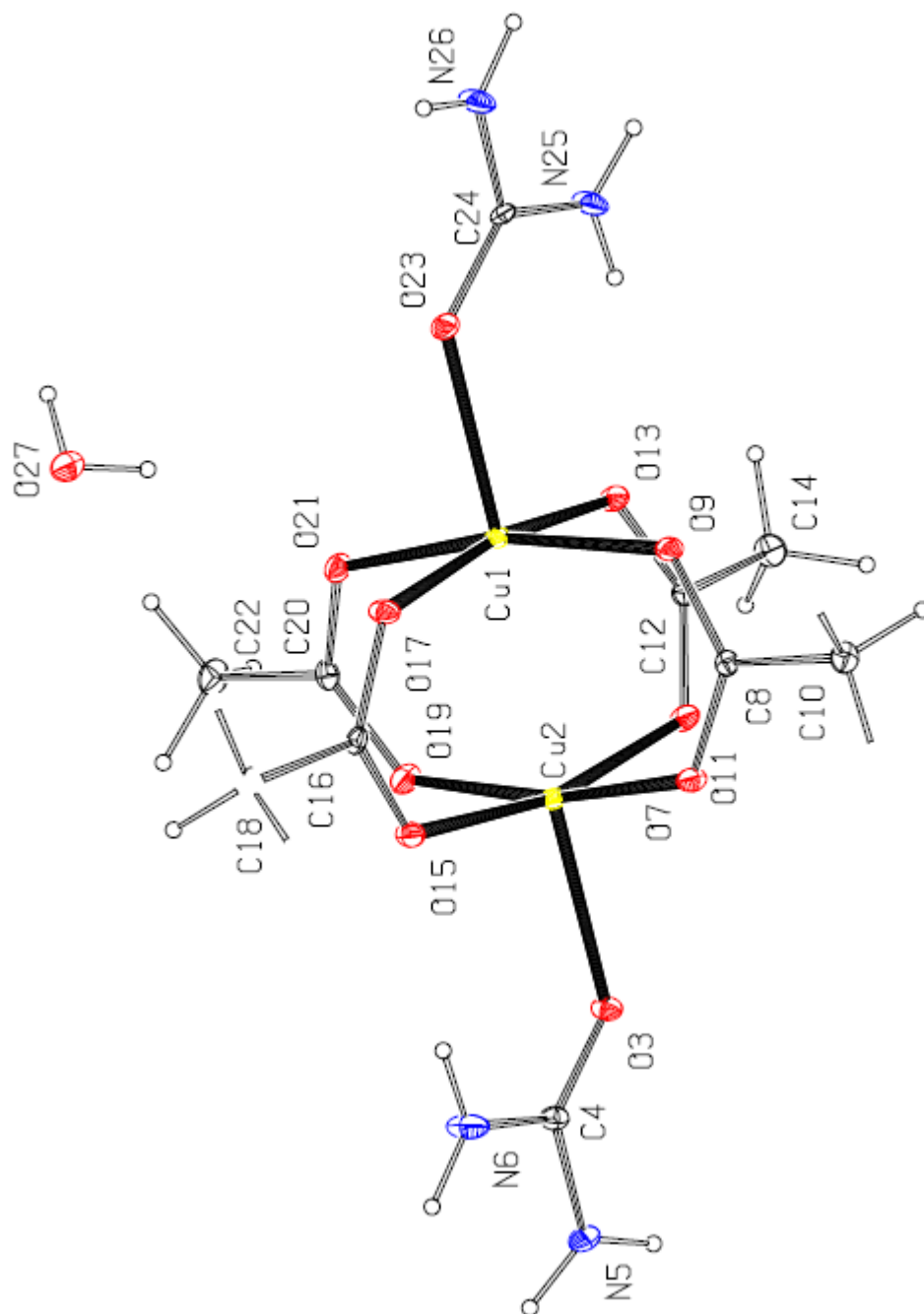
Προκειμένου να καθοριστεί ως πιο αξιόπιστη η συγκεκριμένη μέθοδος ανίχνευσης και προσδιορισμού της ουρίας στο δακρυϊκό υγρό, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περισσότερων πειραμάτων. Ωστόσο, η σημασία της ουρίας στη διάγνωση διαταραχών οφθαλμικής επιφάνειας και μη, καθιστούν το μεταβολίτη ουρία ως ένα νέο βιοδείκτη, αλλά και τη φασματοσκοπία φθορισμού και τη χρωματογραφία TLC πιθανές υποψήφιες μεθόδους για την ανάπτυξη μίας νέας μεθόδου προσδιορισμού ασθενειών του οφθαλμού.

Παράρτημα (Α)

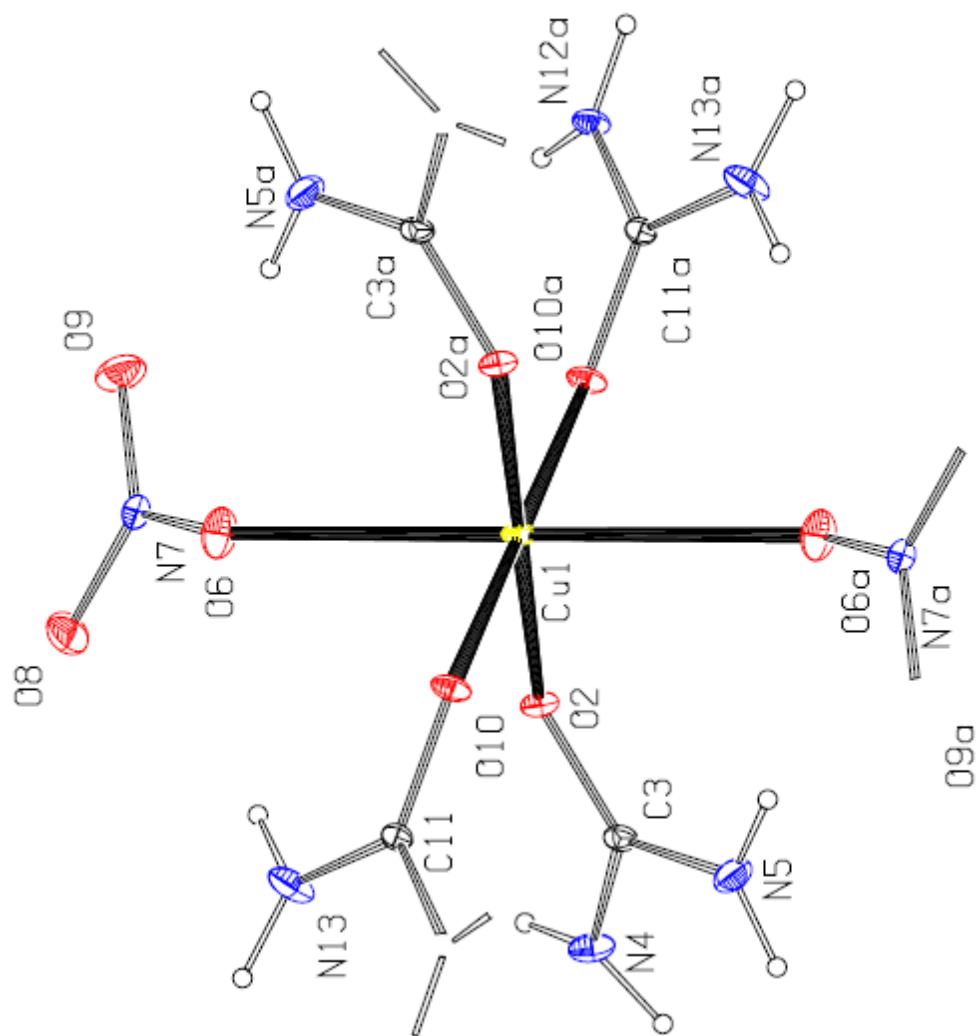
Διαγράμματα ORTEP

7. Παράρτημα (Α): Διαγράμματα ORTEP

7.1 Σύμπλοκη Ένωση 1



7.2 Σύμπλοκη Ένωση 2



Παράρτημα (B)

Αντιδραστήρια - Διαλύτες, Συσκευές
- Όργανα

8. Παράρτημα (B): Αντιδραστήρια-Διαλύτες-Συσκευές-Όργανα

8.1 Αντιδραστήρια και Διαλύτες


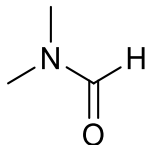
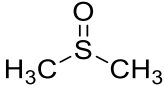
Τα αντιδραστήρια διένυδρος οξικός χαλκός (II), τριένυδρος νικτρικός χαλκός (II) και ουρία είναι διαθέσιμα στο εμπόριο από την εταιρεία Merck και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικός καθαροί (reagent grade) και προέρχονται από την εταιρεία Riedel-deHaen. Οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι διαλύτες καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν το διμέθυλο σουλφοξείδιο (DMSO), η μεθανόλη (CH₃OH), το ακετονιτρίλιο (CH₃CN), και το δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O).

8.2 Πίνακας συντομογραφιών Αντιδραστηρίων και Διαλυτών

Για την καλύτερη δυνατή κατανόηση του περιεχομένου της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας, παρατίθεται σχετικός πίνακας με την ονοματολογία όλων των αντιδραστηρίων, καθώς και των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά το μεγαλύτερο μέρος διεξαγωγής των πειραμάτων μέσα στο εργαστήριο.

Πίνακας 12. Λίστα συντομογραφιών

Συμβολισμός	Ονοματολογία	Χημική Δομή
Οξικός Χαλκός	Άλας διένυδρου οξικού χαλκού (II)	$\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Νιτρικός Χαλκός	Άλας τριένυδρου νιτρικού χαλκού (II)	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
U	Ουρία	$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$
1 ή $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{U}_2$	Σύμπλοκο οξικού χαλκού (II) με ουρία	$\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{Cu}_2\text{N}_4\text{O}_{11}$
2 ή $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\text{U}_4$	Σύμπλοκο νιτρικού χαλκού (II) με ουρία	$\text{C}_4\text{H}_{16}\text{CuN}_{10}\text{O}_{10}$
MeOH	Μεθανόλη	CH_3OH
MeCN	Ακετονιτρίλιο	CH_3CN
Et ₂ O	Διαιθυλαιθέρας	
n-Hexane	Εξάνιο	C_6H_{14}
Toluene	Τολουόλιο	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$
Χλωροφόρμιο	Τριχλωρομεθάνιο	CHCl_3
Διχλωρομεθάνιο	Μεθυλενοδιχλωρίδιο	CH_2Cl_2
Acetone	Προπανόνη ή ακετόνη	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$
EtOH	Αιθανόλη	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο	
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο	

8.3 Συσκευές και Όργανα

Τα σημεία τήξης των ενώσεων μετρήθηκαν σε ανοιχτούς τριχοειδείς σωλήνες με τη χρήση αναλογικής συσκευής STUART.

Τα υπέρυθρα φάσματα στην περιοχή των $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ελήφθησαν στο φασματοφωτόμετρο Cary 670 FTIR (Agilent Technologies).

Για τη λήψη φασμάτων απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο σειράς UV-1600 PC (VWR).

Οι θερμικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με το όργανο Shimadzu DTG-60 ταυτόχρονης μέτρησης DTA-TG, υπό ροή N_2 ($50\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$) με ρυθμό θέρμανσης $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

Τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν σε φασματομετρητή φθορισμού Jasco FP-8200.

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας πραγματοποιήθηκε σε προσροφητικό πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2), το οποίο επικαλύπτεται πάνω σε αλούμινα (Al_2O_3) $20\times 20\text{ cm}$ που αγοράστηκαν από την MERCK. Για την πυκνομετρική αξιολόγηση των πλακών TLC χρησιμοποιήθηκε το σύστημα τεκμηρίωσης γέλης Uvitec Cambridge Gel Documentation, το οποίο λειτουργούσε με λογισμικό UVI-1D.

Παραπομπές

Βιβλιογραφία

Παραπομπές: Βιβλιογραφία

- [1] W. Leydhecker, Οφθαλμολογία, 21η έκδοση, Αθήνα, Λίτσας, 1984, 120-134.
- [2] D. I. Fotiadis, Biomedical Technology, Teaching notes, Chapter Nervous System-Vision, Ioannina.
- [3] M.E. Stern, R.W. Beuerman, R.I. Fox, J. Gao, A.K. Mircheff, S.C. Pflugfelder, The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands, *Cornea*. 1998, 17, 584–593.
- [4] L. Zhou, R.W. Beuerman, Tear analysis in ocular surface diseases, *Prog Retin Eye Res*. 2012, 6, 527–550.
- [5] Anatomy and physiology of normal lacrimal function clinical neuro-ophthalmology, Πανεπιστήμιο της Γιούτα
- [6] Skorucak A, The science of tears, Accessed September 29, 2006.
- [7] M. Moshirfar, K. Pierson, K. Hanamaikai, L. Santiago-Caban, V. Muthappan, S.F. Passi, Artificial tears potpourri: a literature review, *Clin Ophthalmol.*, 2014, 31, 1419–1433.
- [8] N. von Thun und Hohenstein-Blaul, S. Funke, F. H. Grus, Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases, *Experimental Eye Research*, 2013, 117, 126-137
- [9] N. Night, Why do we cry? The scientific reasons behind sobbing, *The Independent.*, 2014, Retrieved 2019.
- [10] "Eye, human." *Encyclopædia Britannica 2006 Ultimate Reference Suite 2009*
- [11] R. Mukumal, All about emotional tears, *American Academy of Ophthalmology*, 2017, Retrieved 2019.
- [12] A. Skorucak, The science of tears, *ScienceIQ.com.*, 2006.

- [13] S. Hagan, E. Martin, Am. Enriquez-de-Salamanca, Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine, *The EPMA Journal*, 2016, 1, 15-35
- [14] HBM4EU project, Science and Policy for a Healthy Future, Biomarkers in Human Biological Monitoring, Vita Dolzan, 1st HMB4EU Training School, Ljubljana, 2018.
- [15] Balasubramanian, S.A., Pye, D.C., Willcox, M.D., Levels of lactoferrin, secretory IgA and serum albumin in the tear film of people with keratoconus. *Exp. Eye Res.* 2012 96, 132-137.
- [16] M. Rolando, M. Zierhut, The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease, *Survey of Ophthalmology*, 2001, 45, no2, S203-S210.
- [17] AM. Lemp, C. Baudouin, J. Baum, The definition and classification of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye workshop, *Ocular Surface*, 2007, 5, no. 2, 75–92.
- [18] J. Murube, Andrew de Roeth dacryologist who introduced the term dry eye, *Ocular Surface*, 2004, 2, no. 4, 225–227.
- [19] G. Rieger, The importance of the precorneal tear film for the quality of optical imaging., *Br. J. Ophthalmol.*, 1992, 76, 157–8.
- [20] M. Rolando, M. Iester, A. Macri, G. Calabria, Low spatial-contrast sensitivity in dry eyes, *Cornea*, 1998, 17, 376–9.
- [21] Diagnostic Methology Subcommittee, Methologies to diagnose and monitor dry eye disease, Report of International Dry Eye Workshop, 2007, *Ocular Surf*, 5, 108-152
- [22] S. E. Moss, R. Klein, B. E. Kleon, Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome, *Arc. Ophthalmol*, 2000, 118, 1264-1268.

- [23] D. A. Schaumberg, D. A. Sullivan, J. E. Buring, M. R. Dana, Prevalence of dry eye syndrome among US women, *Am J Ophthalmol*, 2003, 136, 318-326.
- [24] H. Franz Grus, C. Stephanie, J. And N. Pfeiffer, Proteomics in ocular fluids, *Proteomics Clin. Appl.* 2007, 1, 876-888
- [25] L. Dawson, A. Tobin, P. Smith, T. Gordon, Antimuscarinic antibodies in Sjogren's syndrome where are we and where are we going? , *Arthritis Rheum.*, 52, 2005, 2984-2995
- [26] "Do Contact Lenses Damage The Eye?". *Lensite*. Retrieved 30 March 2018
- [27] Sahai A, Malik P., «Dry eye: prevalence and attributable risk factors in a hospital-based population», *Indian J Ophthalmol.* 2005. Jun;53(2):87–91
- [28] M.A. Lemp, Report of the National eye Institute/ Industry workshop on clinical trials in dry eyes, *CLAO J.*, 1995, 21, 221-232
- [29] Grus, F. H., Sabuncuo, P. Augustin, A. J., Quantitative analysis of tear protein profile dor soft contact lenses-a clinical study, *Klin. Monbl. Augenheilkd*, 218, 239-242
- [30] Grus F.H., Kramman C., Bozkurt N., Wiegel N., Bruns K., Lackner N., Pfeiffer N., Effects of multipurpose contact lens solutions on the protein composition of the tear film, *Cont. Lens Anterior Eye*, 2005a, 28, 103-112
- [31] Grus F.H., Kramman C., Bozkurt N., Wiegel N., Bruns K., Lackner N., Pfeiffer N., Effects of multipurpose contact lens solutions on the protein composition of the tear film, *Cont. Lens Anterior Eye*, 2005a, 28, 103-112
- [32] S. Funke, D. Azimi, D. Wolters, F. H. Grus, N. Pfeiffer, Longitudinal analysis of taurine induced effects on the tear proteome of contact lens wearers and dry eye patients using a RP-RP-Capillary-HPLC-, Maldi TOF/TOF MS approach, *J. Proteomics*, 75, 3177-3190

- [33] C. G. Begley, R. L. Chalmers, L. Abetz, The relationship between habitual patient reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44, 4753-4761.
- [34] J. E. Moore, J. E. Goodall, Concordance between common dry eye diagnostic tests, *Br J Ophthalmol*, 2009, 93, 66-72.
- [35] J. You, M. D. Willcox, M. C. Madigan, V. Wasinger, B. Schiller, B. J. Walsh, P.H. Graham, J. H. Kearsley, Y. Li, Tear fluid protein biomarkers, *Adv Clin Chem*. 2013, 62, 151–96.
- [36] D. Pieragostino, M. D'Alessandro, M. di Ioia, C. Di Ilio, P. Sacchetta, P. Del Boccio, Unraveling the molecular repertoire of tears as a source of biomarkers: beyond ocular diseases, *Proteomics Clin Appl*, 2015, 9(1–2), 169–86.
- [37] A. Enríquez-de-Salamanca, M. Calonge, Cytokines and chemokines in immunebased ocular surface inflammation, *Expert Rev Clin Immunol*, 2008, 4, 457–67.
- [38] IA. Mackie, DV. Seal, Confirmatory tests for the dry eye of Sjögren's syndrome, *Scand J Rheumatol Suppl*. 1986, 61:220–3.
- [39] HG. Boersma, OP. van Bijsterveld, The lactoferrin test for the diagnosis of keratoconjunctivitis sicca in clinical practice, *Ann Ophthalmol*, 1987, 19(4):152–4.
- [40] MB. Goren, SB. Goren, Diagnostic tests in patients with symptoms of keratoconjunctivitis sicca, *Am J Ophthalmol*, 1988, 106(5):570–4
- [41] FH. Grus, VN. Podust, K. Bruns, K. Lackner, S. Fu, EA. Dalmaso, A. Wirthlin, N. Pfeiffer, SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye, *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005, 46:863–76.

- [42] SV. Aluru, S. Agarwal, B. Srinivasan, GK. Iyer, SM. Rajappa, U. Tatu, P. Padmanabhan, N. Subramanian, A. Narayanasamy, Lacrimal proline rich 4 (LPRR4) protein in the tear fluid is a potential biomarker of dry eye syndrome, *PLoS One*, 2012,7(12):e519794.
- [43] N. Boehm, S. Funke, M. Wiegand, N. Wehrwein, N. Pfeiffer, FH. Grus, Alterations in the tear proteome of dry eye patients—a matter of the clinical phenotype, *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013,54:2385–92.
- [44] L.Zhou, RW. Beuerman, CM. Chan, SZ. Zhao, XR. Li, H. Yang, L. Tong, S. Liu, ME. Stern, D. Tan, Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics, *J Proteome Res*. 2009, 8:4889–905.
- [45] L. Tong, L. Zhou, RW. Beuerman, SZ. Zhao, XR. Li, Association of tear proteins with Meibomian gland disease and dry eye symptoms, *Br J Ophthalmol*. 2011, 95:848–52.
- [46] J. Soria, JA. Durán, J. Etxebarria, J. Merayo, N. González, R. Reigada, I. García, A. Acera, T. Suárez, Tear proteome and protein network analyses reveal a novel pentamer panel for tear film characterization in dry eye and meibomian gland dysfunction, *J Proteomics*. 2013,78:94–112.
- [47] P. Versura, A. Bavelloni, M. Grillini, M. Fresina, EC. Campos, Diagnostic performance of a tear protein panel in early dry eye, *Mol Vis*. 2013, 19:1247–57.
- [48] B. Li, M. Sheng, J. Li, G. Yan, A. Lin, M. Li, W. Wang, Y. Chen, Tear proteomic analysis of Sjögren syndrome patients with dry eye syndrome by twodimensional- nano-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Sci Rep*. 2014, 4:5772.
- [49] SF. Hamm-Alvarez, SR. Janga, MC. Edman, S. Madrigal, M. Shah, SE. Frousiakis, K. Renduchintala, J. Zhu, S. Bricel, K. Silka, D. Bach, M. Heur, S. Christianakis, DG. Arkfeld, J.

Irvine, WJ. Mack, W. Stohl, Tear cathepsin S as a candidate biomarker for Sjögren's syndrome, *Arthritis Rheumatol.* 2014,66(7):1872–81.

- [50] E. Toker, S. Yavuz, H. Direskeneli, Anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibodies in the tear fluid of patients with Sjögren's syndrome, *Br J Ophthalmol*, 2004,88(3):384–7.
- [51] M. Zandbelt, L. te Boome, I. Klasen, L. van de Putte, F. van den Hoogen, Tear fluid measurement of anti-SS-A and anti-SS-B antibody in anti-SS-A and anti-SS-B seronegative Sjögren's syndrome patients, *Clin Exp Rheumatol*, 2009,27(3):536.
- [52] S. Yavuz, E. Toker, M. Bicakcigil, G. Mumcu, S. Cakir, Comparative analysis of autoantibodies against α -fodrin in serum, tear fluid, and saliva from patients with Sjögren's syndrome, *J Rheumatol.* 2006,33(7):1289–92.
- [53] Q. Guo, H. Huang, Y. Pi, H. Zhang, Evaluation of tear malate dehydrogenase 2 in mild dry eye disease, *Eye Sci.* 2014,29(4):204–8.
- [54] M. Schicht, F. Rausch, M. Beron, C. Jacobi, F. Garreis, N. Hartjen, S. Beileke, F. Kruse, L. Bräuer, F. Paulsen, Palate lung nasal clone (PLUNC), a novel protein of the tear film: three-dimensional structure, immune activation, and involvement in dry eye disease (DED), *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015, 56(12),7312–23.
- [55] Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res.* 1999;19(3):201–11.
- [56] Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(10):2283–92.

- [57] Boehm N, Riechart AI, Wiegand M, et al. Proinflammatory cytokineprofiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52:7725–30.
- [58] Van Der Meid KR, Su SP, Ward KW, Zhang JZ. Correlation of tear inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases with four dry eye diagnostic tests. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:1512–8.
- [59] Na KS, Mok JW, Kim JY, Rho CR, Joo CK. Correlations between tear cytokines, chemokines, and soluble receptors and clinical severity of dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(9):5443–50.
- [60] Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, Chen D, Wei Y, Asbell PA. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. *Cornea.* 2009; 28(9):1023–7.
- [61] Tishler M, Yaron I, Geyer O, Shirazi I, Naftaliev E, Yaron M. Elevated tear interleukin-6 levels in patients with Sjögren syndrome. *Ophthalmology.* 1998;105(12):2327–9.
- [62] Yoon KC, Jeong IY, Park YG, Yang SY. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea.* 2007;26(4):431–7.
- [63] Lam H, Bleiden L, De Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2009; 147:198–205.
- [64] Lee SY, Han SJ, Nam SM, Yoon SC, Ahn JM, Kim TI, Kim EK, Seo KY. Analysis of tear cytokines and clinical correlations in Sjögren syndrome dry eye patients and non-Sjögren syndrome dry eye patients. *Am J Ophthalmol.* 2013;156(2):247–53.
- [65] Tesón M, González-García MJ, López-Miguel A, Enríquez-de-Salamanca A, Martín-Montañez V, Benito MJ, Mateo ME, Stern ME, Calonge M. Influence of a controlled

environment simulating an in-flight airplane cabin on dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(3):2093–9.

- [66] López-Miguel A, Tesón M, Martín-Montañez V, Enríquez-de-Salamanca A, Stern ME, González-García MJ, Calonge M. Clinical and molecular inflammatory response in Sjögren syndrome-associated dry eye patients under desiccating stress. *Am J Ophthalmol.* 2016;161:133–41.
- [67] Huang JF, Zhang Y, Rittenhouse KD, Pickering EH, McDowell MT. Evaluations of tear protein markers in dry eye disease: repeatability of measurement and correlation with disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(8):4556–64.
- [68] De Paiva CS, Chotikavanich S, Pangelinan SB, Pitcher JD, Fang B, Zheng X, Ma P, Farley WJ, Siemasko KF, Niederkorn JY, Stern ME, Li DQ, Pflugfelder SC. IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal Immunol.* 2009;2:243–53.
- [69] Tan X, Sun S, Liu Y, Zhu T, Wang K, Ren T, Wu Z, Xu H, Zhu L. Analysis of Th17-associated cytokines in tears of patients with dry eye syndrome. *Eye (Lond).* 2014;28(5):608–13.
- [70] Lim SA, Nam DH, Lee JH, Kwok SK, Park SH, Chung SH. Association of IL-21 cytokine with severity of primary Sjögren syndrome dry eye. *Cornea.* 2015; 34(3):248–52.
- [71] Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, Fernández I, Carreño E, García-Vázquez C, Herreras JM, Calonge M. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis.* 2010; 16:862–73
- [72] Yoon KC, Park CS, You IC, Choi HJ, Lee KH, Im SK, Park HY, Pflugfelder SC. Expression of CXCL9, -10, -11, and CXCR3 in the tear film and ocular surface of patients with dry eye syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(2):643–50.

- [73] Choi W, Li Z, Oh HJ, Im SK, Lee SH, Park SH, You IC, Yoon KC. Expression of CCR5 and its ligands CCL3, -4, and -5 in the tear film and ocular surface of patients with dry eye disease. *Curr Eye Res.* 2012; 37:12–7.
- [74] Ohashi Y, Ishida R, Kojima T, Goto E, Matsumoto Y, Watanabe K, Ishida N, Nakata K, Takeuchi T, Tsubota K. Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2003;136:291–9.
- [75] Acera A, Rocha G, Vecino E, et al. Inflammatory markers in the tears of patients with ocular surface disease. *Ophthalmic Res.* 2008; 40:315–21.
- [76] Chotikavanich S, de Paiva CS, de Li Q, Chen JJ, Bian F, Farley WJ, Pflugfelder SC. Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in dysfunctional tear syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50:3203–9.
- [77] Aragona P, Aguenouz M, Rania L, Postorino E, Sommario MS, Roszkowska AM, De Pasquale MG, Pisani A, Puzzolo D. Matrix metalloproteinase 9 and transglutaminase 2 expression at the ocular surface in patients with different forms of dry eye disease. *Ophthalmology.* 2015;122(1):62–71.
- [78] López-Miguel A, Tesón M, Martín-Montañez V, Enríquez-de-Salamanca A, Stern ME, González-García MJ, Calonge M. Clinical and molecular inflammatory response in Sjögren syndrome-associated dry eye patients under desiccating stress. *Am J Ophthalmol.* 2016; 161:133–41.
- [79] P. Argüeso, M. Balaram, S. Spurr-Michaud, HT. Keutmann, MR. Dana, IK. Gipson, Decreased levels of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjögren syndrome, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002, 43(4):1004–11.

- [80] A. Lambiase, A. Micera, M. Sacchetti, M. Cortes, F. Mantelli, S. Bonini, Alterations of tear neuromediators in dry eye disease. *Arch Ophthalmol*. 2011, 129:981–6.
- [81] P. Chhadva, T. Lee, CD. Sarantopoulos, AS. Hackam, AL. McClellan, ER. Felix, RC. Levitt, A. Galor, Human tear serotonin levels correlate with symptoms and signs of dry eye, *Ophthalmology*, 2015, 122(8):1675–80.
- [82] Lam SM, Tong L, Yong SS, Li B, Chaurasia SS, Shui G, Wenk MR. Meibumlipid composition in Asians with dry eye disease. *PLoS One*. 2011; 6:e24339.
- [83] Lam SM, Tong L, Reux B, Duan X, Petznick A, Yong SS, Khee CB, Lear MJ, Wenk MR, Shui G. Lipidomic analysis of human tear fluid reveals structurespecific lipid alterations in dry eye syndrome. *J Lipid Res*. 2014;55(2):299–306.
- [84] Wakamatsu TH, Dogru M, Matsumoto Y, Kojima T, Kaido M, Ibrahim OM, Sato EA, Igarashi A, Ichihashi Y, Satake Y, Shimazaki J, Tsubota K. Evaluation of lipid oxidative stress status in Sjögren syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(1):201–10.
- [85] Choi W, Lian C, Ying L, Kim GE, You IC, Park SH, Yoon KC. Expression of lipid peroxidation markers in the tear film and ocular surface of patients with non-Sjogren syndrome: potential biomarkers for dry eye disease. *Current Eye Res*. 2016; 5:1–7.
- [86] Galbis-Estrada C, Martinez-Castillo S, Morales JM, Vivar-Llopis B, Monleón D, Díaz-Llopis M, Pinazo-Durán MD. Differential effects of dry eye disorders on metabolomic profile by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:542549.
- [87] Jessberger B., Therapy of the symptoms of "dry skin". *Z Hautkr*, 1988, 63(Suppl 3):12–15
- [88] Costa-Balogh FO, Wennerström H, Wadsö L, Sparr E., How small polar molecules protect membrane systems against osmotic stress: the urea–water–phospholipid system. *J Phys. Chem. B.*, 2006, 110(47):23845–23852

- [89] Wellner K, Fiedler G, Wohlrab W (1992) Untersuchungen zum Harnstoffgehalt der Hornschicht bei Neurodermitis. *Z Hautk* 67:648–650
- [90] Ridley F (1930) The intraocular pressure and drainage of the aqueous humour. *Brit J Exp Path* 11:217–240
- [91] Balik J (1959) On the excretion of urea in the lacrimal fluid in keratoconjunctivitis sicca. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 135:533–7
- [92] J. H. Thaysen, N. A. Thorn, Excretion of urea, sodium, potassium and chloride in human tears, *Am. J. Physiol.*, 1953, 178, 160-164
- [93] Bräuer L, Börgermann J, Johl M, Pleyer U, Tsokos M, Paulsen F (2007) Detection and localization of the hydrophobic surfactant proteins B and C in human tear fluid and the human lacrimal system. *Curr Eye Res* 32:931–938
- [94] Caballero-Herrera A, Nordstrand K, Berndt KD, Nilsson L (2005) Effect of urea on peptide conformation in water: molecular dynamics and experimental characterization. *Biophys J* 89(2):842–857
- [95] Τσαγκάρης, Ι., *Ανόργανη Χημεία των Στοιχείων Μεταπτώσεως*, Τόμος Ι, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 1980
- [96] Δ. Κεσίσογλου, Γ. Ψωμάς, *Βιοανόργανη Χημεία*, εκδόσεις Ζήτη
- [97] Pass and Sutcliffe (1968). *Practical Inorganic Chemistry*. London: Chapman and Hall
- [98] I. Iakovidis, I. Delimaris, S. M. Piperakis, *Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach*, Vol. 2011, 13 pages
- [99] Πνευματικάκης, Γ., *Μαθήματα Χημείας Στοιχείων Μετάπτωσης*
- [100] Bruker Analytical X-ray Systems Inc, Apex2, Version 2 User Manual, M86–E01078, Madison, WI, 2006

- [101] Siemens Industrial Automation Inc, SADABS: Area-Detector Absorption Correction, Madison, WI, 1996
- [102] L. Palatinus, G. Chapuis, *J. Appl. Crystallogr.* 40 (2007) 786–790
- [103] Z. Han-Hui, Y. Zhao, Y. Rong-Sheng, Y. Xiu-Fen, *Jiegou Huaxue* 15 (1996) 109, M. Koman, E. Jona, D. Nagy, *Z. Kristallogr, Cryst. Mater.* 210 (1995) 873–874
- [104] T.J. Prior, R.L. Kift, *J. Chem. Crystallogr.* 39 (2009) 558–563
- [105] V.G. Albano, P. Bellon, M. Sansoni, *J. Chem. Soc. A.* (1971) 2420–2425
- [106] H.Uekusa, S.Ohba, Y.Saito, M.Kato, T.Tokii, Y.Muto, *Acta Crystallographica, Section C: Crystal Structure Communications*, 1989, 45, 377, DOI: 10.1107/S0108270188011904
- [107] Yu.A.Simonov, V.I.Ivanov, T.I.Malinovskii, L.I.Landa, *Izvestiya Akademii Nauk Moldavskoi SSR*, 1976, 33-3
- [108] Sheng-Zhi Hu CCDC 174388: Experimental Crystal Structure Determination, 2001, DOI: 10.5517/cc5vgfw
- [109] Zhang Han-Hui, Ye Zhao, Yang Rong-Sheng, Yu Xiu-Fen, *Jiegou Huaxue*, 1996, 15, 109
- [110] M.Koman, E.Jona, D.Nagy, *Zeitschrift fuer Kristallographie - Crystalline Materials*, 1995, 210, 873, DOI: 10.1524/zkri.1995.210.11.873
- [111] T.J.Prior, R.L.Kift, *Journal of Chemical Crystallography*, 2009, 39, 558, DOI: 10.1007/s10870-009-9517-0
- [112] S.S. Batsanov, *Inorg. Mater.* 37 (2001) 871–885
- [113] K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1963

- [114] G.K. Latsis, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, C. Papatriantafyllopoulou, N. Panagiotou, A. Tasiopoulos, A. Douvalis, A.G. Kalampounias, T. Bakas, S.K. Hadjikakou, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 2055–2072
- [115] S.K. Hadjikakou, M.A. Abdellah, N. Hadjiliadis, M. Kubicki, T. Bakas, N. Kourkoumelis, Y.V. Simos, S. Karkabounas, M.M. Barsan, I.S. Butler, *Bioinorg. Chem. Appl.* (2009), 542979
- [116] J. Grdadolnik, Y. Marechal, *J. Mol. Struct* 615 (2002) 177–189
- [117] M. Kishita, M. Inoue, M. Kubo, *Inorg. Chem.* 3–2 (1964) 237–239
- [118] An, H. J., Ninonuevo, M., Aguilan, J. et al., Glycomics analyses of tear fluid for the diagnostic detection of ocular rosacea. *J. Proteome Res.* 2005, 4, 1981–1987
- [119] Zhou, L., Huang, L. Q., Beuerman, R. W. et al., Proteomic analysis of human tears: Defensin expression after ocular surface surgery. *J. Proteome Res.* 2004, 3, 410–416
- [120] Schirmer, O., Studien zur Physiologie und Pathophysiologie der Tränenabsonderung und Tränenabfuhr. *Albrecht von Graefes Arch. Ophthalmol.* 1903, 56, 197–291
- [121] Allen M. Schoffstall, Barbara A. Gaddis, Melvin L. Druelinger,, *Εργαστηριακά Πειράματα Οργανικής Χημείας, μικροκλίμακας και μικρής κλίμακας, Εκδόσεις Παπαζήση, 2^η αμερικάνικη έκδοση*
- [122] N.M. Fhionnlaioich, S. Ibsen, L.A. Serrano, A. Taylor, R. Qi, S. Guldin, *J. Chem. Educ.* 95 (2018) 2191–2196
- [123] K. Jäger, H. Kielstein, M. Dunse, N. Nass, F. Paulsen, S. Sel, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 251 (2013) 1995–200

Παραπομπές εικόνων και πινάκων: Βιβλιογραφία

- a. W. Leydhecker, Οφθαλμολογία, 21η έκδοση, Αθήνα, Λίτσας, 1984, 120-134
- b. D. I. Fotiadis, Biomedical Technology, Teaching notes, Chapter Nervous System-Vision, Ioannina.
- c. National eye institute, Dry eye facts, National Institute of Health, July 13, 2016
- d. Anatomy and physiology of normal lacrimal function clinical neuro-ophthalmology, Πανεπιστήμιο της Γιούτα
- e. J. Stromberg, The microscopic structures of dried-human tears, Smithsonianmag.com, November 19, 2013
- f. Maragou M, Vaikousis E, Ntre A, Koronis N, Georgiou P, Hatzidimitriou E, et al. Tear and saliva ferning tests in Sjogren's syndrome (SS). Clin Rheumatol 1996, 15:125–132.
- g. HBM4EU project, Science and Policy for a Healthy Future, Biomarkers in Human Biological Monitoring, Vita Dolzan, 1st HMB4EU Training School, Ljubljana, 2018.
- h. Boston Eye Group, Dry eye Boston
- i. AM. Lemp, C. Baudouin, J. Baum, The definition and classification of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye workshop, Ocular Surface, 2007, 5, no. 2, 75–92.
- j. L. Dawson, A. Tobin, P. Smith, T. Gordon, Antimuscarinic antibodies in Sjogren’s syndrome where are we and where are we going? , Arthritis Rheum., 52, 2005, 2984-2995
- k. I. Iakovidis, I. Delimaris, S. M. Piperakis, Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach, Vol. 2011, 13 pages
- l. H. Franz Grus, C. Stephanie, J. And N. Pfeiffer, Proteomics in ocular fluids, Proteomics Clin. Appl. 2007, 1, 876-888

