



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΙΑΤΡΟΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΦΟΡΗΤΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΕΣ ΣΕ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΟΥΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΑΠΟΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ
ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΚΤΕΣ ΧΑΜΗΛΟΥ
ΚΟΣΤΟΥΣ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΤΟ ΣΗΜΕΙΟ ΠΕΡΙΘΑΛΨΗΣ**

Ελένη Τζιάννη

Χημικός

Διδακτορική Διατριβή

Ιωάννινα, 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΙΑΤΡΟΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΦΟΡΗΤΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΕΣ ΣΕ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΟΥΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΑΠΟΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ
ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΚΤΕΣ ΧΑΜΗΛΟΥ
ΚΟΣΤΟΥΣ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΤΟ ΣΗΜΕΙΟ ΠΕΡΙΘΑΛΨΗΣ**

Ελένη Τζιάννη

Χημικός

Διδακτορική Διατριβή

Ιωάννινα, 2023

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής	: 30/03/2018
Ημερομηνία ορισμού θέματος	: 22/02/2019
Ημερομηνία άδειας συγγραφής	: 11/03/2022
Ημερομηνία ορισμού επταμελούς εξεταστικής επιτροπής	: 27/01/2023

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

- 1) Προδρομίδης Μάμας, Καθηγητής (Επιβλέπων)
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- 2) Αυγερόπουλος Απόστολος, Καθηγητής
Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- 3) Χριστοδούλου Δημήτριος, Καθηγητής
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μέλη επταμελούς εξεταστικής επιτροπής

- 1) Προδρομίδης Μάμας, Καθηγητής (Επιβλέπων)
- 2) Αυγερόπουλος Απόστολος, Καθηγητής
- 3) Χριστοδούλου Δημήτριος, Καθηγητής
- 4) Σταλίκας Κωνσταντίνος, Καθηγητής
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- 5) Σταμάτης Χαράλαμπος, Καθηγητής
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- 6) Σακκάς Βασίλειος, Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- 7) Γκιώκας Δημοσθένης, Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1) Μάμαντος Προδρομίδης,
Καθηγητής Παν/μίου Ιωαννίνων (Π.Ι) (επιβλέπον μέλος Δ.Ε.Π)

2) Απόστολος Αυγερόπουλος,
Καθηγητής Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών Π.Ι, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής

3) Δημήτριος Χριστοδούλου,
Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Π.Ι, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής

4) Κωνσταντίνος Σταλίκας
Καθηγητής Π.Ι

5) Χαράλαμπος Σταμάτης
Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Π.Ι

6) Βασίλειος Σακκάς,
Αναπληρωτής καθηγητής Π.Ι

7) Δημοσθένης Γκιώκας,
Αναπληρωτής καθηγητής Π.Ι

Στην οικογένεια μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με επιβλέποντα τον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας κ. Μάμα Προδρομίδα, κατά το χρονικό διάστημα Μάρτιος 2018-Ιανουάριος 2023.

Η διατριβή αποτελείται από το Θεωρητικό και το Πειραματικό μέρος. Στο πρώτο κεφάλαιο του Θεωρητικού μέρους, γίνεται μία εισαγωγή στην έννοια των Αναλύσεων Πεδίου και μία εκτενής αναφορά στις κλινικές αναλύσεις στο σημείο περίθαλψης (point-of-care), στα κριτήρια που θεσπίζονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και στις ιατροδιαγνωστικές συσκευές που υπάρχουν διαθέσιμες στο εμπόριο σήμερα. Στο δεύτερο κεφάλαιο παρουσιάζονται κάποιες ερευνητικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα για την ανάπτυξη ιατροδιαγνωστικών συσκευών για εφαρμογή στο σημείο περίθαλψης. Τέλος, στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται μία εισαγωγή της έννοιας των αποκρινόμενων πολυμερών σε κάποιο ερέθισμα και παρουσιάζονται κάποιες εφαρμογές αυτών.

Το Πειραματικό μέρος περιλαμβάνει τρία κεφάλαια στα οποία περιγράφεται η ανάπτυξη τριών διαφορετικών ιατροδιαγνωστικών συσκευών, βασισμένων σε πολυμερή αποκρινόμενα στο pH, για αναλύσεις σε πραγματικά δείγματα ούρων και βιοπτικά δείγματα στομάχου. Στο πρώτο κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα αποτελούμενου από το αποκρινόμενο στο pH συμπολυμερές Eudragit® S100, για τον προσδιορισμό της ουρίας σε πραγματικά δείγματα ούρων. Στο δεύτερο κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα αποτελούμενου από το αποκρινόμενο στο pH συμπολυμερές πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας-co-μεθακρυλικό οξύ) (PMMA-co-PMAA) για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης στα ούρα. Ο βιοαισθητήρας ενσωματώθηκε σε μία ιατροδιαγνωστική συσκευή που σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε στο πλαίσιο αυτής της διατριβής, η οποία επιτρέπει την ασύρματη επικοινωνία με έξυπνα κινητά (smartphones) και τη διεξαγωγή των κλινικών αναλύσεων μέσα από μία εφαρμογή (application). Στο τελευταίο κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη ενός αισθητήρα για την ανίχνευση του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού σε βιοπτικά δείγματα στομάχου.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα μου, Καθηγητή κ. Μάμα Προδρομίδη για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση και την αμέριστη υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και τη συγγραφή της διδακτορικής διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Απόστολο Αυγερόπουλο και τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Χριστοδούλου, για την πολύτιμη συνεισφορά τους και την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις εύστοχες υποδείξεις τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους συνεργάτες με τους οποίους δούλεψα μαζί όλα τα χρόνια στα πλαίσια της διατριβής μου, και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας. Ευχαριστώ θερμά τη Δρ Αγγελική Φλώρου, μέλος Ε.ΔΙ.Π του εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη βοήθεια που προσέφερε πάντα με χαρά, καθώς και το Δρ. Ιωάννη Μούτσιο, τους ιατρούς Σοφία Καρτσώλη και Μιλτιάδη Μουτζούκη, τους συνεργάτες του εργαστηρίου από την εταιρεία ETRIS, Electronic applications (Κιλκίς) Σοφία Παναγιωτίδου, Κωνσταντίνο Γκόβαρη και Λάζαρο Παναγιωτίδη και τέλος, τον καθηγητή Jan Hrbac από το Πανεπιστήμιο Masaryk, Μπρνο, Τσεχία για την πολυετή και πολύτιμη συνεργασία.

Σε αυτό το ταξίδι είχα πάντα δίπλα μου τους φίλους μου και συναδέλφους Δρ. Μαρία Τραχιώτη, Δρ. Αλέξανδρο Λαζανά, και Αναστάσιο Παπαβασιλείου και τους ευχαριστώ για τη συνεργασία, τις συμβουλές και τη συμπαράσταση που μου χάρισαν. Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου, στους γονείς μου Ηλία και Γεωργία και στα αδέρφια μου Βαγγέλη και Μιχάλη που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα.

Ελένη Τζιάννη
Ιωάννινα, Ιανουάριος 2023

Περιεχόμενα

Θεωρητικό μέρος

1	Αναλύσεις πεδίου	3
1.1	Εισαγωγή	3
1.2	Κλινικές αναλύσεις στο σημείο περίθαλψης.....	6
1.3	Ιατροδιαγνωστικές συσκευές για PoC αναλύσεις	13
1.3.1	Αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες.....	13
1.3.2	Οπτικές διαγνωστικές συσκευές	16
1.3.3	Διαγνωστικά τεστ πλευρικής ροής (Lateral Flow).....	17
1.3.4	Διαγνωστικές ταινίες ούρων	20
2	Ανάπτυξη PoC τεχνολογίας σε ερευνητικό επίπεδο.....	23
2.1	Εισαγωγή	23
2.2	Οπτικές μέθοδοι ανάπτυξης PoC συσκευών	24
2.3	Ηλεκτροχημικές μέθοδοι ανάπτυξης PoC συσκευών.....	30
3	Αποκρινόμενα πολυμερή σε PoC εφαρμογές.....	33
3.1	Εισαγωγή	33
3.2	Εφαρμογές αποκρινόμενων πολυμερών σε (βιο)αισθητήρες	34

Πειραματικό μέρος

1	Σκοπός	43
2	Ιατροδιαγνωστική συσκευή με βιοαισθητήρες βασισμένους σε μεμβράνες πολυμερών αποκρινόμενων στο pH και μεταλλάκτες χαμηλού κόστους για εφαρμογή σε αναλύσεις πεδίου.....	45
2.1	Περίληψη.....	45
2.2	Εισαγωγή	46
2.3	Πειραματικό μέρος.....	49
2.3.1	Αντιδραστήρια	49
2.3.2	Κατασκευή των αποκρινόμενων στο pH μεμβρανών	50
2.3.3	Κατασκευή του βιοαισθητήρα BioPoC.....	52
2.3.4	Κατασκευή της πρωτότυπης συσκευής BioPoC	54
2.3.5	Προσδιορισμός της ουρίας σε δείγματα ούρων	54
2.4	Αποτελέσματα και συζήτηση	56
2.4.1	Αρχή λειτουργίας του βιοαισθητήρα και η συνθήκη «μηδενικής απόκρισης τυφλού δείγματος»	56
2.4.2	Προσδιορισμός ουρίας σε μη επεξεργασμένα δείγματα ούρων.....	60
2.4.3	Ρύθμιση του εύρους ανίχνευσης	61
2.4.4	Βαθμονόμηση της μεθόδου.....	62
2.5	Συμπεράσματα.....	67
3	Βιοαισθητήρας κρεατινίνης τύπου κάρτας SIM συζευγμένος με «έξυπνα» κινητά. 69	
3.1	Περίληψη.....	69
3.2	Εισαγωγή	70
3.3	Πειραματικό μέρος.....	73

3.3.1	Αντιδραστήρια	73
3.3.2	Σύνθεση των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA	73
3.3.3	Μελέτες χαρακτηρισμού των συμπολυμερών	75
3.3.4	Κατασκευή των ελεύθερων μεμβρανών PMMA-co-PMAA	76
3.3.5	Συναρμολόγηση του βιοαισθητήρα σε μορφή κάρτας SIM.....	78
3.3.6	Σύνδεση και λειτουργία του βιοαισθητήρα τύπου SIM με τη συσκευή	81
3.3.7	Υπολογισμός του ρυθμού αποδόμησης των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA....	87
3.3.8	Πορεία εργασίας	88
3.4	Αποτελέσματα και συζήτηση	89
3.4.1	Χαρακτηρισμός των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA	89
3.4.2	Ρυθμός αποδόμησης των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA σε διαφορετικά pH..	94
3.4.3	Εικόνες SEM και μετρήσεις γωνίας επαφής.....	96
3.4.4	Επιλογή συμπολυμερούς PMMA-co-PMAA.....	99
3.4.5	Βιοαισθητήρες κατασκευασμένοι με μεμβράνες PMMA-co-PMAA	100
3.4.6	Βιοαισθητήρες κατασκευασμένοι με τροποποιημένα με PMMA-co-PMAA χρωματογραφικά χαρτιά.....	103
3.5	Συμπεράσματα.....	108
4	Αισθητήρας για την ανίχνευση του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού στο σημείο περίθαλψης.....	109
4.1	Περίληψη.....	109
4.2	Εισαγωγή.....	109
4.3	Πειραματικό μέρος.....	111
4.3.1	Κατασκευή του αισθητήρα	111
4.3.2	Προσδιορισμός του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού.....	111
4.4	Αποτελέσματα και συζήτηση	112
4.4.1	Ανίχνευση του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού στο σημείο περίθαλψης.....	112
4.5	Συμπεράσματα.....	117
	Βιβλιογραφία.....	119
	Περίληψη.....	129
	Summary	133
	Ευχαριστίες	135
	Δημοσιεύσεις.....	137
	Ανακοινώσεις σε συνέδρια	137

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 Αναλύσεις πεδίου

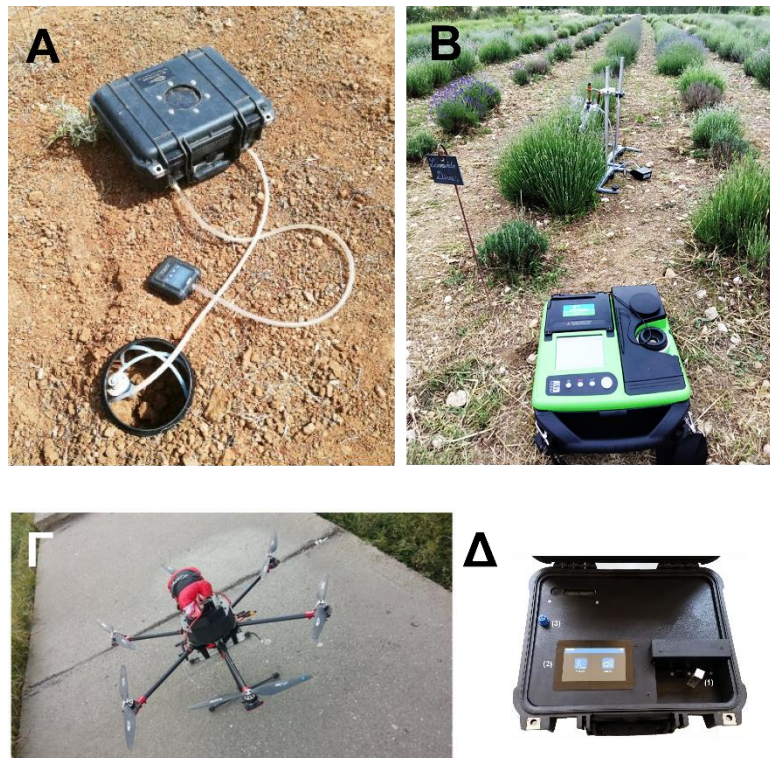
1.1 Εισαγωγή

Οι αναλύσεις πεδίου κερδίζουν όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω των αυξημένων απαιτήσεων για συνεχή ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο σε διάφορους τομείς όπως, η υγεία, το περιβάλλον, τα τρόφιμα κ.λπ. Για την ικανοποίηση αυτών των απαιτήσεων, γίνεται ολοένα και πιο επιτακτική η ανάγκη νέων, γρήγορων, εύκολων στη χρήση και οικονομικών αναλυτικών μεθόδων που να επιτρέπουν τη διεξαγωγή των αναλύσεων στο χώρο συλλογής του δείγματος, ώστε να διευκολύνεται η συνεχής παρακολούθηση των αναλυτών σε πραγματικό χρόνο και να λαμβάνονται άμεσα οι απαραίτητες αποφάσεις. Ο όρος «αναλύσεις πεδίου» αναφέρεται στις τεχνικές που λαμβάνουν χώρα στο σημείο που βρίσκεται ο αναλύτης¹. Τα βασικά χαρακτηριστικά των αναλύσεων πεδίου, που τους δίνουν το πλεονέκτημα έναντι των καθιερωμένων εργαστηριακών τεχνικών είναι η μείωση του χρόνου ανάλυσης, λόγω της εξάλειψης του σταδίου μεταφοράς του δείγματος, η χρήση χαμηλού κόστους φορητών συσκευών μικρών διαστάσεων, η ελαχιστοποίηση της ποσότητας των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση, η άμεση χρήση του δείγματος (ιδανικά χωρίς να προηγηθεί κάποια επεξεργασία) και η διεξαγωγή της ανάλυσης μέσω ενός εύκολου στη χρήση αναλυτικού πρωτοκόλλου ώστε, ιδανικά, η ανάλυση του δείγματος να μπορεί να διεξαχθεί από μη εξειδικευμένο προσωπικό.

Οι αναλύσεις πεδίου δεν είναι μια καινούρια έννοια στη αναλυτική χημεία. Εδώ και πολλές δεκαετίες αναφέρονται στη βιβλιογραφία μελέτες που έχουν ως στόχο την εφαρμογή των τεχνικών ανάλυσης εκτός του εργαστηριακού χώρου². Για τη διεξαγωγή των αναλύσεων πεδίου, τα αναλυτικά όργανα θα πρέπει ιδανικά να είναι φορητά ώστε να μπορεί ο αναλυτής να τα μεταφέρει στο σημείο ανάλυσης, ή εναλλακτικά να μπορούν να εγκατασταθούν σε μία κινητή μονάδα ανάλυσης, π.χ. σε ένα αυτοκίνητο³. Ωστόσο, η μετατροπή πολλών από τις ήδη υπάρχουσες τεχνολογίες ανάλυσης σε τεχνολογίες ανάλυσης πεδίου δεν είναι εφικτή στις περιπτώσεις όπου απαιτείται συνδυασμός οργάνων και αυστηρά προκαθορισμένες συνθήκες ανάλυσης. Οι νέες αναλυτικές τεχνολογίες θα πρέπει να συνδυάζουν τη δυνατότητα

για λήψη και επεξεργασία του δείγματος, εκτέλεση της ανάλυσης και συλλογή και επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε μία συσκευή ή συνδυασμό συσκευών, που θα τοποθετούνται στο χώρο όπου λαμβάνεται το δείγμα. Για περιβαλλοντικές αναλύσεις έχουν αναπτυχθεί πολλές συσκευές που βασίζουν τη λειτουργία τους σε χρωματογραφικές^{4,5}, φασματοσκοπικές^{6,7,8} και σε ηλεκτροχημικές τεχνικές⁹. Οι συσκευές αυτές εξετάζουν δείγματα εδάφους¹⁰, αέρα^{11,12}, νερού^{6,9,13} κ.λπ. Μερικές από τις συσκευές που έχουν χρησιμοποιηθεί για αναλύσεις πεδίου παρουσιάζονται στο **Σχήμα 1**.

Ένας εξίσου σημαντικός τομέας ανάλυσης, στον οποίο απαιτείται συνεχής παρακολούθηση διαφόρων φυσικών και χημικών παραμέτρων, είναι τα τρόφιμα. Στον τομέα των τροφίμων, η χρήση των τεχνικών για αναλύσεις πεδίου είναι ιδιαίτερα απαιτητική λόγω της πολυπλοκότητας της μήτρας των τροφίμων και των πολλών σταδίων προκατεργασίας (εκχύλιση, φυγοκέντριση, διήθηση, καταβύθιση κ.ά.) που απαιτούνται στις περισσότερες περιπτώσεις. Για το λόγο αυτό, η εξέλιξη στην ανάπτυξη αναλυτικών τεχνολογιών για αναλύσεις πεδίου στο συγκεκριμένο τομέα είναι σχετικά περιορισμένη. Ωστόσο, η αντιμετώπιση διαφόρων περιπτώσεων νοθείας τροφίμων, ο έλεγχος της καταλληλότητας τροφίμων και ο έλεγχος προσθήκης βελτιωτικών υλικών ή συντηρητικών σε διάφορα τρόφιμα έχουν ενισχύσει την ανάγκη για την ανάπτυξη γρήγορων και άμεσων τεχνικών ανάλυσης με εφαρμογή εκτός του εργαστηριακού χώρου από μη εξιδεικευμένο προσωπικό. Για τη νοθεία του γάλακτος¹⁴ έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για αναλύσεις εκτός εργαστηρίου^{15,16}. Ένα ακόμη συχνό φαινόμενο είναι η νοθεία του κρέατος ώστε να ανέβει η αξία ενός είδους κρέατος με χαμηλή θρεπτική ή εμπορική αξία, ή ακόμη και η αντικατάσταση ενός είδους κρέατος με ένα διαφορετικό είδος χαμηλότερης θρεπτικής ή εμπορικής αξίας. Μία φορητή συσκευή που αναπτύχθηκε για τον έλεγχο των γονιδίων του κρέατος και τον εντοπισμό του είδους του, βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και κατασκευάστηκε για αναλύσεις σε πραγματικό χρόνο και άμεση λήψη αποτελεσμάτων¹⁷. Εκτός από ελέγχους νοθείας, οι αναλυτικές συσκευές που προσφέρουν συνεχείς αναλύσεις, είναι χρήσιμες και σε διαδικασίες όπως η ωρίμανση του κρασιού, όπου χρειάζεται συνεχής παρακολούθηση της πορείας της ζύμωσης¹⁸.



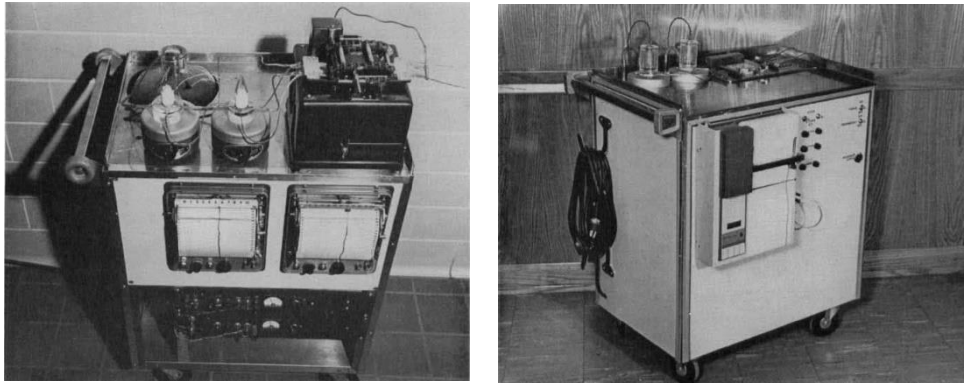
Σχήμα 1. Α) Φορητό GC-MS για την προσδιορισμό πτητικών ενώσεων στο έδαφος⁴, Β) Φορητό GC-MS για τον προσδιορισμό πτητικών οργανικών ενώσεων στη λεβάντα⁵, Γ) Μελέτη της ποιότητας του αέρα σε πραγματικό χρόνο με μία αυτόνομη συσκευή¹², Δ) Συσκευή μέτρησης φθορισμού για τον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων στο νερό⁶.

Αναμφίβολα όμως, ο σημαντικότερος τομέας ανάλυσης, ο οποίος έχει συγκεντρώσει και το μεγαλύτερο ερευνητικό και τεχνολογικό ενδιαφέρον, αφορά στις αναλυτικές συσκευές και διατάξεις για κλινικές αναλύσεις, λόγω της σημαντικότητας που έχουν στην υγεία του ανθρώπου. Μερικά παραδείγματα ιατροδιαγνωστικών συσκευών που χρησιμοποιούνται καθημερινά είναι ο βιοαισθητήρας γλυκόζης, ο αισθητήρας μέτρησης της συγκέντρωσης του αλκοόλ στο αίμα και το τεστ εγκυμοσύνης. Για τις παραπάνω αναλύσεις έχουν κατασκευαστεί κατάλληλες ιατροδιαγνωστικές συσκευές οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκτός του εργαστηριακού χώρου και αξιοσημείωτα, σε πολλές περιπτώσεις, από τους ίδιους τους τελικούς χρήστες. Οι ιατροδιαγνωστικές συσκευές για εφαρμογή στο σημείο περίθαλψης (Point-of-Care, PoC), η σημαντικότητά τους στη βελτίωση της ζωής του ανθρώπου και η επίδραση τους στο παγκόσμιο σύστημα υγείας, θα αναφερθούν αναλυτικά στη συνέχεια

1.2 Κλινικές αναλύσεις στο σημείο περίθαλψης

Η ανάγκη για τη διεξαγωγή κλινικών αναλύσεων και τη συνεχή παρακολούθηση διαφόρων βιοδεικτών σε πραγματικό χρόνο, έχει τεκμηριωθεί εδώ και πολλές δεκαετίες από την ιατρική κοινότητα. Ένα πρωτότυπο τεστ που σχεδιάστηκε το 1959 από μία ομάδα ιατρών, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της λειτουργίας των πνευμόνων των ασθενών στο χώρο περίθαλψής τους, καλώντας τους να σβήσουν τη φλόγα ενός σπύρτου τοποθετημένου σε μία μεγάλη απόσταση από αυτούς¹⁹. Το 1962 αναπτύχθηκε από τους Clark και Lyons ένα σύστημα για τη συνεχή παρακολούθηση των διαλυμένων αερίων O₂ και CO₂ και του pH στο αίμα ασθενών κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης. Η συσκευή αυτή ήταν συνεχούς ροής και βασίζονταν σε ένα σύστημα ηλεκτροδίων (**Σχήμα 2**)²⁰. Το 1986, μία άλλη ιατρική ομάδα διεξήγαγε κλινικές μετρήσεις κάθε 5-15 λεπτά, δίπλα στο χειρουργικό κρεβάτι, για τον προσδιορισμό των ιόντων ασβεστίου στο αίμα κατά τη διάρκεια μεταμόσχευσης ήπατος²¹. Ήδη το 1980 υπήρχαν συσκευές που χρησιμοποιούνταν για κλινικές αναλύσεις δίπλα στον ασθενή, για τον προσδιορισμό της χολερυθρίνης, του ασβεστίου, του αλκοόλ, της αιμογλοβίνης και της γλυκόζης στο αίμα και του καλίου στον ιδρώτα²².

Η πρώτη συσκευή η οποία χρησιμοποιήθηκε από τους ίδιους τους ασθενείς, και σήμερα έχει εξελιχθεί σε ένα πολύ σημαντικό εργαλείο ζωτικής σημασίας για τους ασθενείς που πάσχουν από διάφορες μορφές διαβήτη, είναι η συσκευή μέτρησης της γλυκόζης στο αίμα. Η πρώτη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε το 1978, στην οποία οι ίδιοι οι ασθενείς χρησιμοποίησαν τις συσκευές μέτρησης της γλυκόζης, έδειξε ότι ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών κατάφερε να κρατήσει σε φυσιολογικά επίπεδα τη γλυκόζη στο αίμα για μεγάλο χρονικό διάστημα αποφεύγοντας έτσι και τα σοβαρά επεισόδια υπογλυκαιμίας²³.



Σχήμα 2. Αναλυτικές διατάξεις για την ανάλυση αίματος²⁰.

Η ανάπτυξη αναλυτικών διατάξεων για χρήση «δίπλα στο κρεβάτι» (bedside) δημιούργησε ένα καινούριο πεδίο έρευνας για τους επιστήμονες. Η εξέταση στο χώρο περίθαλψης του ασθενούς αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως Point-of-Care Testing (PoCT), και όπως περιεγράφηκε από τους Santrach και Burritt το 1995, αναφέρεται σε οποιαδήποτε εργαστηριακή εξέταση η οποία πραγματοποιείται μακριά από το εργαστήριο του νοσοκομείου²⁴. Οι πρώτες μελέτες που αναφέρονται σε κλινικές αναλύσεις πεδίου στη βιβλιογραφία, περιγράφουν κλινικές εξετάσεις οι οποίες διεξάγονται στο χώρο του νοσοκομείου, δίπλα από το χώρο εξέτασης του ασθενούς και από εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό. Ωστόσο, η ανάγκη για τέτοιες αναλύσεις εξαπλώνεται και σε χώρους εκτός του νοσοκομείου, σε περιοχές με περιορισμένες ή ανεπαρκείς υποδομές υγείας, σε απομακρυσμένους οικισμούς ή αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η πρόσβαση των κατοίκων σε υπηρεσίες περίθαλψης και η εξυπηρέτηση των ιατρικών αναγκών τους καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη.

Η εισαγωγή της ιδέας του PoCT οδήγησε στη δημιουργία νέων μεθόδων κλινικής ανάλυσης αναπτύσσοντας νέες ιατροδιαγνωστικές συσκευές με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που τις εντάσσουν στην κατηγορία των PoC συσκευών. Τα απαιτούμενα χαρακτηριστικά των PoC συσκευών, θεσπίστηκαν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) και αποδίδονται με το ακρωνύμιο ASSURED (affordable, sensitivity, specificity, user-friendly, rapid and robust, equipment-free, deliverable)²⁵. Οι συσκευές αυτές πρέπει να περιλαμβάνουν σύμφωνα με τον ΠΟΥ: α) χαμηλό κόστος ανάλυσης, β) εκλεκτικότητα και ευαισθησία ως προς τον αναλύτη στόχο, γ)

απλή λειτουργία ώστε να είναι δυνατή η χρήση τους από μη εξειδικευμένο προσωπικό, δ) μικρούς χρόνους ανάλυσης (<30 λεπτά) και άμεσα αποτελέσματα, ε) διεξαγωγή των αναλύσεων χωρίς να απαιτείται προκατεργασία του δείγματος με πολύπλοκο και ενεργοβόρο εξοπλισμό, ζ) χαμηλή κατανάλωση ενέργειας και η) φορητότητα της συσκευής ώστε να μπορεί να μεταφέρεται με ευκολία όπου αυτό απαιτείται. Επιπλέον αυτών των τεχνικών προδιαγραφών, προτάθηκαν τα τελευταία χρόνια δύο νέες απαιτήσεις, με την πρώτη να αναφέρεται στην άμεση κοινοποίηση των αποτελεσμάτων στους ασθενείς αμέσως μόλις ολοκληρωθεί η εξέταση (real-time connectivity) και τη δεύτερη στη λήψη του δείγματος με μη επεμβατικό τρόπο ώστε αυτό να μπορεί να πραγματοποιείται ακόμη και στο σπίτι από τον ίδιο τον ασθενή (ease of specimen collection).

Από τα πιο σημαντικά κριτήρια για τις PoC συσκευές, και πρώτο στη λίστα του ΠΟΥ, είναι το χαμηλό κόστος. Το υψηλό κόστος των συμβατικών τεχνολογιών ανάλυσης που εφαρμόζονται στα κλινικά εργαστήρια, αποτελεί το βασικότερο εμπόδιο στην πρόσβαση του συνόλου των πολιτών στις ιατρικές υπηρεσίες, ακόμη και στις αναπτυγμένες χώρες. Το κόστος αυξάνεται αν συνυπολογιστεί σε αυτό και το ταξίδι που πρέπει να πραγματοποιήσουν οι κάτοικοι απομακρυσμένων οικισμών στις κοντινότερες υποδομές διεξαγωγής εξετάσεων, οδηγώντας έτσι μεγάλη μερίδα των ασθενών να αμελούν τους τακτικούς ελέγχους. Αυτά τα δεδομένα αυξάνουν την ανάγκη για ανάπτυξη οικονομικότερων μεθόδων κλινικής ανάλυσης, ώστε να δίνεται η δυνατότητα ακόμη και στις οικονομικά ασθενέστερες τάξεις να έχουν πρόσβαση σε ιατροφαρμακευτική περίθαλψη. Με βάση τα δεδομένα του ΠΟΥ, το κόστος εξέτασης δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 10 δολάρια ΗΠΑ, ενώ το κόστος ανά συσκευή ανάλυσης θα πρέπει να είναι μικρότερο των 500 δολαρίων ΗΠΑ. Πιο συγκεκριμένα, σε συμφωνία με τις οδηγίες του ΠΟΥ, μία διεθνής οργάνωση χρηματοδότησης για την ανάπτυξη διαγνωστικών συσκευών για την ανίχνευση του HIV, της φυματίωσης και της ελονοσίας, η Global Fund, συμφώνησε με τις εταιρείες κατασκευής διαγνωστικών συσκευών το κόστος για κάθε εξέταση με την τεχνολογία δοκιμασιών πλευρικής ροής (lateral flow assay) για τον HIV και την ελονοσία να είναι μικρότερο του ενός δολαρίου ΗΠΑ, και της μοριακής ανάλυσης για τη φυματίωση των δέκα δολαρίων ΗΠΑ^{26,27}.

Πίνακας 1. Κριτήρια ASSURED του ΠΟΥ για τις PoC συσκευές.

Χαρακτηριστικά συσκευών	Απαιτούμενες προδιαγραφές
Χαμηλό κόστος	Κόστος συσκευής μικρότερο από US\$ 500 και κόστος ανάλυσης μικρότερο από US\$ 10
Εκλεκτικότητα/Ευαισθησία	Χαμηλά όρια ανίχνευσης ανάλογα με τον αναλύτη
«Φιλικό» προς το χρήστη	Εκπαίδευση του χρήστη μέσα σε 1-2 ημέρες
Άμεση λήψη αποτελεσμάτων και ανθεκτικότητα της συσκευής	Λήψη αποτελεσμάτων σε λιγότερα από 30 λεπτά, μικρή κατανάλωση αντιδραστηρίων, υψηλή απόδοση και χρόνος ζωής μεγαλύτερος από 1 χρόνο
Λειτουργία χωρίς εξοπλισμό	Τροφοδοσία με μπαταρία, εύκολος χειρισμός δείγματος, άμεση ανάλυση αποτελεσμάτων, συντήρηση σε συνθήκες περιβάλλοντος
Φορητότητα	Μικρό μέγεθος, χαμηλό βάρος και εύκολη μεταφορά

Η ευαισθησία και η εκλεκτικότητα, είναι προαπαιτούμενο στην ανάπτυξη όλων των μεθόδων κλινικής ανάλυσης. Οι έρευνες που πραγματοποιούνται ως προς την εξέλιξη των αναλυτικών τεχνικών, αφορούν, σε μεγάλο βαθμό, τη μείωση των ορίων ανίχνευσης των εξεταζόμενων αναλυτών, και την εκλεκτικότητα της μεθόδου ως προς τον αναλύτη στόχο έναντι των υπολοίπων συστατικών της μήτρας του δείγματος ή παρόμοιων χημικών ενώσεων που παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό του αναλύτη. Τα κριτήρια αυτά αφορούν φυσικά και τις συσκευές PoC, οι οποίες καλούνται να ανταγωνιστούν στην ευαισθησία και στην εκλεκτικότητα τις συμβατικές εργαστηριακές μεθόδους ανάλυσης. Σε καμία περίπτωση τα κριτήρια αυτά δεν μπορούν να αντισταθμιστούν από το χαμηλό κόστος που μπορούν να προσφέρουν οι συσκευές PoC. Η ανάπτυξη οικονομικών PoC συσκευών με μεγάλη ευαισθησία και εκλεκτικότητα, θα αποτελέσει ένα σημαντικό βήμα για την εμπορική εκμετάλλευση και την ευρεία αποδοχή αυτής της τεχνολογίας από την ιατρική κοινότητα, τους κρατικούς φορείς υγείας και τους ίδιους τους ασθενείς, και θα αποτελέσει καθοριστικό πόλο έλξης για τη συγκέντρωση επενδυτικών κεφαλαίων για την περαιτέρω βελτίωσή τους.

Η εφαρμογή της PoC τεχνολογίας τόσο σε χώρους μακριά από ένα κατάλληλα εξοπλισμένο εργαστήριο, όσο και από μη εξειδικευμένο προσωπικό, δημιουργεί την ανάγκη για ανάπτυξη μίας τεχνολογίας φιλικής προς το χρήστη, που θα απαιτεί καθόλου ή ελάχιστα στάδια προετοιμασίας των δειγμάτων. Η ελαχιστοποίηση της παρέμβασης του χρήστη στη διαδικασία της ανάλυσης και η λειτουργία της συσκευής σε όσο το δυνατόν λιγότερα στάδια (προετοιμασία δείγματος, εισαγωγή του δείγματος και αντιδραστηρίων στη συσκευή, ενεργοποίηση/απενεργοποίηση συσκευής και λήψη αποτελεσμάτων), αποτελεί σημαντική παράμετρο για την αποφυγή των σφαλμάτων στις αναλύσεις. Αναμφίβολα, η εύκολη λειτουργία μιας διαγνωστικής συσκευής την κάνει πιο ελκυστική προς τον τελικό χρήστη και πιο αξιόπιστη.

Η λήψη των αποτελεσμάτων και η παράδοση τους στο ιατρικό προσωπικό με τις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης είναι μία χρονοβόρος διαδικασία. Όταν οι εξετάσεις πραγματοποιούνται στα νοσοκομεία, το ιατρικό προσωπικό πρέπει να περιμένει μεγάλο χρονικό διάστημα μέχρι να λάβει τα αποτελέσματα, ενώ οι ασθενείς, όταν πραγματοποιούν τις εξετάσεις σε εξωτερικά εργαστήρια, πρέπει να μεταβούν μετά από αρκετές ώρες ή και μέρες ξανά στο εργαστήριο για να λάβουν τις απαντήσεις. Ο χρόνος λήψης των αποτελεσμάτων των κλινικών εξετάσεων καθορίζει και το πόσο σύντομα θα λάβει την απαραίτητη θεραπεία ο ασθενής, και για αυτό, ο ΠΟΥ έχει θεσπίσει ως ένα από τα βασικά κριτήρια που πρέπει να πληρούν οι συσκευές PoC, τα αποτελέσματα των αναλύσεων να είναι διαθέσιμα σε χρόνο μικρότερο από 30 λεπτά. Επιπλέον, εξίσου σημαντικό κριτήριο αποτελεί και η ανθεκτικότητα των συσκευών αυτών στην κοινή χρήση. Η διάθεση τους σε απομακρυσμένες περιοχές θα πρέπει να γίνεται εύκολα, και η λειτουργία/αποθήκευσή τους να μην απαιτεί ιδιαίτερες συνθήκες θερμοκρασίας υγρασίας κ.λπ. και τέλος να είναι ανθεκτικές στην μηχανική καταπόνηση.

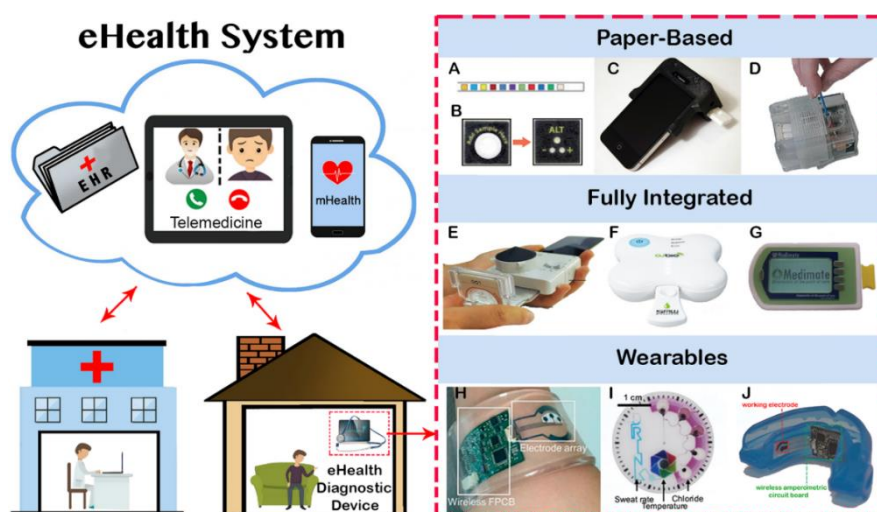
Τη λίστα με τα κριτήρια που έχει θεσπίσει ο ΠΟΥ για τις PoC συσκευές, συμπληρώνουν οι προϋποθέσεις για ελάχιστο εξοπλισμό και τη φορητότητα των συσκευών αυτών. Σε μη αναπτυγμένες χώρες, όπου οι υποδομές είναι ελλείψεις και οι οργανισμοί υγείας δυσκολεύονται να ανταπεξέλθουν στις οικονομικές απαιτήσεις ενός πλήρως εξοπλισμένου εργαστηρίου, όπως είναι οι απαιτήσεις για τη συντήρηση των μηχανημάτων, η μεγάλη κατανάλωση ενέργειας και η χρήση μεγάλου όγκου

ακριβών αντιδραστηρίων, η απλή λειτουργία των PoC συσκευών είναι σημαντικό πλεονέκτημα. Οι περιορισμένοι διαθέσιμοι πόροι και η έλλειψη τεχνολογικού εξοπλισμού και εγκαταστάσεων στις απομακρυσμένες περιοχές ή στις χώρες του τρίτου κόσμου, δημιουργούν την ανάγκη για λειτουργία των PoC συσκευών με τις ελάχιστες απαιτήσεις ενέργειας, όπως με τη χρήση μιας απλής μπαταρίας. Ταυτόχρονα, η ελαχιστοποίηση του εξοπλισμού ικανοποιεί και το κριτήριο της φορητότητας. Η φορητότητα των συσκευών αυτών σε συνδυασμό με την ελάχιστη ή τη μηδενική εκπαίδευση που χρειάζεται για την εφαρμογή τους, σημαίνει ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τον ίδιο τον ασθενή στο σπίτι του ή από το ιατρικό προσωπικό σε ένα φαρμακείο, στο ασθενοφόρο ή ακόμη και σε ένα εξωτερικό ιατρείο.

Τη σημαντική συμβολή των PoC συσκευών στη δημιουργία ενός πιο αποτελεσματικού συστήματος υγείας σε παγκόσμια κλίμακα, αναγνώρισε πρόσφατα, το Κολέγιο της Αμερικανικής Παθολογίας (College of American Pathology), το οποίο έχει συντάξει έναν οδηγό σχετικά με την ενημέρωση των πολιτών για τη σημασία των PoC τεχνολογιών στη διαμόρφωση ενός συγχρόνου και αποτελεσματικού συστήματος υγείας²⁸. Στον οδηγό αυτό, αναφέρονται βασικά χαρακτηριστικά των PoC συσκευών και οι διάφορες δυνατότητες που προσφέρουν, όπως η χρήση τους σε σημεία μακριά από το νοσοκομείο (ασθενοφόρα, κλινικές, στρατιωτικές επιχειρήσεις κ.λπ.), η άμεση λήψη αποτελεσμάτων και η δυνατότητα άμεσης επιλογής της κατάλληλης θεραπείας, η μείωση του κόστους των ιατρικών εξετάσεων και η χρήση τους από άτομα χωρίς ιδιαίτερη εργαστηριακή γνώση. Δεδομένης της αναγκαιότητας των ιατροδιαγνωστικών συσκευών, υπάρχει αυξανόμενη ζήτηση για την κατασκευή νέων PoC συσκευών που να μπορούν να εφαρμοστούν ικανοποιητικά για περισσότερους αναλύτες σε βιολογικά δείγματα. Ήδη από το 1994 η χρηματοδότηση προς αυτόν τον τομέα άρχισε να αυξάνεται σημαντικά. Το Ίδρυμα Rockefeller επιχορήγησε με ένα εκατομμύριο δολάρια ΗΠΑ (μία από τις μεγαλύτερες χορηγίες) την ανάπτυξη διαγνωστικών τεστ μικρού κόστους για δύο σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα²⁹, ενώ αυτή την κατεύθυνση ακολούθησαν και άλλα Ιδρύματα, όπως το Ίδρυμα Bill and Melinda Gates³⁰.

Με την εξέλιξη των PoC συσκευών θα ανοίξει ο δρόμος για τη δημιουργία νέων στρατηγικών και μηχανισμών ιατρικής παρακολούθησης, όπως η διαδικτυακή υγεία

(eHealth)³¹. Τα βασικά στοιχεία της διαδικτυακής υγείας είναι α) η δημιουργία ενός ηλεκτρονικού φακέλου, στον οποίο θα έχουν πρόσβαση οι ιατροί και θα μπορούν να συνταγογραφούν θεραπείες και εξετάσεις, β) η τηλε-ιατρική (telehealth), που θα επιτρέπει να απομακρυσμένη εξέταση των ασθενών και γ) η παροχή υπηρεσιών υγείας μέσω κινητού (mobileHealth) που θα διευκολύνει την επικοινωνία μεταξύ ιατρών και ασθενών. Για να γίνει πλήρως λειτουργικό αυτό το σύστημα, βασικό προαπαιτούμενο είναι η ανάπτυξη ιατροδιαγνωστικών συσκευών, που θα χρησιμοποιούνται από τους ασθενείς στο σπίτι τους χωρίς να απαιτείται να μεταβούν σε εξειδικευμένα κέντρα και τα αποτελέσματα θα παραδίδονται ηλεκτρονικά στον ιατρό και θα λαμβάνονται άμεσα οι αποφάσεις για την απαραίτητη θεραπεία (**Σχήμα 3**)³¹. Η ανάπτυξη PoC συσκευών που θα πληρούν τα παραπάνω κριτήρια θα αποτελέσει ένα σημαντικό μοχλό εξέλιξης των συστημάτων υγείας σε παγκόσμια κλίμακα, καλύπτοντας τις ανάγκες του μεγαλύτερου μέρους του πληθυσμού των χωρών στις οποίες θα αναπτύξουν τις αντίστοιχες τεχνολογίες. Ωστόσο, για να ικανοποιούν πλήρως τις απαιτήσεις του διαδικτυακού συστήματος υγείας, οι συσκευές αυτές δεν αρκεί να παρέχουν το αποτέλεσμα στο χρήστη μόνο. Είναι αναγκαία η σύνδεση τους με έξυπνες συσκευές προκειμένου να πραγματοποιείται η αποθήκευση των αποτελεσμάτων και η δημιουργία ιστορικού των εξετάσεων σε μία διαδικτυακή εφαρμογή που θα είναι διαθέσιμη (σύμφωνα και με τους περιορισμούς περί προσωπικών δεδομένων) στους εμπλεκόμενους φορείς.



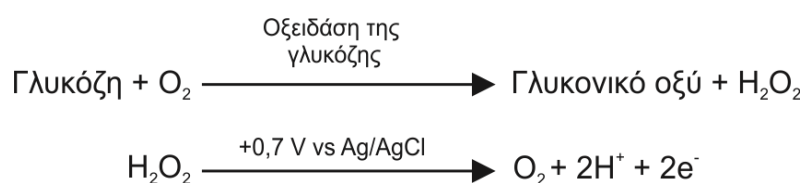
Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας της διαδικτυακής ιατρικής χρησιμοποιώντας PoC συσκευές³¹.

1.3 Ιατροδιαγνωστικές συσκευές για PoC αναλύσεις

1.3.1 Αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες

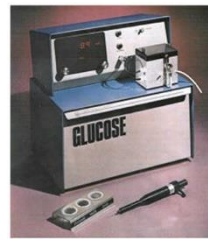
Παρά τις συνεχείς προσπάθειες των ερευνητών και τη δημοσίευση μεγάλου αριθμού άρθρων πάνω στην ανάπτυξη PoC συσκευών σε ερευνητικό επίπεδο, η ανάπτυξη πλήρως λειτουργικών ιατροδιαγνωστικών συσκευών για εφαρμογή σε πραγματικές συνθήκες, παραμένει ακόμη σε πολύ αρχικό στάδιο³². Οι διαγνωστικές συσκευές που πραγματικά έχουν περάσει από την εργαστηριακή ανάπτυξη στη βιομηχανική κατασκευή και είναι εμπορικά διαθέσιμες για χρήση από τους ασθενείς, είναι ελάχιστες. Η πιο ευρέως γνωστή PoC συσκευή που χρησιμοποιείται παγκοσμίως από εκατομμύρια διαβητικούς ασθενείς, είναι η συσκευή προσδιορισμού της γλυκόζης στο αίμα. Οι ασθενείς που νοσούν με διαβήτη παγκοσμίως σήμερα είναι 422 εκατομμύρια και ο αριθμός αυτός αναμένεται να αυξηθεί στα 642 εκατομμύρια τα επόμενα είκοσι χρόνια³³. Ο διαβήτης συμπεριλαμβάνεται μέσα στις 10 κύριες αιτίες θανάτου, και ο αυξημένος κίνδυνος που διατρέχουν οι ασθενείς έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη PoC συσκευών για τον καθημερινό αυτοέλεγχο των ασθενών ώστε να μπορούν να διατηρούν τη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα τους σε φυσιολογικές τιμές, αποφεύγοντας έτσι τα επεισόδια υπογλυκαιμίας ή υπεργλυκαιμίας.

Η αρχική ιδέα για τον προσδιορισμό της γλυκόζης στο αίμα εισήχθη από τους Leland C. Clark Jr. και Champ Lyons το 1962²⁰, οι οποίοι κατασκεύασαν μία διάταξη που βασίστηκε σε ένα ηλεκτρόδιο οξυγόνου και οξειδάση της γλυκόζης, εγκλωβισμένη μεταξύ δύο ημιπερατών μεμβρανών. Με το σύστημα αυτό, ο προσδιορισμός της γλυκόζης πραγματοποιούνταν έμμεσα, μετρώντας την κατανάλωση του διαλυμένου οξυγόνου που περιέχονταν στο δείγμα κατά την ενζυμική αντίδραση της γλυκόζης με την οξειδάση της γλυκόζης³⁴, σύμφωνα με τις παρακάτω χημικές εξισώσεις



Οι φορητές συσκευές που αναπτύχθηκαν, ωστόσο, χρησιμοποίησαν διαφορετική μεθοδολογία για τον προσδιορισμό της γλυκόζης, προσδιορίζοντας αμπερομετρικά το ενζυμικά παραγόμενο H_2O_2 . Η πρώτη εμπορικά διαθέσιμη συσκευή, ο αναλυτής 23A YSI, που ανήκει στην πρώτη γενιά αναλυτών γλυκόζης, παρουσιάστηκε το 1975 και η λειτουργία του βασίζεται στον άμεσο προσδιορισμό του H_2O_2 με ηλεκτρόδια λευκόχρυσου. Οι συσκευές που αναπτύχθηκαν τα επόμενα χρόνια (δεύτερης γενιάς), βασίστηκαν σε ηλεκτρόδια στερεάς κατάστασης τροποποιημένα με διαμεσολαβητές μεταφοράς φορτίου. Με τους διαμεσολαβητές, αποφεύγεται η οξείδωση του H_2O_2 σε πολύ υψηλά δυναμικά, όπου οξειδώνονται και άλλες αναγωγικές ενώσεις που υπάρχουν στο αίμα. Επίσης με τους βιοαισθητήρες γλυκόζης δεύτερης γενιάς εξαλείφθηκαν τα προβλήματα με την περιορισμένη συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου (μικρότερη συγκέντρωση ως προς αυτήν της γλυκόζης) στο αίμα. Ο πρώτος αμπερομετρικός βιοαισθητήρας αυτής της γενιάς κυκλοφόρησε το 1987 με την ονομασία ExacTech. Τέλος, η τεχνολογία στην οποία βασίστηκαν οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες γλυκόζης μετά το 1992, αφορούσε την άμεση ηλεκτρονική επικοινωνία του ενεργού κέντρου του ενζύμου (συγκεκριμένα της προσθετικής ομάδας FAD/FADH₂) με το ηλεκτρόδιο και την απευθείας μεταφορά των ηλεκτρονίων, χωρίς την παρουσία του διαμεσολαβητή³⁵.

Οι αλλαγές αυτές στην τεχνολογία των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων γλυκόζης αφορούσαν κυρίως τη βελτίωση της λειτουργίας τους και δεν είχαν καμία επίδραση στον τελικό χρήστη. Η μεγάλη εξέλιξη ήρθε τα τελευταία χρόνια με τις φορέσιμες (wearable) συσκευές συνεχούς μέτρησης της γλυκόζης. Οι συσκευές αυτές περιέχουν μια βελόνα με διαστάσεις στην κλίμακα του μικρόμετρου, η οποία αποτελεί το ηλεκτρόδιο και μετράει συνεχόμενα τη γλυκόζη στο διάμεσο υγρό (interstitial fluid) κάτω από το δέρμα. Η συνεχόμενη μέτρηση της γλυκόζης καταγράφεται σε μία φορητή συσκευή ή αποστέλλεται σε έξυπνα κινητά, δημιουργώντας ένα καθημερινό προφίλ γλυκόζης³⁶. Με την εφαρμογή αυτής της προχωρημένης τεχνολογίας, ο ασθενής μπορεί να ενημερωθεί άμεσα από τη συσκευή όταν τα επίπεδα γλυκόζης είναι εκτός των φυσιολογικών ορίων και να προλάβει οποιοδήποτε επεισόδιο. Η εξέλιξη των συσκευών μέτρησης της γλυκόζης του αίματος παρουσιάζεται στο **Σχήμα 4**.



1975



1993



2013



2020

Σχήμα 4. Η εξέλιξη των συσκευών μέτρησης γλυκόζης με την πάροδο των χρόνων³³.

Σήμερα, έχουν αναπτυχθεί και άλλες συσκευές για τον (ταυτόχρονο) προσδιορισμό διαφόρων αναλυτών στο αίμα, όπως γλυκόζη, χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, γαλακτικό οξύ, ουρικό οξύ, αιμογλοβίνη κ.α. (**Σχήμα 5**). Η εταιρεία Roche έχει κατασκευάσει μία συσκευή για τον ποσοτικό προσδιορισμό της χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων και του γαλακτικού οξέος στο αίμα, με δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί από τους ασθενείς. Ο χρήστης επιλέγει την κατάλληλη αποσπώμενη ταινία ανάλογα με το βιοχημικό δείκτη που θέλει να μετρήσει και την εισάγει στη συσκευή Accutrend® Plus system. Η ίδια εταιρεία έχει αναπτύξει μία συσκευή για τον έλεγχο της πήκτικότητας του αίματος, την CoaguChek® INRange system. Η εταιρεία ACCU-ANSWER® έχει κατασκευάσει μία συσκευή για τον προσδιορισμό της γλυκόζης, της χοληστερόλης, της αιμογλοβίνης και του ουρικού οξέος. Μία συσκευή για τον προσδιορισμό του γαλακτικού οξέος, της αιμογλοβίνης και του αιματοκρίτη κατασκευάστηκε από τη Nova® biomedical, με την ονομασία StatStrip® lactate / hemoglobin / hematocrit. Για την εφαρμογή των συσκευών αυτών, ο ασθενής αρκεί να μεταφέρει στην ταινία της συσκευής μία σταγόνα αίματος που παραλαμβάνει μετά από τρύπημα του δακτύλου. Παρ' όλο που η λήψη αίματος θεωρείται μία επεμβατική διαδικασία, αφού απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό για αυτή και το αίμα είναι ένα βιολογικό δείγμα που δεν εκκρίνεται αυθόρμητα από

Θεωρητικό μέρος

το σώμα, η τεχνολογία που αναπτύχθηκε με τη λήψη μίας μόνο σταγόνας με το τρύπημα του δακτύλου, δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν οι συσκευές αυτές εξ' ολοκλήρου από τους ασθενείς.

Accutrend® Plus System



CoaguChek® INRange system



ACCU-ANSWER®



StatStrip® lactate/hemoglobin/hematocrit



Σχήμα 5. PoC συσκευές για τον προσδιορισμό διαφόρων βιοδεικτών στο αίμα.

1.3.2 Οπτικές διαγνωστικές συσκευές

Εκτός των αμπερομετρικών συσκευών, έχουν αναπτυχθεί και άλλες συσκευές που βασίζονται σε οπτικές μεθόδους ανάλυσης (**Σχήμα 6**). Δύο από αυτές είναι το χολερυθρινόμετρο που χρησιμοποιείται κυρίως στα βρέφη για την εξέταση για ίκτερο και το ευρέως χρησιμοποιούμενο οξύμετρο για τον προσδιορισμό του διαλυμένου οξυγόνου στο αίμα. Η εξέταση με αυτές τις συσκευές πραγματοποιείται απλώς με την επαφή στο ανθρώπινο σώμα, και ανήκουν στην κατηγορία των πλήρως μη επεμβατικών αναλυτικών συσκευών.

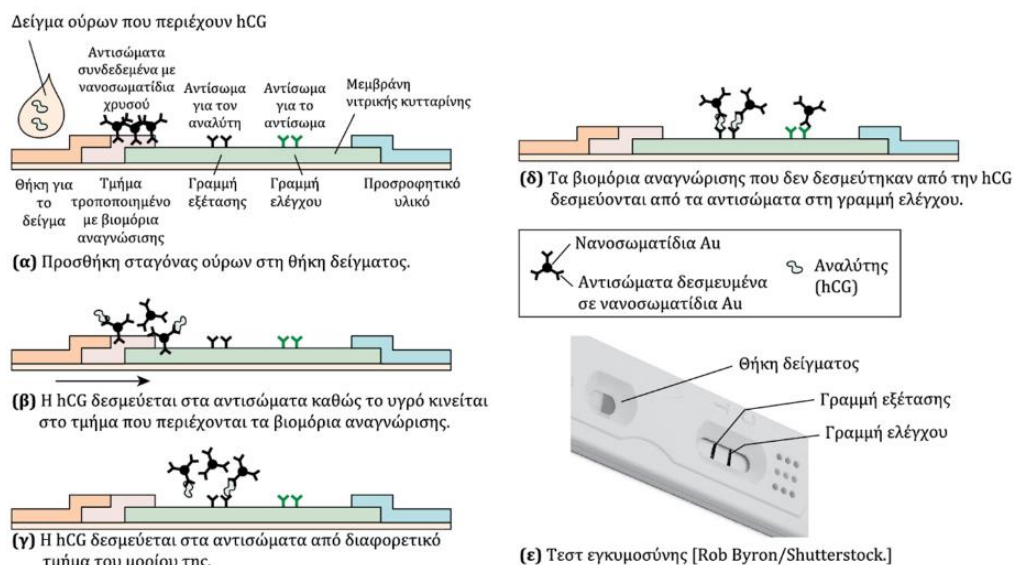


Σχήμα 6. PoC συσκευές (αριστερά) για τον προσδιορισμό της χολερυθρίνης στο αίμα, μοντέλο BiliCare™ της εταιρείας Mennen Medical Ltd. και (δεξιά) για τον προσδιορισμό του διαλυμένου οξυγόνου στο αίμα, μοντέλο OXYGEN PO01 της εταιρείας MEDEL®.

1.3.3 Διαγνωστικά τεστ πλευρικής ροής (Lateral Flow)

Η Ανοσοχρωματογραφία, ή αλλιώς δοκιμασία πλευρικής ροής, κατέχει παγκοσμίως ένα πολύ μεγάλο μέρος των διαθέσιμων PoC συσκευών. Σε αυτή την τεχνολογία έχουν βασιστεί πολλές συσκευές για τον προσδιορισμό διαφόρων ιών όπως ο SARS-CoV-2, ο HIV, ο Zika, ο ιός της γρίπης, ο έμπολα κ.α., και ασθενειών όπως η ηπατίτιδα, η ελονοσία, ο δάγκειος πυρετός και η φυματίωση, ενώ αποτελεί τη βάση και για την ανάπτυξη των τεστ εγκυμοσύνης^{37,38}. Το πλεονέκτημα της τεχνολογίας αυτής είναι ότι μπορεί, με μία απλή τροποποίηση των αντισωμάτων που ακινητοποιούνται, να ανιχνεύσει πληθώρα ιών, χωρίς να χρειάζεται κανένας νέος σχεδιασμός. Η συσκευή αποτελείται από ένα πορώδες υπόστρωμα, που συνήθως είναι ένα χαρτί νιτρικής κυτταρίνης. Στη μία πλευρά του, εκεί όπου εισέρχεται το δείγμα, είναι ακινητοποιημένα αντισώματα ως προς τον αναλύτη στόχο, συζευγμένα με κάποιο χρωμοφόρο υλικό, στις περισσότερες περιπτώσεις νανοσωματίδια χρυσού. Στην περίπτωση που το δείγμα είναι θετικό και περιέχει τα αντίστοιχα αντιγόνα, αυτά δεσμεύονται από τα αντισώματα και το δείγμα ρέει προς την αντίθετη πλευρά του υποστρώματος, μέσω τριχοειδών δυνάμεων. Στην αντίθετη πλευρά είναι ακινητοποιημένα, σε μία σειρά (test line), αντισώματα ειδικά ως προς τον αναλύτη στόχο, πάνω στα οποία προσδένονται τα αντιγόνα που είναι συνδεδεμένα με τα

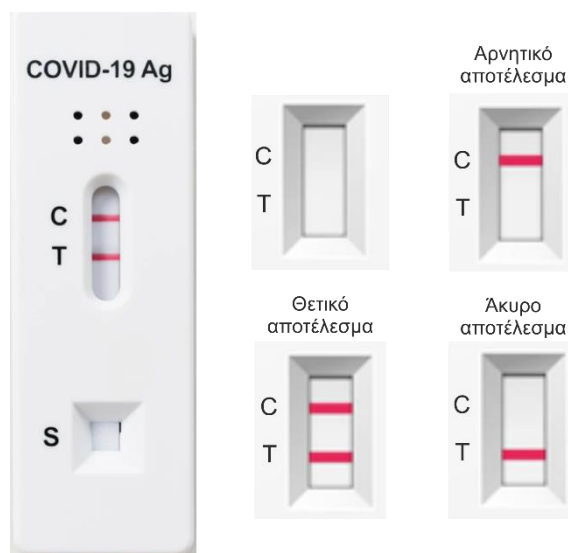
συζευγμένα με τα νανοσωματίδια χρυσού αντισώματα. Με τη συγκέντρωση των αντιγόνων σε αυτή τη γραμμή, εμφανίζεται το κόκκινο χρώμα των νανοσωματιδίων χρυσού και το δείγμα λαμβάνεται ως θετικό. Απουσία των αντιγόνων, δεν είναι δυνατή η σύνδεση των συζευγμένων με τα νανοσωματίδια χρυσού αντισωμάτων σε αυτή τη γραμμή αντισωμάτων, οπότε και δεν παρατηρείται ο χρωματισμός της γραμμής. Στο τέλος του υποστρώματος υπάρχει μία ακόμη σειρά αντισωμάτων (control line), ειδικά ως προς τα αντισώματα του αναλύτη στόχου, στην οποία δεσμεύονται, ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη αντιγόνου στο δείγμα, τα ελεύθερα αντισώματα συζευγμένα με νανοσωματίδια χρυσού. Η σειρά αυτή αποσκοπεί στον έλεγχο της λειτουργίας του διαγνωστικού τεστ. Έτσι, όταν εμφανίζεται μόνο μία κόκκινη γραμμή, το δείγμα είναι αρνητικό, ενώ όταν εμφανίζονται δύο κόκκινες γραμμές, θετικό. Ένα παράδειγμα λειτουργίας των συσκευών πλευρικής ροής, παρουσιάζεται στο **Σχήμα 7**, το οποίο περιγράφει λεπτομερώς τον τρόπο ανίχνευσης της Χοριακής Γοναδοτροπίνης (hCG), μίας ορμόνης που εκκρίνεται στα ούρα των εγκύων. Η συσκευή αυτή αποτελεί το κοινό τεστ εγκυμοσύνης, το οποίο μπορεί να διεξαχθεί στο σπίτι.



Σχήμα 7. Απεικόνιση λειτουργίας των διαγνωστικών τεστ πλάγιας ροής³⁸.

Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό, οι συσκευές αυτές έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την ποιοτική ανίχνευση και όχι τον ποσοτικό προσδιορισμό του αναλύτη. Το αποτέλεσμα που δίνουν είναι ΝΑΙ/ΟΧΙ και δηλώνουν την παρουσία ή μη του αντιγόνου στο δείγμα. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό με την τεχνολογία αυτή, απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο μέτρησης της έντασης του χρώματος. Η μέτρηση της έντασης του χρώματος θα μπορούσε στην πιο απλή μορφή της συσκευής να γίνεται με ένα έξυπνο κινητό και την κατάλληλη εφαρμογή (application). Άλλες τεχνολογίες που έχουν αναπτυχθεί προς αυτή την κατεύθυνση, είναι η μέτρηση της έντασης του χρώματος με ημιαγωγούς μεταλλικών οξειδίων (complementary metal-oxide-semiconductor, CMOS) ή συσκευές συζευγμένου φορτίου (charge-coupled device, CCD)³⁹. Εκτός από τη μέτρηση του χρώματος ως μετρούμενο σήμα, μπορεί να πραγματοποιηθεί με τις ίδιες συσκευές και μέτρηση της έντασης του φθορισμού, αλλάζοντας τα νανοσωματίδια χρυσού⁴⁰ με latex⁴¹, ή μέτρηση της έντασης του μαγνητικού πεδίου με συσκευές μαγνητοαντίστασης (giant magnetoresistive), χρησιμοποιώντας μαγνητικά νανοσωματίδια⁴².

Οι συσκευές αυτές, έχουν εδραιωθεί παγκοσμίως λόγω της απλότητας στην εφαρμογή τους. Δεν απαιτείται κανένας επιπλέον εξοπλισμός για την ανάγνωση του σήματος, ούτε κάποια επιπλέον πηγή ενέργειας για τη λειτουργία τους. Με τη σταθεροποίηση των αντιδραστηρίων στην ταινία νιτρικής κυτταρίνης είναι δυνατή η διατήρηση αυτών των συσκευών σε συνθήκες περιβάλλοντος για μεγάλο χρονικό διάστημα, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα να διοχετεύονται στην παγκόσμια αγορά. Η λήψη του αποτελέσματος από τους ασθενείς γίνεται σε λιγότερο από 30 λεπτά, και λόγω της απλής λειτουργίας τους, τα ιατρικά κέντρα μπορούν να πραγματοποιούν αναλύσεις πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα. Η μεγάλη σημασία αυτής της τεχνολογίας και οι δυνατότητες που έχει, φάνηκαν στην πανδημία το 2020, όταν οι επιστήμονες ανέπτυξαν διαγνωστικά τεστ για τον SARS-CoV-2 (Covid-19) σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα (**Σχήμα 8**), επιτυγχάνοντας έτσι τον περιορισμό των συνεπειών στην υγεία και την οικονομία.



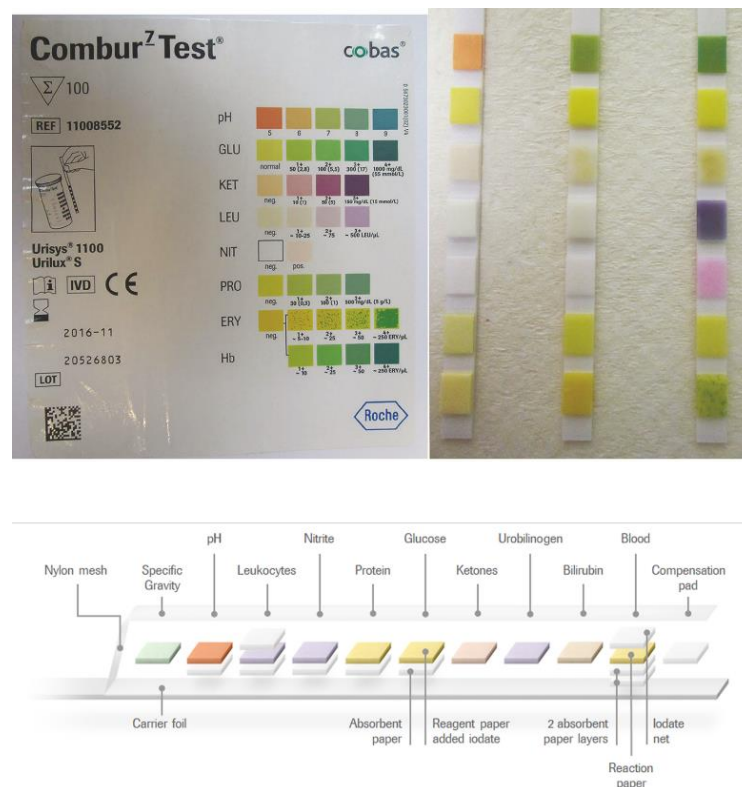
Σχήμα 8. Διαγνωστική συσκευή πλευρικής ροής για τον προσδιορισμό του SARS-CoV-2.

1.3.4 Διαγνωστικές ταινίες ούρων

Η ανάπτυξη διαγνωστικών συσκευών με βάση το χαρτί οφείλεται στο γεγονός ότι το χαρτί είναι ένα οικονομικό υλικό, διαθέσιμο σε μεγάλες ποσότητες, που μπορεί να παραχθεί σε μεγάλη κλίμακα. Επιπλέον, το χαρτί επιτρέπει τη μεταφορά υγρών μέσω τριχοειδούς δράσης (capillary action) χωρίς την εφαρμογή εξωτερικής ενέργειας και παρέχει τη δυνατότητα αποθήκευσης αντιδραστηρίων σε ενεργό μορφή στις ίνες του⁴³. Ο λόγος της επιφάνειας του υποστρώματος προς τον όγκο του διαλύματος που συγκρατεί είναι υψηλός, με συνέπεια τη συγκέντρωση μεγάλου αριθμού μορίων του αναλύτη και, κατ' επέκταση, τη βελτίωση των ορίων ανίχνευσης για τις χρωματομετρικές μεθόδους.

Ένα εμπορικά διαθέσιμο διαγνωστικό τεστ, σχεδιασμένο πάνω σε χαρτί (filter paper) έχει αναπτυχθεί για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μέχρι και έντεκα βιοχημικών δεικτών στα ούρα^{44,45}. Ένα παράδειγμα παρουσιάζεται στο **Σχήμα 9**. Πάνω στην ταινία είναι ακινητοποιημένα τα αντίστοιχα αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό του pH, της γλυκόζης, της χολερυθρίνης, του ειδικού βάρους, πρωτεϊνών, νιτρωδών, λευκοκυττάρων, ουροχολινογόνου, κετονών, ασκορβικού οξέος και της παρουσίας του αίματος στα ούρα. Η ανίχνευση των βιοδεικτών

πραγματοποιείται σε συγκεκριμένες θέσεις της ταινίας, σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή, εμβαπτίζοντας απλά το ένα άκρο της ταινίας στο δείγμα ούρων και περιμένοντας την ανάπτυξη του μέχρι την άλλη άκρη μέσω τριχοειδών δυνάμεων. Η διαδικασία της εξέτασης αυτής διαρκεί ελάχιστα δευτερόλεπτα και τα αποτελέσματα λαμβάνονται από μία βαθμονομημένη χρωματική κλίμακα που παρέχεται στη συσκευασία από τον κατασκευαστή. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων με τη χρωματική κλίμακα πραγματοποιείται οπτικά από τον ασθενή χωρίς να απαιτείται καμία επιπλέον ενέργεια. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ο πολύ μικρός χρόνος ανάλυσης έντεκα βιοδεικτών, η μη επεμβατική διαδικασία εφόσον το εξεταζόμενο δείγμα είναι τα ούρα και το πολύ χαμηλό κόστος ανάλυσης.



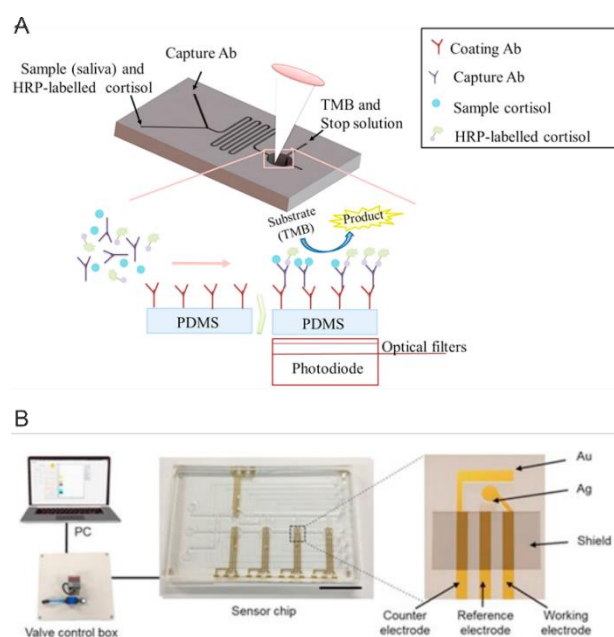
Σχήμα 9. Διαγνωστικές ταινίες ούρων για την ταυτόχρονη ανίχνευση διαφόρων βιοδεικτών⁴⁵. Το μοντέλο λειτουργίας των ταινιών στην κάτω εικόνα λήφθηκε από τη σελίδα της εταιρείας Roche και αναφέρεται στις ταινίες Combur-Test® strip.

<https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/combur-chemstrip-ins-656.html#>

2 Ανάπτυξη PoC τεχνολογίας σε ερευνητικό επίπεδο

2.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ανάπτυξη νέων συσκευών για τη διεξαγωγή κλινικών αναλύσεων στο σημείο περίθαλψης, στο σπίτι του ασθενούς και σε αποκεντρωμένες περιοχές, είναι ένα ενεργό πεδίο έρευνας σε παγκόσμια κλίμακα. Οι μελέτες αυτές αποτελούν τη βάση για την ανάπτυξη νέων εμπορικά διαθέσιμων συσκευών, οι οποίες θα καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος κλινικών αναλύσεων. Στο παρελθόν, έχουν αναπτυχθεί πολλές διαγνωστικές συσκευές, οι οποίες ωστόσο απαιτούν τον αντίστοιχο εξειδικευμένο εξοπλισμό για να λειτουργήσουν. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η δημιουργία μίας ρευστομηχανικής κατασκευής για το φασματομετρικό προσδιορισμό της κορτιζόλης στο σάλιο, όπου η ομάδα του V. Pinto, για την εξαγωγή του σήματος, χρησιμοποίησε μία συσκευή μέτρησης απορρόφησης, βασισμένη στην τεχνολογία CMOS⁴⁶. Σε μία ηλεκτροχημική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του G. Lee, η ανάλυση βιοδεικτών για την πνευμονική υπέρταση διεξήχθη μέσω ενός υπολογιστή συνδεδεμένου με μία συσκευή ρευστομηχανικής⁴⁷. Η σχηματική απεικόνιση των παραπάνω συσκευών δίνεται στο **Σχήμα 10**.



Σχήμα 10. Α) Ρευστομηχανική συσκευή για το φασματομετρικό προσδιορισμό της κορτιζόλης στο σάλιο⁴⁶ και Β) Ηλεκτροχημική ανάλυση βιοδεικτών της πνευμονικής υπέρτασης⁴⁷.

Η εξέλιξη της τεχνολογίας ως προς την ανάπτυξη «έξυπνων» συσκευών που έχουν τη δυνατότητα να συνδεθούν με ποικίλους τρόπους με τις διαγνωστικές συσκευές, αποτελούν οδηγό τα τελευταία χρόνια για τους ερευνητές. Οι δυνατότητες που προσφέρουν τα «έξυπνα» κινητά στην ανάλυση δεδομένων και στη συνδεσιμότητα με άλλες συσκευές, είναι ένα σημαντικό εργαλείο στην ανάπτυξη φορητών διαγνωστικών συσκευών. Η εμφάνιση PoC συσκευών που λειτουργούν σε συνδυασμό με «έξυπνα» κινητά, ξεκίνησε εδώ και δύο δεκαετίες⁴⁸. Τα διάφορα ηλεκτρονικά εξαρτήματα που βρίσκονται ενσωματωμένα σε μια έξυπνη συσκευή, όπως η κάμερα, ο επεξεργαστής, η μονάδα τροφοδοσίας, οι θύρες για σύνδεση μέσω micro-USB και jack και η δυνατότητα για ασύρματη επικοινωνία μέσω Wi-Fi, Bluetooth και NFC, έχουν αξιοποιηθεί από τους ερευνητές για την αντικατάσταση εξειδικευμένων συσκευών που απαιτούνται τόσο στις οπτικές (φασματοφωτόμετρο, φθορισμόμετρο), όσο και στις ηλεκτροχημικές (ποτενσιοστάτης) μεθόδους. Σημαντικά κριτήρια για την αφομοίωση της τεχνολογίας των κινητών στις ιατροδιαγνωστικές συσκευές είναι το χαμηλό κόστος και η ευρεία διαθεσιμότητα τους σε όλο τον πλανήτη. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι το ποσοστό των ανθρώπων που χρησιμοποιούν κινητό παγκοσμίως ανέρχεται στο 68% το 2018, και φτάνει στο 95% στην Αμερική και το 80% στην Αφρική, την Ασία και τη Μέση Ανατολή⁴⁹. Τα επιπλέον χαρακτηριστικά των σύγχρονων κινητών τηλεφώνων (smart phones) όπως οι διάφορες ψηφιακές θύρες, οι ταχείς επεξεργαστές, η πολύ καλή ενεργειακή αυτονομία, οι συσκευές ασύρματης μεταφοράς ψηφιακών σημάτων, η ενσωματωμένη οθόνη (συνήθως υψηλής ευκρίνειας) για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων και η δυνατότητα ανάπτυξης νέων εφαρμογών για την επεξεργασία των δεδομένων (applications), σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα, καθιστά τα κινητά τηλέφωνα ως ιδανική πλατφόρμα για την ανάπτυξη ή/και υποστήριξη φορητών αναλυτικών συσκευών.

2.2 Οπτικές μέθοδοι ανάπτυξης PoC συσκευών

Οι κατηγορίες των οπτικών τεχνικών στις οποίες έχουν ενσωματωθεί τα «έξυπνα» κινητά είναι η χρωματομετρία, η φθορισμομετρία και η χημειοφωταύγεια⁵⁰. Σε αυτές τις εφαρμογές, το οπτικό σήμα λαμβάνεται σε μορφή εικόνας μέσω της

ενσωματωμένης κάμερας, η οποία μετά επεξεργάζεται από την κατάλληλη εφαρμογή ώστε να μετατραπεί το οπτικό σήμα σε χρωματικό μοντέλο. Μεταξύ των τριών οπτικών μεθόδων που αναφέρθηκαν παραπάνω, η χρωματομετρία έχει αναπτυχθεί σε μεγαλύτερο βαθμό λόγω της απλότητας στην εφαρμογής της και του μικρού κόστους που απαιτείται για την ανάπτυξη των αντίστοιχων χρωματομετρικών (βιο)αισθητήρων. Οι παραδοσιακές μέθοδοι αξιολόγησης ενός χρώματος είναι α) η οπτική παρατήρηση και η σύγκριση με μία βαθμονομημένη παλέτα χρωμάτων, όπως στην περίπτωση των διαγνωστικών ταινιών ούρων που περιεγράφηκαν παραπάνω, και β) η χρήση χρωματομέτρου, ενός οργάνου που μετράει την απορρόφηση σε συγκεκριμένα μήκη κύματος και τα μετατρέπει σε χρωματικές παραμέτρους⁵⁰. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτές έχουν σημαντικά μειονεκτήματα, όπως η χαμηλή ευαισθησία και ακρίβεια που παρουσιάζει η οπτική παρατήρηση από διαφορετικούς ανθρώπους και το μεγάλο κόστος και η αδυναμία μεταφοράς των χρωματομέτρων. Για την αποφυγή αυτών των μειονεκτημάτων, προτείνεται στη βιβλιογραφία η αντικατάσταση του χρωματομέτρου από «έξυπνα» κινητά, τα οποία περιέχουν υψηλής ανάλυσης κάμερες και προφέρουν τη δυνατότητα επεξεργασίας του σήματος από εφαρμογές αναγνώρισης χρώματος που αναπτύσσονται για το σκοπό αυτό.

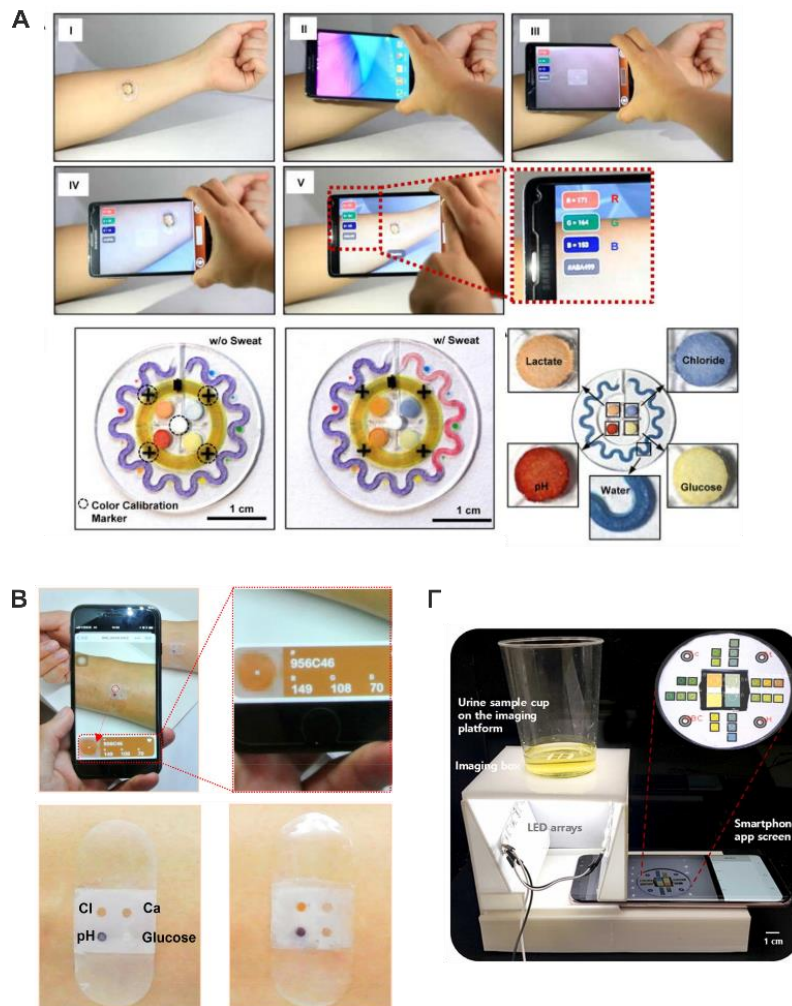
Μία έρευνα που χρησιμοποιεί το κινητό ως συσκευή ανάλυσης για τον προσδιορισμό βιοδεικτών παρουσιάστηκε από τους Ahyeon Koh et al.⁵¹. Στη μελέτη αυτή αναπτύχθηκε μία φορέσιμη μικρορευστομηχανική συσκευή, η οποία εφαρμόζεται στο δέρμα με τρόπο ώστε να διαχέεται ο ιδρώτας στα κανάλια που φέρει, για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του γαλακτικού οξέος, της γλυκόζης, των χλωριούχων ιόντων και του pH. Η συσκευή που σχεδιάστηκε παρουσιάζεται στο **Σχήμα 11Α**. Ο προσδιορισμός των αναλυτών πραγματοποιείται χρωματομετρικά, μέσω των αντιδράσεων με χρωμοφόρες ενώσεις, κατά τις οποίες παράγονται προϊόντα με διαφορετικό χρώμα. Η μεταβολή του χρώματος, εκφρασμένη ως προς το χρωματικό μοντέλο RGB (Red, Green, Blue), η οποία καταγράφεται με την κάμερα του κινητού και επεξεργάζεται από μία εφαρμογή που αναπτύχθηκε για αυτή τη μελέτη, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη. Στη συσκευή τυπώθηκε ένα κύκλωμα NFC το οποίο δίνει αυτόματα σήμα στο κινητό να καταγράψει την εικόνα όταν βρίσκονται σε κοντινή απόσταση. Μία άλλη πρόκληση που αντιμετωπίστηκε από την παραπάνω ερευνητική ομάδα, είναι η παρεμπόδιση από το διάχυτο φως του

περιβάλλοντος, το οποίο επηρεάζει την σωστή καταγραφή του χρώματος από την κάμερα του κινητού. Για το σκοπό αυτό ενσωμάτωσαν κάποια σημεία αναφοράς με λευκό και μαύρο χρώμα στη συσκευή, μέσω των οποίων γίνονταν οι απαραίτητες διορθώσεις στα χρώματα στις περιοχές ανίχνευσης των αναλυτών. Το σημείο αυτό αποτελεί ένα τεράστιο εμπόδιο στην άμεση εφαρμογή των κινητών στις χρωματομετρικές αναλύσεις. Ως εκ τούτου, στις περισσότερες εφαρμογές συστήνεται η λήψη των φωτογραφιών σε κλειστούς θαλάμους ή η καταγραφή του χρώματος από επιτραπέζιους σαρωτές, όπου οι συνθήκες είναι επαναλήψιμες.

Σε μία πιο απλή εφαρμογή, οι Xuecheng He et al. κατασκεύασαν μία χρωματομετρική συσκευή σε μορφή επιδέσμου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της γλυκόζης, των ιόντων ασβεστίου και χλωρίου και του pH στον ιδρώτα⁵². Η συσκευή περιλάμβανε μία υπερ-υδρόφοβη επιφάνεια για την εφίδρωση και την υποβοήθηση της συλλογής του ιδρώτα στις ζώνες ανίχνευσης, οι οποίες είχαν τροποποιηθεί με τους αντίστοιχους δείκτες για τον προσδιορισμό του κάθε αναλύτη (**Σχήμα 11B**). Η μεταβολή του χρώματος εκφρασμένη ως %RGB πραγματοποιήθηκε με μία ελεύθερα διαθέσιμη στο διαδίκτυο εφαρμογή ανάλυσης χρώματος (Color Pick). Η συσκευή χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των αναλυτών σε πραγματικά δείγματα ιδρώτα.

Μία διαφορετική συσκευή για τον προσδιορισμό διαφόρων αναλυτών στα ούρα, προτάθηκε από τους Mahabubur Rahman et al.⁵³. Η συσκευή αποτελείται από ένα φορητό κουτί το οποίο περιέχει μία βάση για ένα δοχείο δείγματος, ένα κλειστό χώρο με φωτισμό LED για τη διατήρηση του ομοιόμορφου φωτισμού στο χώρο αυτό, και ένα άνοιγμα για την τοποθέτηση του κινητού (**Σχήμα 11Γ**). Στη συσκευή είναι ενσωματωμένος ένας χρωματικός χάρτης που λειτουργεί ως σημείο αναφοράς των χρωμάτων. Τέσσερις ταινίες ανάλυσης ούρων, με την κάθε μία να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της γλυκόζης, του pH, της πρωτεΐνης και των ερυθρών κυττάρων, ενσωματώθηκαν στο εσωτερικό μέρος ενός δοχείου δείγματος ούρων και το δοχείο τοποθετήθηκε στη συσκευή έτσι ώστε οι ταινίες ανάλυσης να ευθυγραμμίζονται με τους χρωματικούς δείκτες. Οι μόνες ενέργειες που απαιτείται να κάνει ο χρήστης στην εφαρμογή αυτή είναι να τοποθετήσει το δείγμα στο δοχείο, και αυτό επάνω στη συσκευή και να λάβει την εικόνα του κάτω μέρους του δοχείου όπου είναι τοποθετημένες οι ταινίες ανάλυσης. Η τιμή της χρωματικής παραμέτρου

Ηue λαμβάνεται μέσω της εφαρμογής «BGS» που σχεδιάστηκε για το σκοπό αυτό και λειτουργεί σε «έξυπνες» συσκευές. Η τιμή αυτή μεταβάλλεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωση όλων των βιοδεικτών που εξετάστηκαν.



Σχήμα 11. (Α) Φορέσιμη μικρορευστομηχανική συσκευή για την ανάλυση βιοδεικτών στον ιδρώτα⁵¹, (Β) υπερ-υδρόφοβος φορέσιμος βιοαισθητήρας για την ανάλυση του ιδρώτα⁵² και (Γ) φορητή συσκευή για τον προσδιορισμό βιοδεικτών στα ούρα⁵³.

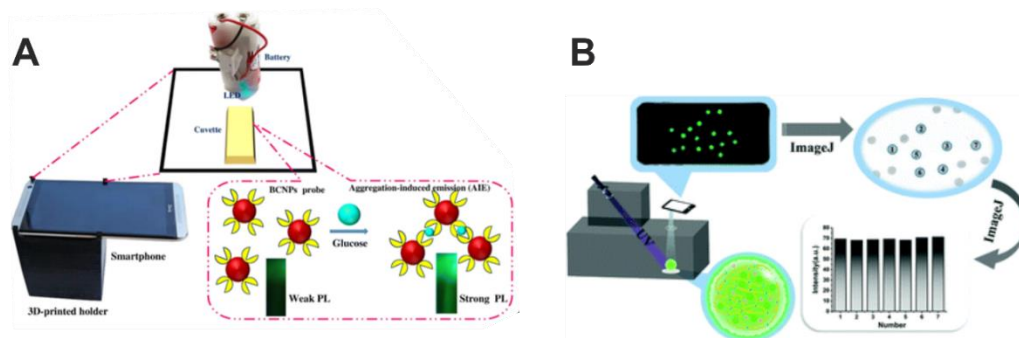
Η φθορισμομετρία είναι μία τεχνική με μεγάλη ευαισθησία και σχετικά απλή λειτουργία, η οποία διευκολύνει την ενσωμάτωση της σε PoC εφαρμογές⁵⁰. Ωστόσο, σε αντίθεση με τη χρωματομετρία, η φθορισμομετρία απαιτεί μία εξωτερική πηγή ακτινοβολίας για τη διέγερση των μορίων. Έτσι, για την ανίχνευση του φθορισμού από «έξυπνα» κινητά είναι απαραίτητη η ενσωμάτωση επιπλέον εξαρτημάτων όπως

φίλτρα εκπομπής, φίλτρα διέγερσης και κυρίως, μια πηγή διέγερσης. Οι Negar Alizadeh et al. στην έρευνα τους κατασκεύασαν ένα σύστημα για το φθορισμομετρικό προσδιορισμό της γλυκόζης στον ορό του αίματος⁵⁴. Η αρχή λειτουργίας του συστήματος βασίζεται στην εκλεκτική σύνδεση των μορίων γλυκόζης με τα νανοσωματίδια άνθρακα ενισχυμένα με βόριο και τη δημιουργία συσσωματωμάτων αυτών, αποτέλεσμα των οποίων είναι η αύξηση στο φθορισμό (Aggregation-Induced Emission). Το σύστημα που κατασκευάστηκε περιλαμβάνει ένα 3D εκτυπωμένο κουτί, το οποίο περιέχει ενσωματωμένη μία πηγή μπλε φωτός LED, τροφοδοτούμενη από δύο μπαταρίες, μία κυψελίδα για την τοποθέτηση του δείγματος και ένα άνοιγμα για την εφαρμογή του κινητού (**Σχήμα 12Α**). Οι εικόνες που λήφθηκαν από το κινητό, μεταφράστηκαν στο χρωματικό μοντέλο RGB μέσω μίας εφαρμογής ανάλυσης χρώματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ένταση του πράσινου χρώματος μεταβάλλονταν γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση της γλυκόζης. Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση πραγματικών δειγμάτων ορού αίματος και τα αποτελέσματα ήταν σε συμφωνία με αυτά που λήφθηκαν με μία κλινική μέθοδο αναφοράς, με τη σχετική τυπική απόκλιση να είναι μικρότερη από 5%.

Σε άλλη μελέτη οι Fan Lu et al. παρασκεύασαν κβαντικές κουκίδες υδρογέλης αλγινικού νατρίου οι οποίες περιέχουν CdZnTeS και το ένζυμο ουρική αλδεϋδάση (Alg@QDs-UOx MSs), για τον προσδιορισμό του ουρικού οξέος στα ούρα⁵⁵. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην απόσβεση του φθορισμού των κβαντικών κουκίδων παρουσία του H₂O₂, το οποίο είναι προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης του ουρικού οξέος με την ουρική αλδεϋδάση. Οι ερευνητές δημιούργησαν ένα κουτί μέσα στο οποίο τοποθετήθηκαν τα διαλύματα των κβαντικών κουκίδων μαζί με τα δείγματα. Ο φθορισμός των διαλυμάτων επετεύχθη με την ενσωμάτωση μία πηγής UV ακτινοβολίας και οι εικόνες λήφθηκαν με ένα κινητό και στη συνέχεια επεξεργάστηκαν μέσω μίας ελεύθερα διαθέσιμης εφαρμογής στο διαδίκτυο, την εφαρμογή ImageJ (**Σχήμα 12Β**). Η ένταση της γκρι απόχρωσης των εικόνων παρουσιάζει γραμμική απόκριση με τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος.

Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Roda et al., κατασκευάστηκε ένα 3D εκτυπωμένο σύστημα για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης στον ορό του αίματος και των ολικών χολικών οξέων στον ορό του αίματος και στο σάλιο, μέσω της χημειοφωταύγειας⁵⁶ (**Σχήμα 13**).

Μία υποκατηγορία της χημειοφωταύγειας είναι η ηλεκτροχημειοφωταύγεια, η οποία ωστόσο χρειάζεται επιπλέον εξοπλισμό για τη λειτουργία της. Εκτός από τις συσκευές ενίσχυσης της ανάλυσης της κάμερας που απαιτούνται στην περίπτωση της χημειοφωταύγειας, η ηλεκτροχημειοφωταύγεια απαιτεί και τη χρήση ποτενσιοστάτη για την παραγωγή του σήματος. Οι ενώσεις που παράγουν το σήμα, όπως η λουμινόλη, αντιδρούν με τα προϊόντα των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων που προκύπτουν μετά την εφαρμογή κατάλληλου δυναμικού⁵⁷.



Σχήμα 12. (Α) Συσκευή φθορισμομετρικού προσδιορισμού της γλυκόζης στον ορό του αίματος⁵⁴, (Β) Σχηματική αναπαράσταση της PoC συσκευής για τον προσδιορισμό του ουρικού οξέος⁵⁵



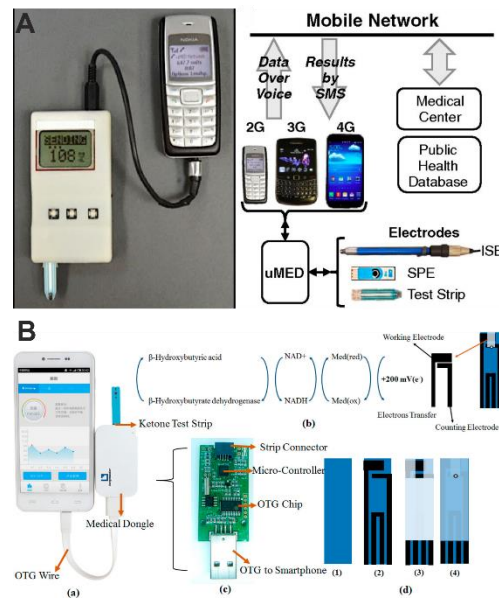
Σχήμα 13. Εικόνες των 3D εκτυπωμένων εξαρτημάτων για την ανάπτυξη φορητής συσκευής προσδιορισμού της χοληστερόλης στον ορό του αίματος και των ολικών χολικών οξέων στον ορό του αίματος και στο σάλιο⁵⁶.

2.3 Ηλεκτροχημικές μέθοδοι ανάπτυξης PoC συσκευών

Η μετατροπή των εργαστηριακών οργάνων σε φορητές μικροσυσκευές έχει επεκταθεί και στον τομέα της ηλεκτροχημείας με τη δημιουργία φορητών ποτενσιοστατών. Μερικά παραδείγματα τέτοιων συσκευών είναι οι εμπορικά διαθέσιμες PoC συσκευές, που αναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα, για τη μέτρηση της γλυκόζης σε ασθενείς με διαβήτη και τον προσδιορισμό διαφόρων άλλων βιοδεικτών, όπως το ουρικό οξύ και τα τριγλυκερίδια. Η εξέλιξη της τεχνολογίας προς αυτήν την κατεύθυνση στοχεύει στη δημιουργία όλο και μικρότερων συσκευών, που να περιέχουν τα απολύτως απαραίτητα στοιχεία που απαιτούνται για τη διεξαγωγή της ηλεκτροχημικής διαδικασίας, ενώ η επεξεργασία των σημάτων και η αποθήκευση των δεδομένων γίνονται μέσα από μία φορητή συσκευή, όπως το κινητό ή ένας υπολογιστής⁵⁸. Πολλοί φορητοί ποτενσιοστάτες διατίθενται στην αγορά από διάφορες εταιρείες (π.χ. EmStat4S από την PalmSens και μStat 400 από τη Metrohm DropSens), το υψηλό τους κόστος, όμως, έχει οδηγήσει τους επιστήμονες στη δημιουργία νέων συστημάτων, που να είναι απόλυτα προσαρμόσιμα στους (βιο)αισθητήρες που αναπτύσσονται και να συνδέονται με τα κινητά με ποικίλους τρόπους.

Ένας φορητός ποτενσιοστάτης που αναπτύχθηκε από την ομάδα του Alex Nemiroski το 2014, έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με κινητά δεύτερης γενιάς μέσω της θύρας ήχου, και να πραγματοποιεί ηλεκτροχημικές μελέτες σε περιοχές με περιορισμένους πόρους⁵⁹. Η συσκευή, την οποία ονομάζουν uMED, έχει χαμηλό κόστος και μπορεί να συνδεθεί ακόμη και σε «έξυπνες» συσκευές εξαιτίας της διατήρησης της θύρας ήχου και στα κινητά των επόμενων γενιών που αναπτύχθηκαν⁵⁹ (**Σχήμα 14Α**).

Ένας φορητός ποτενσιοστάτης που συνδέεται μέσω θύρας USB OTG με τα «έξυπνα» κινητά, αναπτύχθηκε από τον Jinhong Guo⁶⁰. Με τη σύνδεση αυτή, ο ποτενσιοστάτης λειτουργούσε χωρίς ενσωματωμένη μπαταρία, λαμβάνοντας την απαραίτητη ενέργεια μέσω της σύνδεσης με το κινητό. Η μεταφορά δεδομένων και η αποθήκευση των αποτελεσμάτων σε μία βάση δεδομένων όπου δίνεται πρόσβαση στο ιατρικό προσωπικό, είναι μία διαδικασία που γίνεται αυτόματα με τη σύνδεση OTG (**Σχήμα 14Β**).



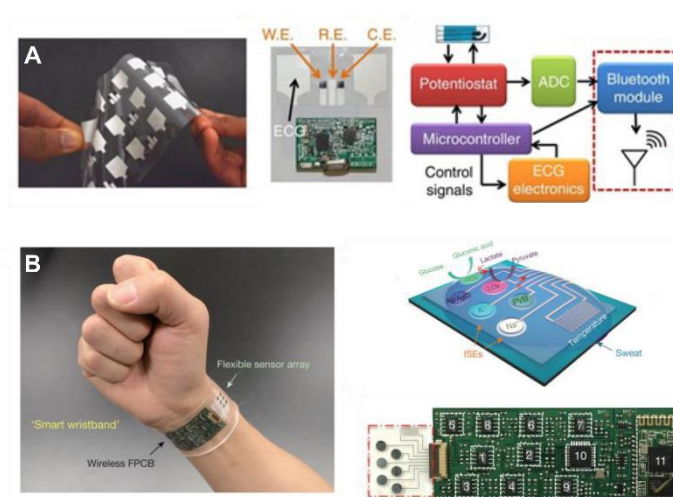
Σχήμα 14. (Α) Φορητός ποτενσιοστάτης συνδεδεμένος μέσω της θύρας ήχου με κινητό τηλέφωνο⁵⁹ και (Β) φορητός ποτενσιοστάτης συνδεδεμένος με καλώδιο OTG⁶⁰.

Τα τελευταία χρόνια, προτιμάται από τους ερευνητές η ασύρματη επικοινωνία των «έξυπνων» συσκευών με τους ποτενσιοστάτες όπου η αποστολή δεδομένων πραγματοποιείται μέσω Bluetooth ή NFC. Η σύνδεση μέσω Bluetooth μπορεί να πραγματοποιηθεί με οποιοδήποτε «έξυπνο» κινητό, ανεξαρτήτως του μοντέλου, και αποτελεί πλέον επιλογή και για τις εταιρείες κατασκευής φορητών ποτενσιοστατών⁴⁹. Η σύνδεση μέσω NFC έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά από αυτά του Bluetooth, καθώς απαιτείται ο ποτενσιοστάτης να είναι σε ελάχιστη απόσταση από το κινητό για να επιτευχθεί η επικοινωνία, ενώ δίνει τη δυνατότητα για μείωση του μεγέθους της συσκευής δεδομένου ότι το σύστημα NFC δεν χρειάζεται μπαταρία για να μεταφέρει τα δεδομένα. Το ηλεκτρονικό κύκλωμα του ποτενσιοστάτη, σε αυτές τις περιπτώσεις, κατασκευάζεται πάνω σε πολύ μικρές επιφάνειες δημιουργώντας έτσι συσκευές που μπορούν να φορεθούν και να διεξάγουν συνεχόμενες μετρήσεις. Οι συσκευές αυτές εκτός από το μεγάλο αριθμό συνεχόμενων μετρήσεων που μπορούν να πραγματοποιήσουν με ένα μόνο αισθητήρα, χωρίς να απαιτείται η εφαρμογή αποσπώμενων ταινιών μιας χρήσης, μπορούν να πραγματοποιήσουν και ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφόρων αναλυτών.

Ένα παράδειγμα αποτελεί η εργασία των Imani et al., οι οποίοι κατασκεύασαν ένα φορέσιμο σύστημα προσδιορισμού του γαλακτικού οξέος στον ιδρώτα, ενώ

ταυτόχρονα μπορεί να διεξάγει και ηλεκτροκαρδιογράφημα⁶¹ (Σχήμα 15A). Τα ηλεκτρόδια τυπώθηκαν με την τεχνική screen-printing πάνω σε μία εύκαμπτη, πολύ λεπτή επιφάνεια πολυεστέρα, η οποία προσαρμόζεται απόλυτα στο δέρμα. Ένα κύκλωμα που περιέχει ένα ποτενσιοστάτη και μπορεί να μεταδώσει τα δεδομένα μέσω Bluetooth σε ένα κινητό ή έναν υπολογιστή, τυπώθηκε πάνω σε μία πλακέτα τυπωμένου κυκλώματος (PCB). Οι διαστάσεις της πλακέτας είναι στο ίδιο μέγεθος με τα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια ώστε να δίνει τη δυνατότητα να φορεθεί. Η συσκευή δοκιμάστηκε σε τρεις ανθρώπους κατά τη διάρκεια άσκησης σε στατικό ποδήλατο.

Σε άλλη μελέτη, οι Gao et al. κατασκεύασαν ένα πλήρως φορέσιμο σύστημα για τον προσδιορισμό της γλυκόζης, του γαλακτικού οξέος, του καλίου και του νατρίου στον ιδρώτα⁶² (Σχήμα 15B). Η συστοιχία των ηλεκτροδίων εκτυπώθηκε πάνω σε μία επιφάνεια PET (τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο), η οποία είναι εύκαμπτη και προσαρμόζεται εύκολα σε κάθε σημείο του σώματος, ενώ και το ηλεκτρονικό κύκλωμα κατασκευάστηκε πάνω σε μία εύκαμπτη πλακέτα. Η συσκευή τροφοδοτείται από μία απλή μπαταρία λιθίου και πραγματοποιεί την επεξεργασία των σημάτων πάνω στην πλακέτα, στέλνοντας στο λογισμικό του κινητού τα αποτελέσματα μόνο.

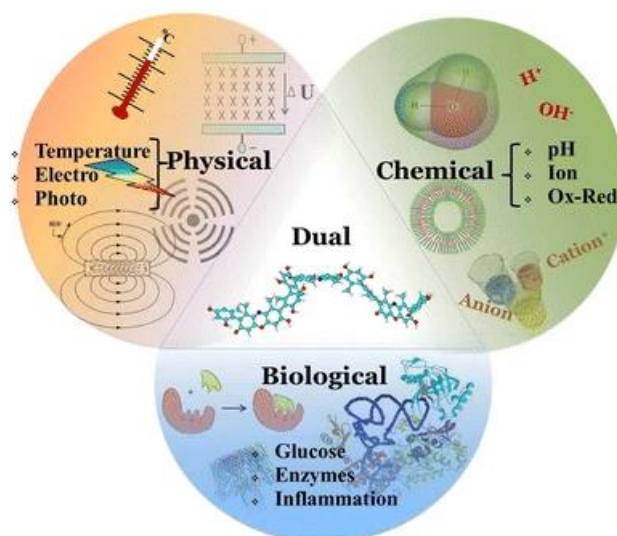


Σχήμα 15. (A) Φορέσιμο σύστημα προσδιορισμού του γαλακτικού οξέος στον ιδρώτα⁶¹ και (B) πλήρως εκτυπωμένο σύστημα προσδιορισμού βιοδεικτών στον ιδρώτα⁶².

3 Αποκρινόμενα πολυμερή σε PoC εφαρμογές

3.1 Εισαγωγή

Αποκρινόμενα πολυμερή, γνωστά και ως «έξυπνα πολυμερή», ονομάζονται τα πολυμερή τα οποία υφίστανται μεγάλες και απότομες μεταβολές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και/ή τη διαμόρφωση τους κατά τη μεταβολή διαφόρων φυσικών ή χημικών παραμέτρων (ερεθίσματα) στο μέσο στο οποίο βρίσκονται^{63,64}. Τα ερεθίσματα που προκαλούν τις αλλαγές αυτές διακρίνονται ως φυσικά, χημικά και βιοχημικά (**Σχήμα 16**)⁶⁴. Τα φυσικά ερεθίσματα, όπως το φως, η θερμοκρασία, οι υπέρηχοι, το μαγνητικό και ηλεκτρικό πεδίο και η μηχανική τάση, επιδρούν στις ενδομοριακές δυνάμεις των πολυμερικών αλυσίδων και επηρεάζουν το επίπεδο διαφόρων πηγών ενέργειας στα κρίσιμα σημεία του συστήματος πολυμερούς-διαλύτη. Τα χημικά ερεθίσματα, όπως ο διαλύτης, η ιοντική ισχύς, το pH και οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, μεταβάλλουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων του πολυμερούς ή του πολυμερούς με το διαλύτη σε μοριακό επίπεδο, ενώ σε μακρομοριακό επίπεδο μπορεί να επιφέρουν μεταβολές στην υδρόφιλη-υδρόφοβη ισορροπία, τη διαμόρφωση και τη διαλυτότητα, να προκαλέσουν διάσπαση δεσμών ή ακόμη την αποδόμηση του μορίου. Τέλος, τα βιοχημικά ερεθίσματα σχετίζονται με ενζυμικές αντιδράσεις και την αναγνώριση μορίων. Απόκριση σε περισσότερα από ένα ερεθίσματα μπορεί να επιτευχθεί με το συνδυασμό αποκρινόμενων πολυμερών, ενώ μία σημαντική ιδιότητα είναι και η αντιστρεπτότητα των πολυμερών αυτών ως προς την επίδραση του ερεθίσματος. Τα αποκρινόμενα πολυμερή έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές εφαρμογές στη βιολογία και την ιατρική, συμβάλλοντας στη δημιουργία αισθητήρων και βιοαισθητήρων, στην ανάπτυξη φαρμάκων για ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας κ.α.⁶³.



Σχήμα 16. Κατηγορίες των ερεθισμάτων που επηρεάζουν τα αποκρινόμενα πολυμερή⁶⁴

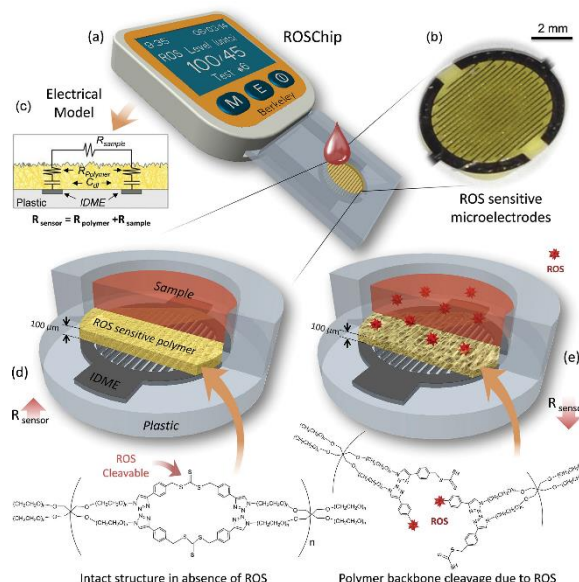
3.2 Εφαρμογές αποκρινόμενων πολυμερών σε (βιο)αισθητήρες

Ένας μεγάλος αριθμός αποκρινόμενων πολυμερών έχει συντεθεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες, τα οποία εμφανίζουν αντιστρεπτή ή μη αντιστρεπτή απόκριση σε χημικά ή φυσικά ερεθίσματα. Τα πολυμερή αυτά μπορεί να έχουν τη μορφή διαλύματος, γέλης, νανοσωματιδίων, μεμβρανών, και στερεή μορφή, όπως σκόνη, κόκκοι κ.λπ.⁶⁵. Οι πιο συνηθισμένες εφαρμογές των αποκρινόμενων πολυμερών είναι στη δημιουργία φαρμάκων με στοχευμένη δράση, καταλυτών και αυτοθεραπευόμενων (self-healing) υλικών, ενώ χρησιμοποιούνται επίσης και για την ανίχνευση, την απεικόνιση και την κατασκευή περιβαλλοντικά προσαρμοζόμενων επιστρώσεων.

Ένα μεγάλο μέρος των αποκρινόμενων πολυμερών που έχουν συντεθεί, χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή βιοαισθητήρων για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων και την ανίχνευση διαφόρων ασθενειών. Ένα παράδειγμα είναι οι εφαρμογές που αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό της γλυκόζης με βιοαισθητήρες βασισμένους σε αποκρινόμενα πολυμερή σε μορφή υδρογέλης, τα οποία υπόκεινται σε μεταβολή φάσης όγκου κατά την απόκριση στο ερέθισμα⁶⁶. Ανάλογα με το πολυμερές που χρησιμοποιείται σε κάθε εφαρμογή, απαιτείται και το αντίστοιχο ερέθισμα για την απόκριση του. Τα αποκρινόμενα στο pH πολυμερή, όπως το

πολυ(ακρυλικό οξύ) έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την οξειδάση της γλυκόζης, η οποία καταλύει την υδρόλυση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ. Η μείωση του pH του διαλύματος λόγω της παραγωγής του γλυκονικού οξέος οδηγεί στη συρρίκνωση του πολυμερούς. Οι μεταβολές στον όγκο των πολυμερών παράγουν διαφορετικά σήματα ανάλογα με τις δραστικές ομάδες τους, όπως αλλαγή στο χρώμα, μεταβολή στην ένταση του φθορισμού ή τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες.

Σε μία άλλη εφαρμογή, οι Aran et al. κατασκεύασαν μία PoC συσκευή για τον προσδιορισμό των δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species) στο αίμα, η οποία βασίζεται σε αισθητήρες τροποποιημένους με υδρογέλη αποκρινόμενου πολυμερούς που περιέχει θειοκαρβαμιδικούς δεσμούς στη δομή του⁶⁷. Το πολυμερές αυτό αποδομείται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου, μειώνοντας την αντίσταση της υδρογέλης πάνω στους αισθητήρες, η οποία αρχικά είναι υψηλή. Το τσιπ που έχει αναπτυχθεί στην εργασία αυτή, το οποίο ονομάζεται ROSChip, χρησιμοποιείται για την ανάλυση των δραστικών μορφών οξυγόνου μέσω της μέτρησης της εμπίδησης στα αλληλοεμπλεκόμενα ηλεκτρόδια που είναι ενσωματωμένα στη συσκευή (Σχήμα 17).



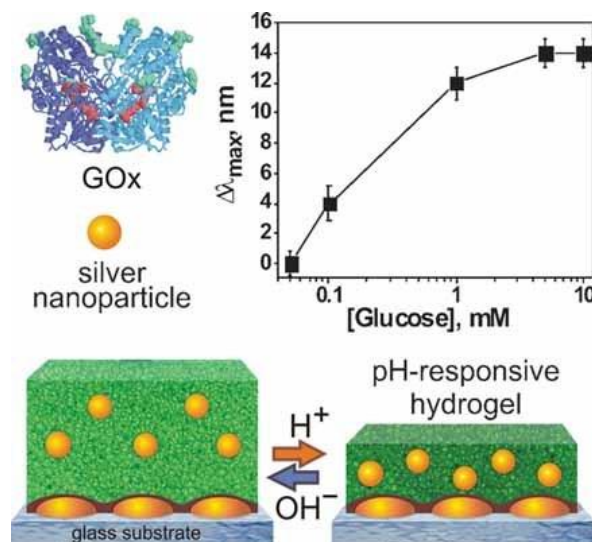
Σχήμα 17. ROSChip: αισθητήρας προσδιορισμού των δραστικών μορφών οξυγόνου, βασισμένος σε αποκρινόμενα πολυμερή⁶⁷.

Μία ακόμη μελέτη η οποία θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε PoC αναλύσεις, πραγματοποιήθηκε από τους Eduardo Antunez et al. για την ανίχνευση μίας θερμοασταθούς εντεροτοξίνης που παράγεται από το *Escherichia coli* (*E. Coli*)⁶⁸. Οι βιοαισθητήρες που κατασκευάστηκαν για το σκοπό αυτό έχουν θερμοαντιστρεπτές ιδιότητες και αποτελούνται από ένα θερμοαποκρινόμενο πολυμερές συζευγμένο με δύο διαφορετικά μόρια αναγνώρισης από το *E. Coli*, τη λακτόζη και τη γαγγλιοσίδη GM1, ένας σύνθετος υδατάνθρακας που εμφανίζεται σε κυτταρικές επιφάνειες θηλαστικών και χρησιμοποιείται από τις τοξίνες για την είσοδο στο κύτταρο. Τα μόρια αυτά είναι ακινητοποιημένα πάνω σε συμβολομετρικούς μεταλλάκτες πορώδους πυριτίου, ενισχυμένο με αμινομάδες. Το υλικό αυτό έχει φωτονικές ιδιότητες, μέσω των οποίων αναγνωρίζεται η πρόσδεση των εντεροτοξινών στα ακινητοποιημένα μόρια. Συγκρίνεται το φάσμα της ακτινοβολίας που προσπίπτει στην επιφάνεια του πυριτίου με αυτό που ανακλάται και οι μεταβολές δίνουν τις πληροφορίες για την πρόσδεση του αναλύτη στους υποδοχείς.

Η ιδιότητα των σωματιδίων χρυσού που είναι καλυμμένα με κιτρικό οξύ να συσσωματώνονται και να επαναδιασπείρονται στο διάλυμα έχει χρησιμοποιηθεί από τους Fatemeh Najafzadeh et al. για τη δημιουργία χρωματομετρικών αισθητήρων⁶⁹. Παρουσία των εξεταζόμενων αναλυτών, κυστεΐνη, αργινίνη και μελαμίνη προκαλείται η δημιουργία συσσωματωμάτων των σωματιδίων χρυσού, τα οποία επαναδιασπείρονται όταν προστίθενται στο διάλυμα μεταλλικά ιόντα, όπως σίδηρος, μόλυβδος, υδράργυρος και άργυρος. Η μεταβολή αυτή επιφέρει και αλλαγές στο χρώμα, οι οποίες θα μπορούσαν να ανιχνευτούν από φορητές συσκευές, όπως το κινητό, για τη δημιουργία PoC συσκευών.

Πολλά αποκρινόμενα υλικά έχουν σχεδιαστεί για την κατασκευή αισθητήρων και βιοαισθητήρων, με τις μεταβολές τους να ανιχνεύονται με την τεχνική του συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (surface plasmon resonance)⁷⁰. Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Ihor Tokarev et al., κατασκευάστηκε μία συσκευή για τον προσδιορισμό της γλυκόζης στο αίμα, που αποτελείται από πλασμονικά νανοσωματίδια αργύρου και ένα φιλμ άλατος αλγινικού οξέος με ζελατίνη⁷¹. Το φιλμ αυτό αποκρίνεται στις μεταβολές του pH, μεταβάλλοντας τον όγκο του. Η ιδιότητα αυτή είναι αντιστρεπτή, προκαλώντας διόγκωση στο φιλμ όταν το pH είναι βασικό και συρρίκνωση όταν το pH είναι όξινο (**Σχήμα 18**). Η μεταβολή στο pH προκαλείται

από την ενζυμική αντίδραση της γλυκόζης με την οξειδάση της γλυκόζης, παράγοντας γλυκονικό οξύ, το οποίο μειώνει το pH του διαλύματος.



Σχήμα 18. Συσσκευή για τον προσδιορισμό της γλυκόζης με αποκρινόμενα στο pH πολυμερή⁷¹.

Μία μεγάλη κατηγορία πολυμερών, αποκρινόμενων σε κάποιο ερέθισμα, έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή εμπεδησιομετρικών αισθητήρων και βιοαισθητήρων. Η Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) μελετά τις μεταβολές που συμβαίνουν στη διεπιφάνεια ενός συστήματος ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη και έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό εργασιών για την παρακολούθηση φαινομένων διάβρωσης επιφανειών⁷². Κατά τη διάβρωση μιας επιφάνειας μπορούν να σχηματιστούν οπές ή κρατήρες με αποτέλεσμα τα ιόντα ενός διαλύματος να διαπερνούν την επιφάνεια αυτή. Ένα υλικό το οποίο βρίσκεται σε επαφή με έναν ηλεκτρονιακό αγωγό (ηλεκτρόδιο) έχει μια συγκεκριμένη τιμή αντίστασης (ή κατά έναν πιο ευρύ όρο, εμπέδησης), η οποία μετά τη διάβρωση του πολυμερούς μεταβάλλεται. Η ιδιότητα των αποκρινόμενων πολυμερών να διογκώνονται και να συρρικνώνονται, να αποδομούνται και να μεταβάλλουν τις επιφανειακές τους ιδιότητες παρουσία ενός

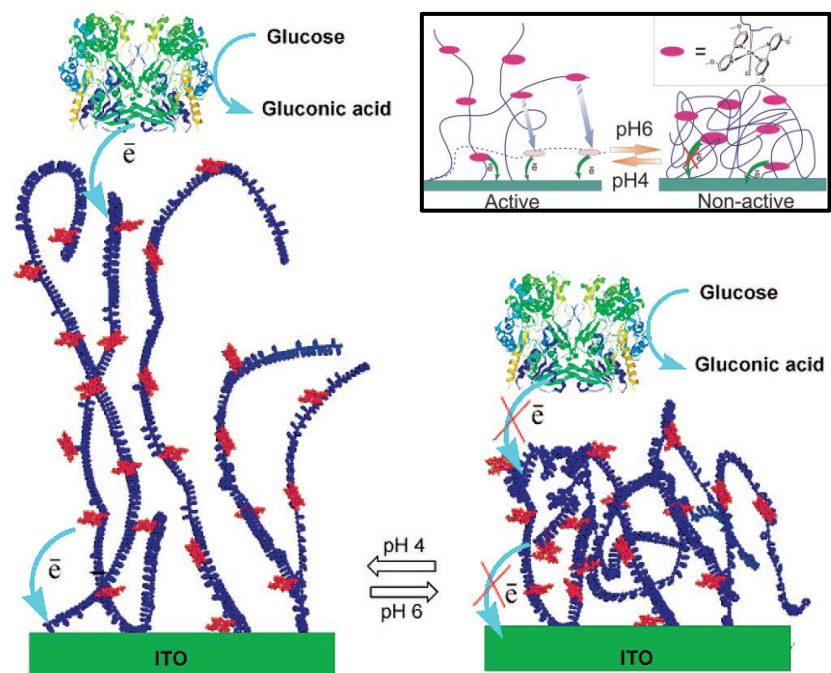
μορίου που αποτελεί χημικό ερέθισμα, μπορεί να μελετηθεί με τη Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης.

Στη μελέτη που πραγματοποίησαν οι A. Sabot και S. Krause, κατασκεύασαν αποκρινόμενους αισθητήρες σε διάφορα ένζυμα και τους μελέτησαν με την τεχνική EIS⁷³. Οι μεταλλάκτες που χρησιμοποίησαν ήταν ηλεκτρόδια χρυσού, πάνω στα οποία εναπόθεσαν τρία διαφορετικά πολυμερή, πολυεστερικό αμίδιο, δεξτράνη και πολυ(τριμεθυλενο)ηλεκτριμίδιο, τα οποία αποδομούνται από τα ένζυμα α-χυμοθρυψίνη, δεξτρανάση και λιπάση, αντίστοιχα. Η αποδόμηση των πολυμερών παρατηρήθηκε με τη μείωση της εμπέδησης στις χαμηλές συχνότητες, ενώ όταν το πολυμερές καταστράφηκε τελείως, η τιμή της χωρητικότητας έγινε ίση με την τιμή της χωρητικότητας της διπλοστιβάδας του μη-τροποποιημένου ηλεκτροδίου.

Μία κατηγορία πολυμερών αποκρινόμενων στις μεταβολές του pH είναι τα συμπολυμερή Eudragit της εταιρείας Röhm Pharma, τα οποία ανάλογα με τα μονομερή από τα οποία αποτελούνται, αποδομούνται σε pH μεγαλύτερο από μία συγκεκριμένη τιμή. Η ομάδα του C. McNeil κατασκεύασε ένα βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό της ουρίας και της ανοσοσφαιρίνης Γ (h-IgG), χρησιμοποιώντας το αποκρινόμενο στο pH συμπολυμερές Eudragit S100⁷⁴. Το συμπολυμερές αυτό αποδομείται σε pH >7 και για να επιτευχθεί αυτή η ενέργεια που επιφέρει μεταβολή στις ηλεκτρικές παραμέτρους του βιοαισθητήρα, ακινητοποιήθηκε πάνω στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου χρυσού το ένζυμο ουρεάση. Μετά την τοποθέτηση του τροποποιημένου ηλεκτροδίου σε διάλυμα που περιείχε ουρία, προκαλείται η αύξηση του pH από την ενζυμικά παραγόμενη αμμωνία η οποία οδηγεί στην αποδόμηση του συμπολυμερούς και στη μεταβολή του φάσματος της εμπέδησης. Για τον προσδιορισμό της IgG ακολουθήθηκε η ίδια αρχή, χρησιμοποιώντας ως ιχνηθέτες δευτερογενή αντισώματα (anti-hIgG) τροποποιημένα με ουρεάση. Η ίδια ομάδα πραγματοποίησε αντίστοιχη μελέτη για τον για τον προσδιορισμό του ειδικού αντιγόνου του προστάτη (PSA) σε ορό αίματος, χρησιμοποιώντας έναν βιοαισθητήρα που έχει επικαλυφθεί με το συμπολυμερές Eudragit® S100 και έχουν ακινητοποιηθεί αντισώματα PSA (anti-PSA)⁷⁵. Τα ακινητοποιημένα αντισώματα δεσμεύουν τον αναλύτη PSA πάνω στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων και εμβαπτίζονται σε διάλυμα που περιέχει σύμπλεγμα αντισωμάτων PSA με το ένζυμο της ουρεάσης. Στη δεύτερη ελεύθερη θέση που έχει ο αναλύτης, δεσμεύεται το σύμπλεγμα PSA/ουρεάση, ενώ

σε περίπτωση απουσίας του αναλύτη από το διάλυμα δεν είναι εφικτή η πρόσδεση του συμπλέγματος με το ένζυμο. Τέλος, ο βιοαισθητήρας αυτός εμβαπτίζεται σε διάλυμα ουρίας και παρουσία της ουρεάσης παράγεται αμμωνία. Η συνεπαγόμενη αύξηση του pH οδηγεί στην αποδόμηση της μεμβράνης Eudragit® S100 και κατά συνέπεια στη μεταβολή της συνολικής χωρητικότητας του βιοαισθητήρα. Ένα άλλο συμπολυμερές που αποκρίνεται στις μεταβολές του pH είναι ο πολυβινυλομεθυλαιθέρας μαζί με μηλεϊνικό ανυδρίτη (poly(methylvinyl ether)/maleic anhydride, EMAC). Το συμπολυμερές αυτό έχει χρησιμοποιηθεί από τους McNeil, C. J. et al. για τον προσδιορισμό της ουρίας και της κρεατινίνης⁷⁴. Η λειτουργία του βιοαισθητήρα βασίζεται στην απόκριση του συμπολυμερούς EMAC σε pH >7,4, ενώ στο pH 7,4 το πολυμερές αυτό παραμένει σταθερό γεγονός που επιτρέπει την εφαρμογή του απευθείας σε δείγματα ορού αίματος. Τα δύο ένζυμα ουρεάση και δεϊμινάση της κρεατινίνης, που παράγουν αμμωνία παρουσία του αντίστοιχου υποστρώματος τους, ακινητοποιούνται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα που έχει τροποποιηθεί με το συμπολυμερές. Η μεταβολή της εμπέδησης στη διεπιφάνεια των τροποποιημένων με το πολυμερές και το ένζυμο ηλεκτροδίων και το δείγμα παρατηρήθηκε με μετρήσεις EIS.

Τέλος, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, οι Tsz Kin Tam et al. κατασκεύασαν έναν αισθητήρα βασιζόμενο στο αποκρινόμενο στο pH πολυμερές πολυ (4-βινυλ) πυριδίνη (P4VP), συνδεδεμένο με ένα σύμπλοκο του ηλεκτρενεργού οσμίου ($\text{Os}(\text{dmo-bpy})_2\text{Cl}_2$) για τον προσδιορισμό της γλυκόζης⁷⁶. Το σύστημα P4VP/ $\text{Os}(\text{dmo-bpy})_2\text{Cl}_2$ προσδέθηκε πάνω σε μία αγώγιμη επιφάνεια οξειδίου ινδίου κασσιτέρου (ITO), σχηματίζοντας δομές πολυμερικής βούρτσας. Στην τιμή pH 4 το οξειδοαναγωγικό πολυμερικό σύστημα παρουσιάζει αντιστρεπτές ηλεκτροχημικές μεταβολές ενώ σε pH >6 το σύστημα δεν ήταν ηλεκτροχημικά ενεργό. Σε όξινα pH όπου πρωτονιώνεται η πυριδίνη, προκαλείται διόγκωση του πολυμερούς επιτρέποντας τη μετατόπιση των αλυσίδων και την πρόσβαση στις ηλεκτρενεργές ομάδες του οσμίου. Αντίθετα, σε βασικά pH, το πολυμερές συσσωματώνεται εγκλωβίζοντας τα ηλεκτρενεργά κέντρα (**Σχήμα 19**). Το σύμπλοκο του οσμίου το οποίο χρησιμοποιείται και ως διαμεσολαβητής μεταφοράς φορτίου μεταξύ των οξειδοαναγωγικών ενζύμων και του αγώγιμου μεταλλάκτη, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της γλυκόζης.



Σχήμα 19. Λειτουργία αισθητήρα αποκρινόμενου στις μεταβολές του pH, για τη διεξαγωγή ηλεκτροχημικών αναλύσεων⁷⁶.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη μιας νέας γενιάς φορητών ιατροδιαγνωστικών αναλυτικών συσκευών, οι οποίες βασίζονται σε καινοτόμους βιοαισθητήρες πολυμερικών μεμβρανών αποκρινόμενων στο pH και μεταλλάκτες χαμηλού κόστους, για τον προσδιορισμό βιοχημικών δεικτών στο σημείο περίθαλψης. Για την επιτυχή ανάπτυξη των παραπάνω ιατροδιαγνωστικών συσκευών, η ερευνητική δραστηριότητα της διατριβής επικεντρώθηκε στα εξής:

- Ανάπτυξη πολυμερικών μεμβρανών αποκρινόμενων στο pH, ομοιόμορφου πάχους και πορώδους, σε διαφορετικά πάχη με μη αυτόματες και αυτόματες διατάξεις (χειροκίνητα ή με μηχανικό επάλειπτρο υγρής στρώσης), από διαλύματα συμπολυμερών σε διάφορους διαλύτες ή μείγματα διαλυτών.
- Σύνθεση συμπολυμερών αποκρινόμενων στο pH με διάφορες αναλογίες μεταξύ των μονομερών και διάφορα μοριακά βάρη, με σκοπό το ελεγχόμενο pH αποδόμησης τους και την αύξηση της ευαισθησίας τους στις μεταβολές του pH.
- Ανάπτυξη μεμβρανών από τα παραπάνω συμπολυμερή σε διάφορους διαλύτες και μείγματα διαλυτών, με σκοπό την παραγωγή βιοαισθητήρων με μηδενική απόκριση στο λευκό δείγμα (τυφλό) και, ανάλογα με το πάχος της μεμβράνης, την προσαρμογή της δυναμικής γραμμικής περιοχής των βιοαισθητήρων στα φυσιολογικά επίπεδα συγκέντρωσης του εκάστοτε βιοχημικού δείκτη.
- Κατασκευή τριών διαφορετικών βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό της ουρίας και της κρεατινίνης σε δείγματα ούρων και του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού σε βιοπτικά δείγματα στομάχου.
- Εκτεταμένες κλινικές μελέτες και μελέτες επικύρωσης της αναλυτικής συμπεριφοράς των βιοαισθητήρων ως προς τις επίσημες μεθόδους αναφοράς που εφαρμόζονται στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων.
- Σχεδιασμός, ανάπτυξη και κατασκευή πολυλειτουργικών διαγνωστικών συσκευών με μικρό φυσικό αποτύπωμα, μικρό βάρος και χαμηλή κατανάλωση ενέργειας σε δύο βασικούς τύπους: α) φορητής συσκευής με αυτόνομη λειτουργία και β) φορητής συσκευής με ασύρματη σύνδεση και υποβοηθούμενη λειτουργία από «έξυπνα» κινητά (smartphones).

2 Ιατροδιαγνωστική συσκευή με βιοαισθητήρες βασισμένους σε μεμβράνες πολυμερών αποκρινόμενων στο pH και μεταλλάκτες χαμηλού κόστους για εφαρμογή σε αναλύσεις πεδίου

2.1 Περίληψη

Η ανάπτυξη ιατροδιαγνωστικών συσκευών για εφαρμογές στο σημείο περίθαλψης (Point-of-Care, PoC) αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη δημιουργία αποκεντρωμένων συστημάτων υγειονομικής περίθαλψης. Ωστόσο, το αυξημένο κόστος και οι πολύπλοκες διεργασίες που απαιτούνται για τη μετατροπή των ήδη υπαρχόντων τεχνολογιών σε συσκευές κατάλληλες για αναλύσεις πεδίου δυσχεραίνουν τη διαδικασία αυτή. Στο κεφάλαιο αυτό, περιγράφεται η ανάπτυξη μιας φορητής ιατροδιαγνωστικής συσκευής, την οποία ονομάζουμε BioPoC (από τα αρχικά των λέξεων Biosensor και Point-of-Care) που βασίζεται σε βιοαισθητήρες αποκρινόμενων πολυμερικών μεμβρανών και χαμηλού κόστους μεταλλάκτες μέτρησης χρόνου και ηλεκτρικής αντίστασης. Οι βιοαισθητήρες κατασκευάστηκαν με ενζυμικά τροποποιημένες μεμβράνες συμπολυμερούς με απόκριση στο pH. Η λειτουργία τους βασίζεται στη μέτρηση του χρόνου που απαιτείται ώστε η αρχικά άπειρη ηλεκτρική αντίσταση μεταξύ δύο αγωγίμων ταινιών που διαχωρίζονται από τη μεμβράνη, να λάβει μια πεπερασμένη τιμή, ως αποτέλεσμα της εκλεκτικής αποδόμησης της μεμβράνης από τον αναλύτη στόχο και την επαγόμενη πλήρωση ενός κάθετου καναλιού από το υγρό δείγμα, με την οποία επιτυγχάνεται η ηλεκτρική επικοινωνία μεταξύ των δύο αγωγίμων ταινιών. Ο χρόνος αυτός είναι ανάλογος της συγκέντρωσης του αναλύτη. Η συσκευή BioPoC χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ουρίας σε μη αραιωμένα ούρα χωρίς να προηγηθεί κάποιο στάδιο προκατεργασίας των δειγμάτων. Με την κατάλληλη επιλογή του πάχους της μεμβράνης και της συγκέντρωσης του πολυμερούς από το οποίο κατασκευάστηκε η μεμβράνη, η λειτουργία της συσκευής προσαρμόστηκε στο εύρος συγκεντρώσεων του αναλύτη στα ούρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν εξαιρετική εκλεκτικότητα στα διάφορα συστατικά της μήτρας του δείγματος και πολύ καλή συσχέτιση με τα αποτελέσματα της πρότυπης μεθόδου αναφοράς.

2.2 Εισαγωγή

Η ανάπτυξη νέας γενιάς καινοτόμων ιατροδιαγνωστικών συσκευών με δυνατότητα να παρέχουν αξιόπιστες κλινικές μετρήσεις σε χώρους εκτός του εργαστηρίου, οι οποίες θα διεξάγονται τόσο από το ιατρικό προσωπικό όσο και από μη εξειδικευμένους χρήστες ή ακόμη και από τους ίδιους τους ασθενείς, αποτελεί βασική ανάγκη για την ενίσχυση των υγειονομικών παροχών παγκοσμίως και θέτει τα θεμέλια για τη λειτουργία σύγχρονων στρατηγικών υγειονομικής περίθαλψης, όπως το «eHealth» και το «mHealth»⁷⁷⁻⁷⁹.

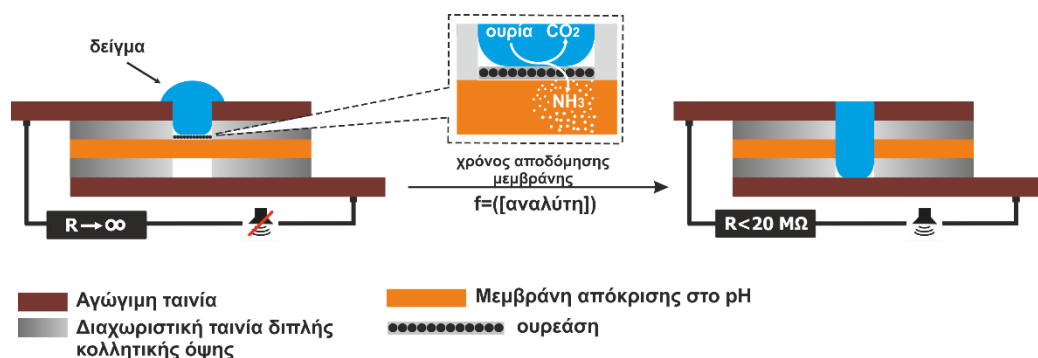
Οι μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη τεχνολογιών με αξιοσημείωτες δυνατότητες για αναλύσεις στο σημείο περίθαλψης. Η ανάπτυξη φορέσιμων (wearable) ιατροδιαγνωστικών συσκευών^{61,80-85}, αισθητήρων βασισμένων σε χαρτί (paper-based devices)^{81,82,86-88}, συσκευών που ενσωματώνουν την τεχνολογία του εργαστηρίου σε ένα απλό τσιπ (lab-on-a-chip)^{82,89-93}, ενεργειακά αυτοτροφοδοτούμενων βιοαισθητήρων⁹⁴⁻⁹⁶ ή τροφοδοτούμενων από «έξυπνα» κινητά⁹⁷, φορητών συστημάτων φασματοσκοπίας Raman για ανοσοχημικές μελέτες (SERS-immunoreaders)⁹⁸ και συσκευών μαγνητοαντίστασης (magnetoresistive)⁹⁹, αποτελεί χωρίς αμφιβολία σημαντική πρόοδο προς την κατεύθυνση πραγματοποίησης PoC αναλύσεων. Ωστόσο, το υψηλό κόστος αυτών των συσκευών, η δυσκολία μετατροπής των μεταλλακτών σε διαστάσεις μικροκλίμακας, η πολύπλοκη διαδικασία ανάπτυξης των τελικών αισθητήρων, οι χρονοβόρες μέθοδοι τροποποίησης της επιφάνειάς τους, οι οποίες πολλές φορές απαιτούν αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες και αντιδραστήρια υψηλού κόστους, και τέλος η ανάγκη προκατεργασίας των δειγμάτων πριν την ανάλυση, αποτελούν σημαντικά προβλήματα στην εφαρμογή τους σε πραγματικές συνθήκες^{31,79,100}. Η επιτυχής εφαρμογή αναλυτικών συσκευών σε αναλύσεις πεδίου προϋποθέτει μια σειρά τεχνικών και αναλυτικών προδιαγραφών, που έχει θεσπίσει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ), τα οποία από τα αρχικά των λέξεων affordable, sensitivity, specificity, user-friendly, rapid and robust, equipment-free, deliverable, είναι γνωστά με το ακρωνύμιο ASSURED¹⁰¹.

Στη μελέτη αυτή, αναπτύχθηκε μία πρωτότυπη ιατροδιαγνωστική συσκευή, η οποία πληροί σε σημαντικό βαθμό όλες τις προδιαγραφές του ΠΟΥ και προσφέρει τα

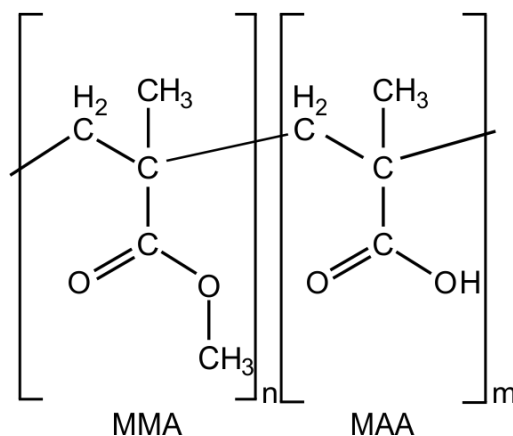
πλεονεκτήματα των PoC συσκευών. Στο εξής θα αναφέρεται ως συσκευή BioPoC. Η συσκευή αποτελείται από έναν αποσπώμενο βιοαισθητήρα μιας χρήσης, ο οποίος με την καινοτομία της κατασκευής του, προσφέρει εγγενή εκλεκτικότητα ως προς τον αναλύτη-στόχο ακόμη και σε πολύπλοκες μήτρες, ενώ η λειτουργία του μπορεί να ρυθμιστεί στο απαιτούμενο εύρος συγκεντρώσεων, το οποίο προκύπτει από το φυσιολογικό εύρος συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα. Η λειτουργία της συσκευής είναι εξαιρετικά απλή. Η ανάλυση του δείγματος πραγματοποιείται σε ένα μόνο στάδιο, με την προσθήκη μιας σταγόνας δείγματος, χωρίς να προηγείται καμία προκατεργασία αυτού, γεγονός που καθιστά τον προσδιορισμό του αναλύτη ιδιαίτερα εύκολο. Ως εκ τούτου, η χρήση της συσκευής και η πραγματοποίηση της ανάλυσης μπορεί να γίνει από τον ίδιο το χρήστη χωρίς να απαιτείται βοήθεια από εξειδικευμένο προσωπικό. Το βασικό στοιχείο της συσκευής BioPoC είναι ο βιοαισθητήρας, ο οποίος περιλαμβάνει δυο αγωγίμες ταινίες που διαχωρίζονται από μία πολυμερική μεμβράνη αποκρινόμενη στο pH και δύο κολλητικές ταινίες διπλής όψης, οι οποίες χρησιμοποιούνται τόσο για την συγκρότηση της κατασκευής από τα επιμέρους τμήματα της όσο και ως διαχωριστικά μεταξύ των αγωγίμων ταινιών και της πολυμερικής μεμβράνης, με σκοπό την προστασίας της μεμβράνης από μηχανική καταπόνηση. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1**, για την κατασκευή του βιοαισθητήρα χρησιμοποιούνται διάφορες ταινίες, κάποιες εκ των οποίων φέρουν μια κυκλική οπή, ώστε τοποθετούμενες η μια πάνω στην άλλη και με κατάλληλη ευθυγράμμιση να σχηματίζουν ένα κάθετο κανάλι μικροροής, το οποίο διακόπτεται από την πολυμερική μεμβράνη, σχηματίζοντας στο επάνω μέρος το χώρο (μικροφρεάτιο) που τοποθετείται το δείγμα. Η λειτουργία της συσκευής BioPoC βασίζεται στη μέτρηση του χρόνου που απαιτείται ώστε η αρχικά άπειρη ηλεκτρική αντίσταση ($R \rightarrow \infty$) μεταξύ των δύο αγωγίμων ταινιών, λάβει μία πεπερασμένη τιμή (τυπικά $R < 20 \text{ MOhm}$), ως αποτέλεσμα της εκλεκτικής αποδόμησης της αποκρινόμενης πολυμερικής μεμβράνης από τον αναλύτη στόχο και την επακόλουθη κάθετη ροή του υγρού δείγματος, εγκαθιστώντας την ηλεκτρική επικοινωνία μεταξύ των δύο αγωγίμων ταινιών μέσω ιοντικής αγωγιμότητας. Ο χρόνος αυτός είναι ανάλογος της συγκέντρωσης του αναλύτη, ενώ η εκλεκτικότητα εξασφαλίζεται από το ένζυμο που ακινητοποιείται στην επιφάνεια της μεμβράνης.

Η ανάπτυξη βιοαισθητήρων, η λειτουργία των οποίων βασίζεται στην αποδόμηση κάποιου πολυμερούς, είχε προταθεί αρχικά για την ανάπτυξη εμπεδισιομετρικών βιοαισθητήρων¹⁰². Η λειτουργία αυτού του τύπου βιοαισθητήρων βασίζεται στην καταγραφή των αλλαγών στις ηλεκτρικές ιδιότητες των τροποποιημένων με το αποκρινόμενο πολυμερές ηλεκτροδίων με την πάροδο του χρόνου, απόρροια των μεταβολών που συμβαίνουν στη διεπιφάνεια μεταξύ του ηλεκτροδίου και του ηλεκτρολύτη, λόγω της αλληλεπίδρασης του αποκρινόμενου πολυμερούς με το χημικό ερέθισμα. Ουσιαστικά, το μετρούμενο σήμα σε αυτούς του βιοαισθητήρες είναι η εμπέδηση στη διεπιφάνεια του τροποποιημένου ηλεκτροδίου με τον ηλεκτρολύτη και αφορά στις μεταβολές της αντίστασης πόλωσης του ηλεκτροδίου/πολυμερούς και της χωρητικότητας της πολυμερικής επικάλυψης σε συχνότητες μερικών kHz¹⁰³. Ως εκ τούτου, η λειτουργία των παραπάνω βιοαισθητήρων δεν πληροί τα κριτήρια ASSURED για PoC εφαρμογές, καθώς το κόστος και το μέγεθος του εξοπλισμού που χρειάζεται είναι αυξημένα, απαιτείται μεγάλος χρόνος μέχρι τη σταθεροποίηση των σημάτων των ηλεκτροδίων και μεγάλος όγκος ηλεκτρολύτη.

Η προτεινόμενη τεχνολογία BioP^oC βασίζεται σε μία «ελεύθερη» (free-standing) μεμβράνη, η οποία δηλαδή μπορεί να σταθεί χωρίς υποστήριξη από κάποιο υπόστρωμα, του συμπολυμερούς Eudragit® S100, ενός αποκρινόμενου στο pH υλικού, το οποίο αποδομείται σε pH >7. Το Eudragit® S100 είναι ένα τυχαίο συμπολυμερές και αποτελείται από τα, τυχαία κατανεμημένα, μονομερή μεθακρυλικό οξύ (MAA) και μεθακρυλικό μεθυλεστέρα (MMA) με αναλογία μεταξύ ελεύθερων καρβοξυλομάδων και εστερομάδων 1:2. Η δομή του Eudragit® S100 παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2**. Ο βιοαισθητήρας που κατασκευάστηκε χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση μη επεξεργασμένων δειγμάτων ούρων, άμεσα, με την προσθήκη μίας σταγόνας δείγματος. Για τη συγκεκριμένη εφαρμογή, η αποκρινόμενη στο pH πολυμερική μεμβράνη τροποποιήθηκε με το ένζυμο ουρεάση, το οποίο καταλύει την υδρόλυση της ουρίας σε αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα με συνέπεια την αύξηση του pH του δείγματος και την αποδόμηση της μεμβράνης.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση και αρχή λειτουργίας της συσκευής BioPoC.



Σχήμα 2. Η δομή του τυχαίου συμπολυμερούς Eudragit® S100. MAA, μεθακρυλικό οξύ και MMA, μεθακρυλικός μεθυλεστέρας, $m/n \approx 0.5$.

2.3 Πειραματικό μέρος

2.3.1 Αντιδραστήρια

Η ουρεάση από το φυτό *Canavalia ensiformis* (EC 3.5.1.5), τύπος IX, 89.890 units/g, η ουρία και το διένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Το Eudragit® S100 (MB 125.000 g/mol, περιέχει 0,3% w/w λαουρυλο-θειικό νάτριο (sodium lauryl sulfate, SLS) παραχωρήθηκε δωρεάν από την εταιρεία Evonik Nutrition & Care GmbH (Darmstadt, Germany). Η ισοπροπανόλη (isopropanol, IPA) και η αμμωνία (διάλυμα NH_4OH 25%

w/w) αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck. Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε δις αποσταγμένο ύδωρ (double distilled water, DDW). Τα διαλύματα ουρίας παρασκευάστηκαν με αραιώση από πυκνό διάλυμα 8 M σε DDW και διατηρήθηκαν στους 4 °C για μία εβδομάδα.

2.3.2 Κατασκευή των αποκρινόμενων στο pH μεμβρανών

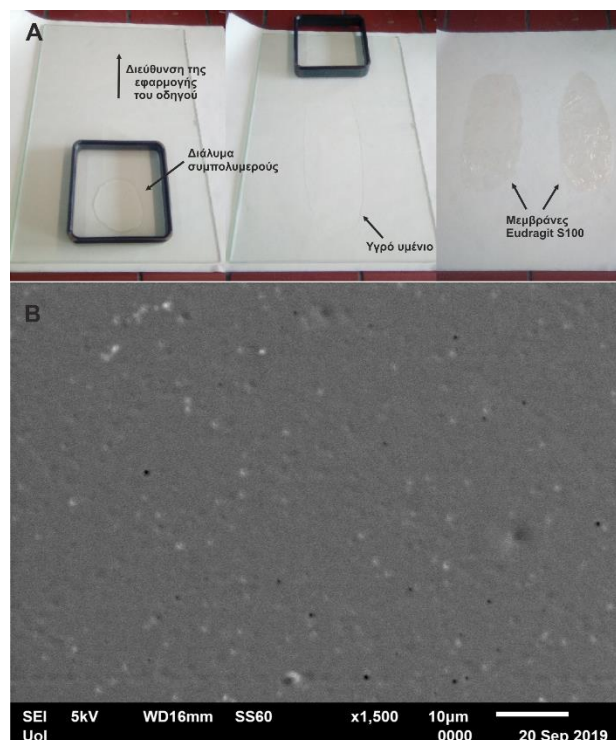
Τα διαλύματα του Eudragit® S100 παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 2-15% w/v σε διαλύτη ισοπροπανόλη/δις αποσταγμένο ύδωρ (IPA/DDW) σε αναλογία 97/3 v/v. Για την παρασκευή των διαλυμάτων, κατάλληλη ποσότητα του στερεού συμπολυμερούς προστέθηκε αργά στο διαλύτη και παρέμεινε υπό ισχυρή ανάδευση για 48 ώρες ώστε να διαλυθεί πλήρως το συμπολυμερές. Η προσθήκη του στερεού συμπολυμερούς γίνεται πολύ αργά και σταδιακά προς αποφυγή συσσωματωμάτων. Το διάλυμα που προκύπτει είναι διαυγές σε μικρές συγκεντρώσεις συμπολυμερούς, ενώ σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 10% w/v εμφανίζει θόλωμα. Πριν την κατασκευή της μεμβράνης το διάλυμα του συμπολυμερούς απαερώθηκε υπό συνθήκες κενού και αποθηκεύτηκε σε αεροστεγές δοχείο σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C.

Για την κατασκευή της μεμβράνης χρησιμοποιήθηκε οδηγός μορφοποίησης μεμβρανών (wet film applicator, URAI, Italy), ο οποίος αποτελείται από 8 διαφορετικές πλευρές, η κάθε μία από τις οποίες φέρει διαφορετικό ύψος εγκοπής (1-8 mil), έχει πλάτος 5 in και μπορεί να σχηματίσει υγρό υμένιο προκαθορισμένου πάχους. Σχηματική αναπαράσταση του οδηγού μορφοποίησης μεμβρανών και της λειτουργίας του παρουσιάζονται στο **Σχήμα 3**. Η κατασκευή των μεμβρανών πραγματοποιήθηκε απλώνοντας, χειροκίνητα, 2 mL των παραπάνω διαλυμάτων, με τον οδηγό μορφοποίησης μεμβρανών, σε μία λεία, καθαρή και στεγνή γυάλινη επιφάνεια, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 4Α**. Τα υγρά υμένια παρέμειναν να στεγνώσουν σε κλειστό θάλαμο χαμηλής σχετικής υγρασίας (%RH<40) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (περίπου 22 °C) για 24 ώρες, μέχρι την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη και το σχηματισμό διαφανούς μεμβράνης. Η μεμβράνη αποκολλήθηκε από τη γυάλινη επιφάνεια σε λουτρό DDW και παραλήφθηκε με φύλλο Teflon. Πριν τη χρήση της παρέμεινε να στεγνώσει σε ξηραντήρα για τουλάχιστον τρεις μέρες. Από κάθε

μεμβράνη που κατασκευάστηκε, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των βιοαισθητήρων η κεντρική επιφάνειά της, περίπου $4 \times 11 \text{ cm}^2$. Το πάχος των μεμβρανών μετρήθηκε με ένα ψηφιακό παχύμετρο (Tesa, Germany) σε είκοσι διαφορετικά σημεία σε όλη την επιφάνεια της επιλεγμένης μεμβράνης. Στο **Σχήμα 4B**, φαίνεται η φωτογραφία της μεμβράνης με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM).



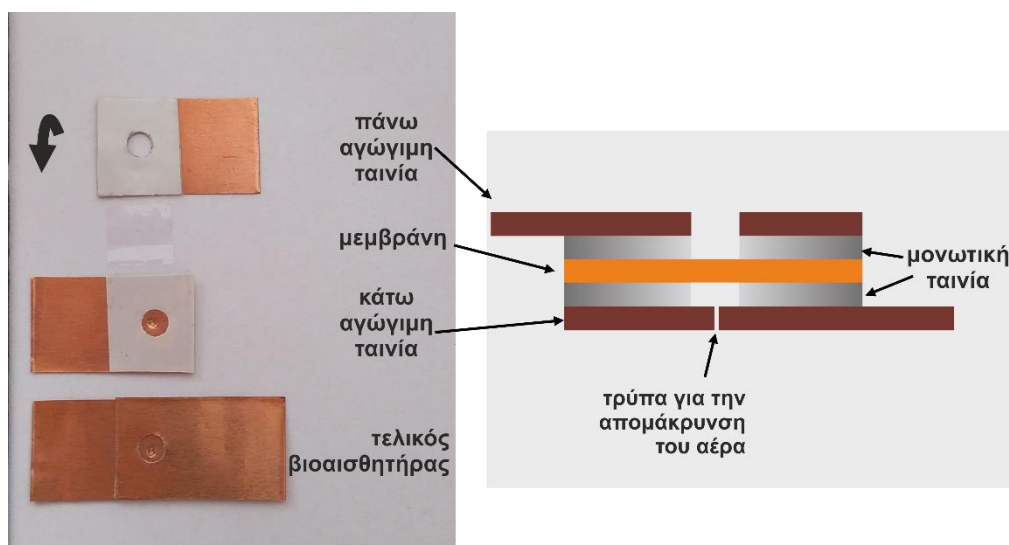
Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση του οδηγού μορφοποίησης μεμβρανών (αριστερά) και της λειτουργίας του (δεξιά).



Σχήμα 4. (Α) Διαδικασία παρασκευής πολυμερικών μεμβρανών με την εφαρμογή οδηγού μορφοποίησης μεμβρανών και (Β) φωτογραφία της μεμβράνης με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.

2.3.3 Κατασκευή του βιοαισθητήρα BioP^oC

Για την κατασκευή του βιοαισθητήρα, η μεμβράνη Eudragit[®] S100 τοποθετήθηκε μεταξύ δύο αγωγίμων ταινιών χαλκού (φύλλα χαλκού 2,0 × 1,2 cm², 50 μm πάχος, Colombos and Co., Greece), οι οποίες αρχικά είχαν καλυφθεί με ταινίες διπλής κολλητικής όψης, μορφοποιημένες με διακορευτή διαμέτρου 3 mm. Η κολλητική ταινία λειτουργεί ως διαχωριστικό για την αποφυγή της άμεσης επαφής των αγωγίμων ταινιών με τη μεμβράνη πολυμερούς αλλά και την αποφυγή επαφής μεταξύ τους. Στην κάτω ταινία χαλκού δημιουργήθηκε μία οπή με μία καρφίτσα, η οποία αποτρέπει το σχηματισμό φυσαλίδων στο κανάλι που δημιουργείται κάτω από τη μεμβράνη και παρεμποδίζει την κάθετη ροή του δείγματος μέσα στο κανάλι. Τα διαφορετικά στοιχεία του βιοαισθητήρα και η τελική μορφή του παρουσιάζονται στο **Σχήμα 5**.

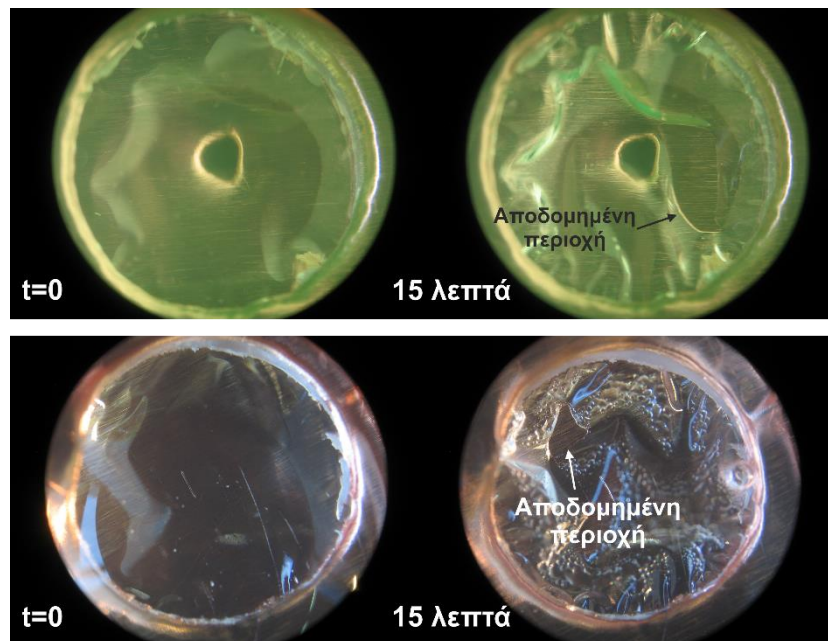


Σχήμα 5. (Αριστερά) Επιμέρους τμήματα και τελική μορφή του βιοαισθητήρα και (Δεξιά) σχηματική απεικόνιση του βιοαισθητήρα.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5**, στην κάτω αγωγίμη ταινία χαλκού δημιουργήθηκε μία μικρή οπή με μία καρφίτσα. Χωρίς την οπή, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός φυσαλίδων, ο οποίος, πιθανώς, να οφείλεται στη διαπερατότητα της μεμβράνης από

αέρια που είναι διαλυμένα στα εξεταζόμενα δείγματα που δοκιμάστηκαν, όπως το διάλυμα της NH_3 και το νερό. Η παρατήρηση του φαινομένου αυτού φαίνεται στο **Σχήμα 6** και πραγματοποιήθηκε με το στερεοσκόπιο S8 APO stereoscope, Leika. Όπως φαίνεται στις φωτογραφίες, κατά την αποδόμηση της μεμβράνης σχηματίζονται φυσαλίδες οι οποίες, ενώ η μεμβράνη έχει σπάσει, εμποδίζουν την κάθετη πτώση του υγρού δείγματος. Αυτό το πρόβλημα στην κάθετη ροή του δείγματος ξεπεράστηκε με τη μικρή οπή στην κάτω αγωγίμη ταινία, μέσα από την οποία απομακρύνεται ο εγκλωβισμένος αέρας ο οποίος εμποδίζει την πτωτική ροή του δείγματος κατά την αποδόμηση του συμπολυμερούς.

Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ουρίας, τροποποιήθηκε με 2 μL (3 Units) διαλύματος ουρεάσης σε 30 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer, PB) pH 7, και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες να στεγνώσει.



Σχήμα 6. Παρατήρηση της αποδόμησης της μεμβράνης (κατασκευασμένη από διάλυμα 4% w/v Eudragit® S100 σε IPA/DDW 97/3 v/v, πάχους $4,5 \pm 0,3$) σε κατασκευή με οπή (επάνω) ή χωρίς οπή (κάτω) στην κάτω αγωγίμη ταινία χαλκού. Το διάλυμα που προστέθηκε και στις δύο περιπτώσεις είναι 15 mM NH_3 .

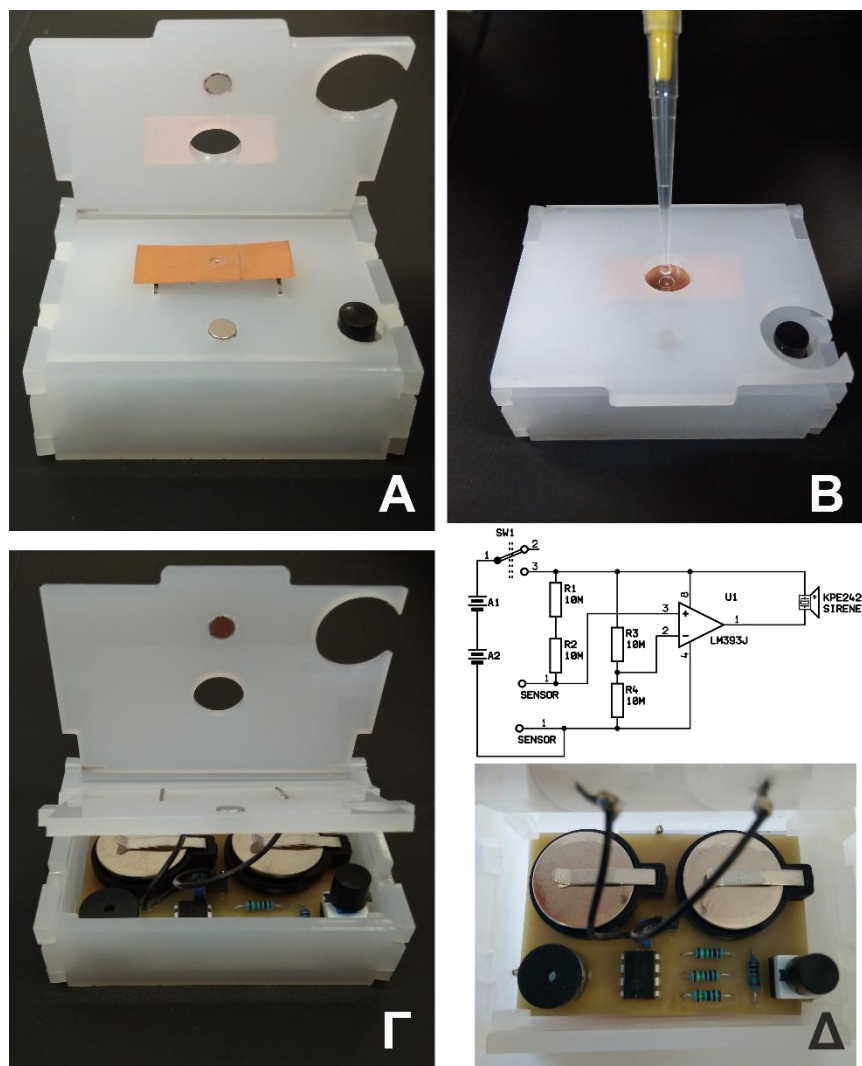
2.3.4 Κατασκευή της πρωτότυπης συσκευής BioP_{OC}

Η συσκευή BioP_{OC} παρουσιάζεται στο **Σχήμα 7**. Περιλαμβάνει δύο μεταλλικές επαφές στο επάνω μέρος της, μέσω των οποίων πραγματοποιείται η σύνδεση του βιοαισθητήρα. Κάθε επαφή επικοινωνεί με μία αγώγιμη ταινία κατά την τοποθέτηση του βιοαισθητήρα στη συσκευή, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 7Α**. Ο βιοαισθητήρας συγκρατείται στη θέση του με ένα καπάκι που ασφαλίζει στη συσκευή μέσω δύο μαγνητών νεοδυμίου και φέρει ένα άνοιγμα στο επάνω μέρος που επιτρέπει την προσθήκη του δείγματος όταν είναι κλειστό, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 7Β**. Η συσκευή περιλαμβάνει ένα ηλεκτρονικό κύκλωμα το οποίο παράγει ένα ηχητικό σήμα όταν η αντίσταση μεταξύ των δύο μεταλλικών επαφών είναι μικρότερη από 20 MΩm. Η συσκευή τροφοδοτείται από δύο μπαταρίες λιθίου (3 V, CR2032), συνδεδεμένες σε σειρά. Η ηλεκτρονική διάταξη και οι μπαταρίες είναι τοποθετημένες στο κάτω μέρος της συσκευής (**Σχήμα 7Γ**). Όπως φαίνεται στο σχηματικό διάγραμμα (**Σχήμα 7Δ**), στο κύκλωμα περιλαμβάνεται ένας διαιρέτης τάσης που φέρει αντίσταση 20 MΩm (αποτελείται από δύο αντιστάσεις των 10 MΩm, συνδεδεμένες σε σειρά) και ο βιοαισθητήρας συνδέεται μεταξύ της γείωσης και του ακροδέκτη μη αναστροφής του συγκριτή. Το σήμα εξόδου του συγκριτή μετατρέπεται σε ακουστικό μέσω του πιεζοηλεκτρικού βομβητή αυτόματης οδήγησης, που ενεργοποιείται όταν η αντίσταση του βιοαισθητήρα BioP_{OC} μειωθεί κάτω από 20 MΩm.

2.3.5 Προσδιορισμός της ουρίας σε δείγματα ούρων

Για τον προσδιορισμό της ουρίας ο βιοαισθητήρας τοποθετήθηκε στη συσκευή BioP_{OC} και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν προσθέτοντας στο κανάλι 30 μL προτύπου διαλύματος ουρίας σε 30 mM PB, pH 6,5 ή 30 μL δείγματος ούρων, και κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τέσσερις φορές, χρησιμοποιώντας νέο βιοαισθητήρα κάθε φορά. Για την εφαρμογή αυτή, ο βιοαισθητήρας κατασκευάστηκε με ένα σετ δύο μεμβρανών Eudragit® S100 συνολικού πάχους $32,7 \pm 3,8 \mu\text{m}$, κατασκευασμένων από διάλυμα συγκέντρωσης 15% w/v σε IPA/DDW 97/3 v/v. Η μεμβράνη τροποποιήθηκε προσθέτοντας 3 U ουρεάση στο επάνω μέρος της. Σε κάθε ανάλυση, ο χρόνος (σε δευτερόλεπτα) που απαιτείται από τη στιγμή της τοποθέτησης του

δείγματος μέχρι να ακουστεί το ηχητικό σήμα μετρήθηκε με χρονόμετρο, το οποίο ενεργοποιείται και απενεργοποιείται από τον χρήστη. Τα δείγματα ούρων που εξετάστηκαν ήταν αποτέλεσμα ανάμειξης διαφορετικών δειγμάτων που λήφθηκαν από υγιείς εθελοντές, σύμφωνα με τον κώδικα ηθικής και δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα αποτελέσματα του βιοαισθητήρα BioP_{OC} συγκρίθηκαν με αυτά που λήφθηκαν με τη μέθοδο αναφοράς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Urease-GLDH Kinetic method kit, Kekis S.A., Greece).



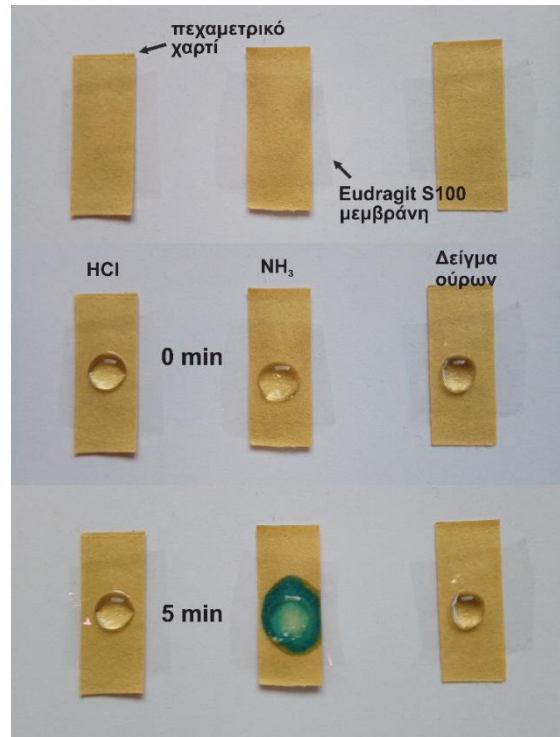
Σχήμα 7. Η πρωτότυπη συσκευή BioP_{OC}.

2.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

2.4.1 Αρχή λειτουργίας του βιοαισθητήρα και η συνθήκη «μηδενικής απόκρισης τυφλού δείγματος»

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1**, το κάθετο κανάλι που σχηματίζεται στο βιοαισθητήρα, χωρίζεται σε δύο μέρη από τη μεμβράνη Eudragit® S100, η οποία αφενός, σχηματίζει το χώρο στον οποίο τοποθετείται το δείγμα και αφετέρου, συγκρατεί αυτό όταν προστίθεται στη συσκευή, αποτρέποντας την ιοντική ηλεκτρική επικοινωνία μεταξύ των δύο αγώγιμων ταινιών. Ως αποτέλεσμα, η ηλεκτρική αντίσταση μεταξύ των δύο μη συνδεδεμένων αγώγιμων ταινιών είναι αρχικά άπειρη. Η ηλεκτρική αντίσταση μεταξύ των δύο αγώγιμων ταινιών γίνεται πεπερασμένη μόνο όταν το δείγμα κινηθεί στο κάθετο κανάλι ροής, το οποίο, ως ιοντικός αγωγός, αποκαθιστά την ηλεκτρική σύνδεση μεταξύ των δύο αγώγιμων ταινιών χαλκού. Ως πεπερασμένη τιμή αντίστασης για τη συσκευή αυτή ορίζεται, μετά από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με ένα κοινό πολύμετρο, οποιαδήποτε τιμή μικρότερη από 20 MOhm.

Για τη σωστή λειτουργία του βιοαισθητήρα, απαραίτητη προϋπόθεση είναι το δείγμα να μη διαπερνά τη μη τροποποιημένη με ένζυμο πολυμερική μεμβράνη, και όποιο σήμα παράγεται, να οφείλεται αποκλειστικά στην εκλεκτική αποδόμηση της τροποποιημένης με ένζυμο μεμβράνης από τον αναλύτη στόχο. Για την εξέταση αυτής της προϋπόθεσης, μελετήθηκε η διαπερατότητα μιας μεμβράνης Eudragit® S100 από διαλύματα με διαφορετικά pH. Τρία κομμάτια μεμβράνης Eudragit® S100 πάχους $4,5 \pm 0,3$ μm τοποθετήθηκαν πάνω σε πεχαμετρικό χαρτί και η συμπεριφορά τους μετά την προσθήκη περίπου 50 μL 15 mM HCl, 15 mM NH₃ και μη αραιωμένων ούρων με pH 6,5, παρακολουθήθηκε για 30 λεπτά. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 8**, η συγκεκριμένη μεμβράνη Eudragit® S100 αποτρέπει την άμεση επαφή των διαλυμάτων με το πεχαμετρικό χαρτί. Τα διαλύματα δε διαπερνούν τη μεμβράνη, παρά μόνο όταν αυτή αποδομηθεί σε αλκαλικές συνθήκες, από το διάλυμα της NH₃, όπως φαίνεται στη μεσαία περίπτωση της εικόνας αυτής, όπου το πεχαμετρικό χαρτί χρωματίζεται πράσινο-μπλε λόγω του βασικού pH. Τα διαλύματα με pH <7 παραμένουν στην επιφάνεια της μεμβράνης χωρίς να τη διαπεράσουν.



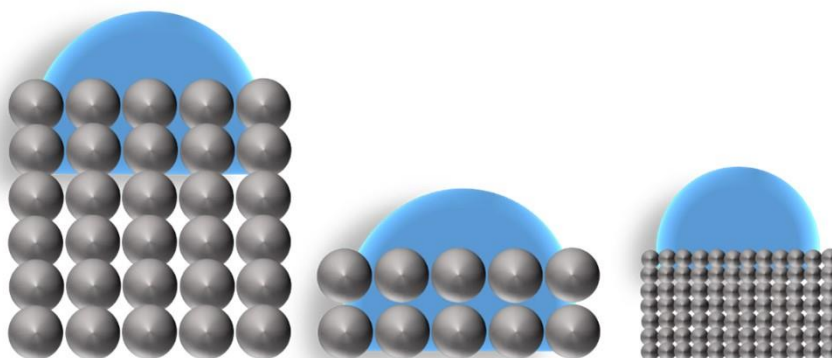
Σχήμα 8. Αντίσταση στην κάθετη ροή διαφόρων διαλυμάτων διαμέσου της μεμβράνης Eudragit® S100 και η αποδόμησή της σε αλκαλικά διαλύματα.

Η αντίσταση στην κάθετη ροή R_{vf} (s) για ένα δεδομένο σύστημα μεμβράνης-ρευστού, είναι ανάλογη του πάχους της μεμβράνης d (m) και αντιστρόφως ανάλογη της υδραυλικής αγωγιμότητας K (m/s) του ρευστού, η οποία αναφέρεται στην ευκολία ενός υγρού να κινείται μέσα από τους πόρους μίας μεμβράνης. Η υδραυλική αγωγιμότητα (K) συνδέεται με τη διαπερατότητα της μεμβράνης (k) με τη σχέση $k=K \times (\mu/\rho g)$, η οποία υποδηλώνει την εξάρτηση της αντίστασης R_{vf} από το ιξώδες (μ) και την πυκνότητα (ρ) του υγρού, ή με άλλα λόγια, από τη σύσταση του ρευστού, και τις ιδιότητες της μεμβράνης, όπως το πορώδες και την υδροφιλικότητα, μαζί με την επιτάχυνση της βαρύτητας (g).

Κατά συνέπεια, η αντίσταση R_{vf} εξαρτάται, κυρίως, από το πάχος της μεμβράνης, τη συγκέντρωση του πολυμερούς στο διάλυμα, το μοριακό βάρος του πολυμερούς, το οποίο επηρεάζει το πορώδες που θα σχηματιστεί στη μεμβράνη (όσο μικρότερο το μοριακό βάρος τόσο μικρότερο και το πορώδες) και το διαλύτη (**Σχήμα 9**).

Με αυτά τα δεδομένα, ορίζουμε ως **μηδενική απόκριση τυφλού δείγματος (zero blank response, ZBR)** το χρονικό διάστημα στο οποίο ένα συγκεκριμένο σύστημα υγρού δείγματος-μεμβράνης έχει άπειρη αντίσταση R_{vf} . Πρακτικά, η εκπλήρωση της συνθήκης ZBR, όπου το R_{vf} είναι άπειρο, σημαίνει ότι για ένα δεδομένο σύστημα δείγματος-μεμβράνης, η μήτρα του δείγματος δεν παράγει κανένα σήμα ή διαφορετικά, η παρεμποδιστική δράση των συστατικών του δείγματος είναι μηδενική. Αυτό φαίνεται στην περίπτωση του δείγματος ούρων στο **Σχήμα 8**, όπου για το συγκεκριμένο σύστημα μεμβράνης-δείγματος και για το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ικανοποιείται η συνθήκη ZBR.

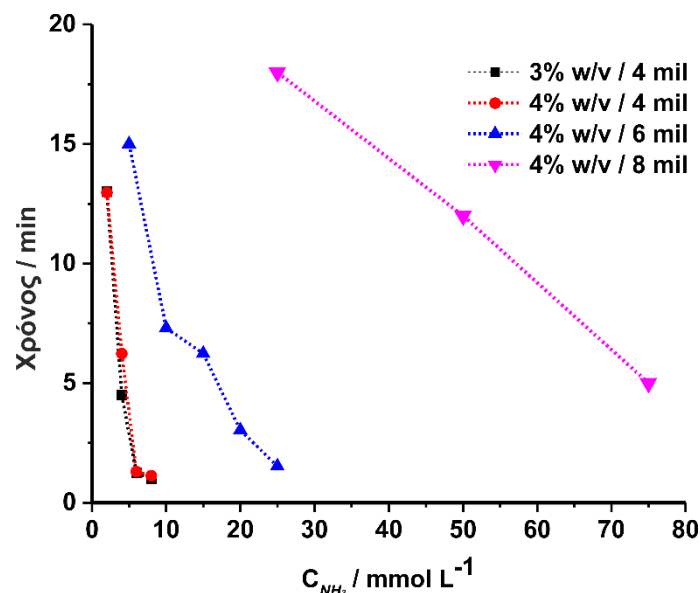
Θεσπίζοντας το μέγιστο χρόνο απόκρισης του βιοαισθητήρα BioP^oC στα 30 λεπτά, σύμφωνα με τα κριτήρια ASSURED, θεωρούμε ότι η συνθήκη ZBR ικανοποιείται εάν στις μη τροποποιημένες μεμβράνες (χωρίς ένζυμο) τα πρότυπα διαλύματα ή τα δείγματα δεν παράγουν σήμα για 60 λεπτά.



Σχήμα 9. Σχηματική απεικόνιση της επίδραση του πάχους της μεμβράνης και του πορώδους στην αντίσταση στην κάθετη ροή R_{vf} .

Θα μπορούσε να ερμηνευθεί λανθασμένα ότι η επιλογή μιας μεμβράνης μεγάλου πάχους και πυκνότητας, η οποία σύμφωνα με την προαναφερθείσα συζήτηση θα ικανοποιούσε απόλυτα τη συνθήκη ZBR, αντιπροσωπεύει την καλύτερη επιλογή για όλες τις αναλυτικές εφαρμογές. Ωστόσο, προκαταρκτικά πειράματα, τα οποία διεξήχθησαν με πρότυπα διαλύματα αμμωνίας και μεμβράνες Eudragit[®] S100 διαφορετικού πάχους που παρασκευάστηκαν από διαλύματα συγκέντρωσης

πολυμερούς 3 και 4% w/v, έδειξαν ότι το όριο ανίχνευσης, ο χρόνος και το εύρος ανίχνευσης του βιοαισθητήρα εξαρτώνται κυρίως από το πάχος της μεμβράνης του πολυμερούς και, σε μικρότερο βαθμό, από τη συγκέντρωση του πολυμερούς (**Σχήμα 10**). Συνεπώς, μία μεμβράνη μεγάλου πάχους και πυκνότητας, με την οποία διασφαλίζεται η συνθήκη ZBR, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό βιοδεικτών που βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα βιολογικά δείγματα. Αντίθετα, για τον προσδιορισμό αναλυτών που υπάρχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα βιολογικά δείγματα, ενδείκνυται η χρήση μιας λεπτής και λιγότερο πυκνής μεμβράνης, η οποία πριν τη χρήση της πρέπει να ελεγχθεί εάν πληροί τη συνθήκη ZBR.



Σχήμα 10. Απόκριση των μεμβρανών Eudragit® S100 σε πρότυπα υδατικά διαλύματα αμμωνίας.

Η αντίσταση στην κάθετη ροή για διαφορετικές μεμβράνες και συνδυασμό αυτών, εξετάστηκε με πρότυπα διαλύματα και πραγματικά δείγματα. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: i) μία μεμβράνη με πάχος $4,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$, παρασκευασμένη από διάλυμα συγκέντρωσης 4% w/v, ii) μία μεμβράνη με πάχος $18,1 \pm 4,2 \mu\text{m}$, παρασκευασμένη από διάλυμα συγκέντρωσης 15% w/v και iii) συνδυασμός δύο

μεμβρανών παρασκευασμένες από διάλυμα συγκέντρωσης 15% w/v και συνολικό πάχος $32,7 \pm 3,8$ μm . Τα αποτελέσματα που αναφέρονται στον **Πίνακα 1** αποδεικνύουν ότι τα διαλύματα που εξετάστηκαν, εκτός από το δείγμα ούρων με pH 8, δε διαπερνάνε καμία από τις μη τροποποιημένες (χωρίς ένζυμο) μεμβράνες. Έτσι κάθε σήμα που παράγεται από τους αντίστοιχους βιοαισθητήρες (δηλαδή με τις αντίστοιχες μεμβράνες, μετά την ακινητοποίηση σε αυτές του αντίστοιχου ενζύμου) συμβαίνει, αποκλειστικά, λόγω της αποδόμησης της μεμβράνης μετά την αύξηση του pH, η οποία προκαλείται από την ενζυμικά παραγόμενη αμμωνία. Η μεμβράνη Eudragit® S100 πάχους $4,5 \pm 0,3$ μm , η οποία ήταν η μοναδική που απέτυχε στο πείραμα αυτό, δεν ενδείκνυται για χρήση σε δείγματα ούρων pH 8, καθώς σε αυτή την περίπτωση η απόκριση του αντίστοιχου βιοαισθητήρα δε συμβαίνει αποκλειστικά λόγω της αποδόμησης της μεμβράνης από την ενζυμικά παραγόμενη αμμωνία. Το γεγονός ότι το ίδιο δείγμα ούρων με pH 8 δεν αποδομεί τις υπόλοιπες μεμβράνες οφείλεται στο ότι τα ισοδύναμα των ιόντων υδροξυλίου που περιέχονται στα 30 μL δείγματος που προστίθενται στο βιοαισθητήρα, δεν επαρκούν ώστε να εξουδετερώσουν το μεγαλύτερο αριθμό καρβοξυλομάδων που περιέχονται σε μεμβράνες μεγαλύτερου πάχους ή που είναι κατασκευασμένες από πιο πυκνά διαλύματα του συμπολυμερούς.

2.4.2 Προσδιορισμός ουρίας σε μη επεξεργασμένα δείγματα ούρων

Για τον προσδιορισμό της ουρίας στα ούρα, η μεμβράνη Eudragit® S100 τροποποιήθηκε με ουρεάση, ένα ένζυμο το οποίο μετατρέπει την ουρία σε διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία. Η ενζυμικά παραγόμενη αμμωνία, η συγκέντρωση της οποίας είναι ανάλογη της αρχικής συγκέντρωσης της ουρίας στο δείγμα, αυξάνει το pH του δείγματος και κατά συνέπεια προκαλεί την αποδόμηση της μεμβράνης και την καθοδική ροή του δείγματος στο κανάλι του βιοαισθητήρα. Όταν το δείγμα κινηθεί στο κανάλι, η αρχικά άπειρη ηλεκτρική αντίσταση μεταξύ των δύο αγώγιμων ταινιών χαλκού, γίνεται πεπερασμένη ($< 20 \text{ MOhm}$), ενώ ο χρόνος που απαιτείται για αυτή τη μετάβαση είναι ανάλογος της συγκέντρωσης της ουρίας.

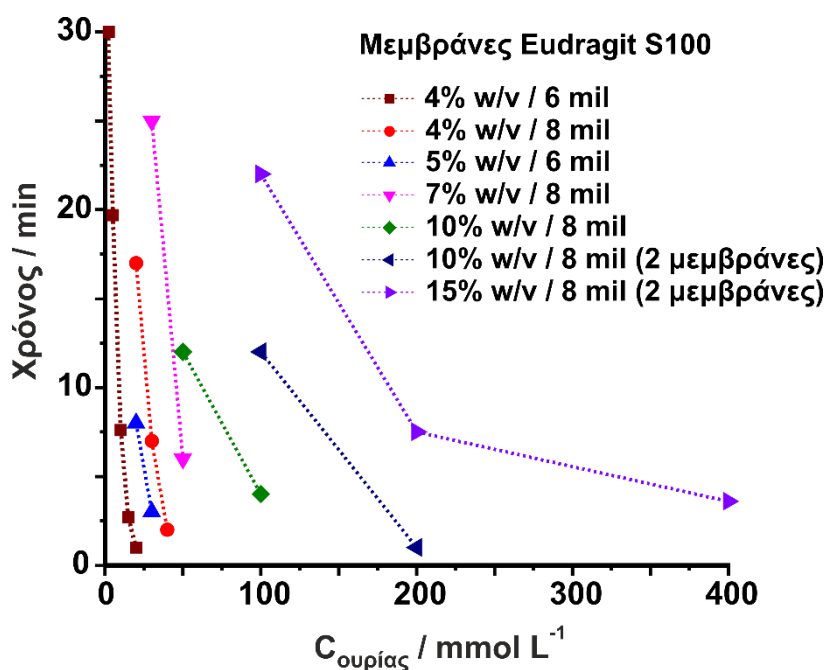
Πίνακας 1. Μελέτη μεμβρανών Eudragit® S100 ως προς την αντίσταση τους στη ροή διαφόρων διαλυμάτων. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε για 60 λεπτά και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση για 20 διαφορετικές μετρήσεις.

Διαλύματα (όγκος 30 μ L)	Μεμβράνες Eudragit® S100		
	4% w/v	15% w/v	15% w/v 2 μεμβράνες
	πάχος $4,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$	πάχος $18,1 \pm 4,2 \mu\text{m}$	πάχος $32,7 \pm 3,8 \mu\text{m}$
	Χρόνος απόκρισης (λεπτά)		
30 mM PB, pH 6,5	Δεν εξετάστηκε	Δεν εξετάστηκε	>60
40 mM PB, pH 6,5	Δεν εξετάστηκε	Δεν εξετάστηκε	4 στους 20 βιοαισθητήρες έδωσαν σήμα σε <60 λεπτά
200 mM ουρία, pH 6,2	>60	Δεν εξετάστηκε	Δεν εξετάστηκε
Δείγμα ούρων, pH 5	>60	>60	>60
Δείγμα ούρων, pH 6	>60	>60	>60
Δείγμα ούρων, pH 6,5	>60	>60	>60
Δείγμα ούρων, pH 7	>60	>60	>60
Δείγμα ούρων, pH 8	36 ± 14	>60	>60

2.4.3 Ρύθμιση του εύρους ανίχνευσης

Η μελέτη απόκρισης του βιοαισθητήρα BioP^oC με διάφορες μεμβράνες Eudragit® S100, παρασκευασμένες από διαλύματα πολυμερούς διαφόρων συγκεντρώσεων και σε διαφορετικά πάχη, τροποποιημένες με 3 U ουρεάση, πραγματοποιήθηκε με πρότυπα υδατικά διαλύματα ουρίας και για μέγιστο χρόνο ανάλυσης 30 λεπτά. Η μελέτη αυτή έχει στόχο να βρεθεί η κατάλληλη μεμβράνη ή συνδυασμός αυτών, που να αποκρίνεται σε όλο το φυσιολογικό εύρος συγκεντρώσεων της ουρίας στα ούρα, το οποίο είναι 150-388 mM¹⁰⁴. Στο **Σχήμα 11**, παρουσιάζεται το εύρος απόκρισης όλων των μεμβρανών που εξετάστηκαν, για μέγιστο χρόνο ανάλυσης 30 λεπτών. Βρέθηκε ότι ο συνδυασμός δύο μεμβρανών Eudragit® S100, παρασκευασμένες από διάλυμα 15% w/v και συνολικού πάχους $32,7 \pm 3,8 \mu\text{m}$, εμφανίζει απόκριση στο

επιθυμητό εύρος ουρίας, και έτσι επιλέχθηκε για την κατασκευή του βιοαισθητήρα και τις περαιτέρω αναλυτικές μελέτες. Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν προηγουμένως, αποδεικνύουν ότι το εύρος ανίχνευσης του βιοαισθητήρα BioPoC μπορεί να ρυθμιστεί σύμφωνα με τη συγκέντρωση του επιθυμητού αναλύτη στο βιολογικό δείγμα, επιλέγοντας τη μεμβράνη με το κατάλληλο πάχος και συγκέντρωση του συμπολυμερούς.



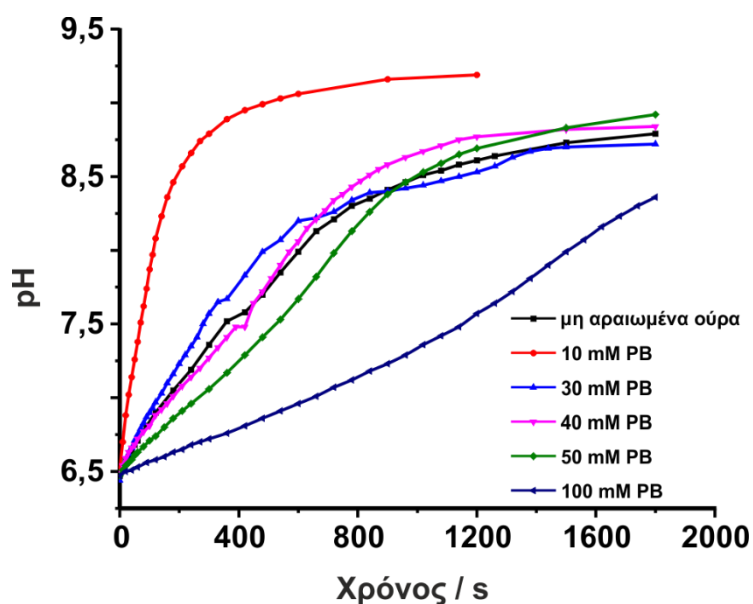
Σχήμα 11. Απόκριση των τροποποιημένων με ουρεάση μεμβρανών Eudragit® S100 σε πρότυπα υδατικά διαλύματα ουρίας. Οι μεμβράνες παρασκευάστηκαν από διαλύματα Eudragit® S100 συγκέντρωσης 4-15% w/v, σε δύο διαφορετικά πάχη του οδηγού μορφοποίησης των μεμβρανών 6 και 8 mil.

2.4.4 Βαθμονόμηση της μεθόδου

Ψάχνοντας το καταλληλότερο μέσο για τη βαθμονόμηση της μεθόδου, συγκρίθηκαν οι κινητικές, $\Delta pH = f(\text{Time})$, δείγματος ούρων προερχόμενο από ανάμιξη διαφορετικών δειγμάτων (pooled sample), το οποίο έχει αναλυθεί με τη μέθοδο αναφοράς του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Ιωαννίνων και βρέθηκε να έχει συγκέντρωση 260 mM, με πρότυπα διαλύματα ουρίας συγκέντρωσης 260 mM

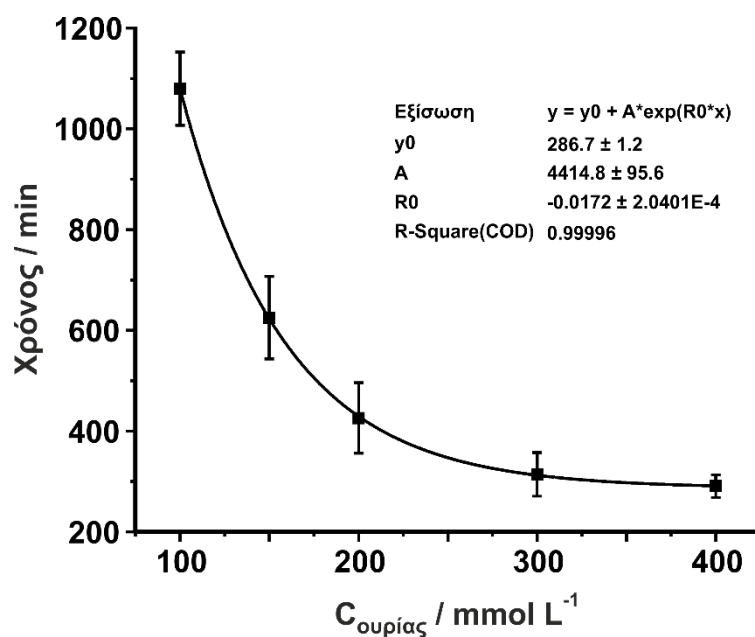
παρασκευασμένα σε 10-100 mM PB pH 6,5. Αυτό το πείραμα έχει ως στόχο την προσομοίωση της ρυθμιστικής χωρητικότητας ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος ούρων, το οποίο αποτελείται από διαφορετικά δείγματα συλλεγμένα όλο το 24ωρο, με ένα κοινό ρυθμιστικό διάλυμα όπως το PB. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κοινή πρακτική που ακολουθείται με την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων στο βέλτιστο ρυθμιστικό διάλυμα και η σύγκριση των χρόνων απόκρισης με το δείγμα αραιωμένο στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, δεν μπορεί να εφαρμοστεί στην περίπτωση που η ανάλυση πραγματοποιείται σε μη αραιωμένο δείγμα.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με ένα ηλεκτρόδιο pH σε 5 mL διαλύματος, με προσθήκη 30 U ουρεάση στο διάλυμα και ήπια ανάδευση. Στο **Σχήμα 12**, παρατηρείται ότι οι καμπύλες κινητικής των ρυθμιστικών διαλυμάτων με συγκεντρώσεις 30, 40 και 50 mM παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά με αυτή του δείγματος ούρων. Αντίθετα, στο ρυθμιστικό διάλυμα με συγκέντρωση 10 mM η τιμή του pH αυξάνεται απότομα και φθάνει σε μια τελική τιμή μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρήθηκε με το δείγμα, ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 100 mM η αύξηση του pH περιορίζεται σε σημαντικό βαθμό. Έτσι, προτείνεται το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 40 mM ως το βέλτιστο μέσο για τη βαθμονόμηση της μεθόδου, το οποίο παρουσιάζει παρόμοια κινητική με αυτή του δείγματος ούρων. Το ρυθμιστικό διάλυμα αυτό εξετάστηκε, στη συνέχεια, ως προς το κριτήριο ZBR σε 20 βιοαισθητήρες τροποποιημένους με ένζυμο, με την προσθήκη 30 μ L διαλύματος 40 mM PB pH 6,5 χωρίς ουρία. Στο πείραμα αυτό, τέσσερις στους είκοσι βιοαισθητήρες που δοκιμάστηκαν δεν ικανοποίησαν το κριτήριο ZBR, το διάλυμα διαπέρασε τη μεμβράνη, χωρίς να τη διασπάσει προηγουμένως, εφόσον δεν περιείχε ουρία, και έτσι η αμέσως μικρότερη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, δηλαδή τα 30 mM PB, επιλέχθηκε ως ο βέλτιστος συνδυασμός μεταξύ της κινητικής του ρυθμιστικού διαλύματος και της εκπλήρωσης της συνθήκης ZBR. Για το ρυθμιστικό διάλυμα 30 mM PB και οι είκοσι βιοαισθητήρες που δοκιμάστηκαν ικανοποίησαν το κριτήριο ZBR.



Σχήμα 12. Μεταβολή του pH προτύπων διαλυμάτων ουρίας 260 mM σε 10-100 mM PB pH 6,5 και δείγματος ούρων συγκέντρωσης 260 mM και pH 6,5 με το χρόνο. Ο χρόνος μετράει από τη στιγμή που προστίθεται το ένζυμο στο διάλυμα.

Η εκθετική σχέση μεταξύ του χρόνου απόκρισης του βιοαισθητήρα και της συγκέντρωσης της ουρίας, σε πρότυπα διαλύματα 30 mM PB pH 6,5, σε όλο το φυσιολογικό εύρος στα ούρα παρουσιάζεται στο **Σχήμα 13**. Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν τέσσερις μετρήσεις, οι οποίες παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 2**. Η σχετική τυπική απόκλιση των μετρήσεων κυμαίνεται μεταξύ 6,7–16,4%. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εφαρμογή της συσκευής BioP_{OC} γίνεται με την προσθήκη μιας σταγόνας ούρων. Δύο πραγματικά δείγματα ούρων (ανάμιξη διαφορετικών δειγμάτων) αναλύθηκαν με τη συσκευή BioP_{OC} και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της ουρίας σε αυτά με την εκθετική καμπύλη αναφοράς. Κάθε δείγμα εξετάστηκε τέσσερις φορές με τέσσερις διαφορετικούς βιοαισθητήρες. Τα αποτελέσματα της συσκευής BioP_{OC} και της μεθόδου αναφοράς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με τη μέθοδο αναφοράς για τα δύο δείγματα που εξετάστηκαν με τη συσκευή BioP_{OC}, το σχετικό σφάλμα βρέθηκε 8,2% και 12,8%, το οποίο είναι απόλυτα ικανοποιητικό για αυτή την εφαρμογή.



Σχήμα 13. Απόκριση της συσκευής BioPOC σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ουρίας σε 30 mM PB pH 6,5. Ο βιοαισθητήρας κατασκευάστηκε με δύο μεμβράνες συνολικού πάχους $32,7 \pm 3,8$ μm και τροποποιήθηκε με 3 U ουρεάση.

Πίνακας 2. Χρόνοι απόκρισης της συσκευής BioPOC σε πρότυπα διαλύματα ουρίας σε 30 mM PB pH 6,5. MO: μέσος όρος, SD: τυπική απόκλιση, RSD: σχετική τυπική απόκλιση.

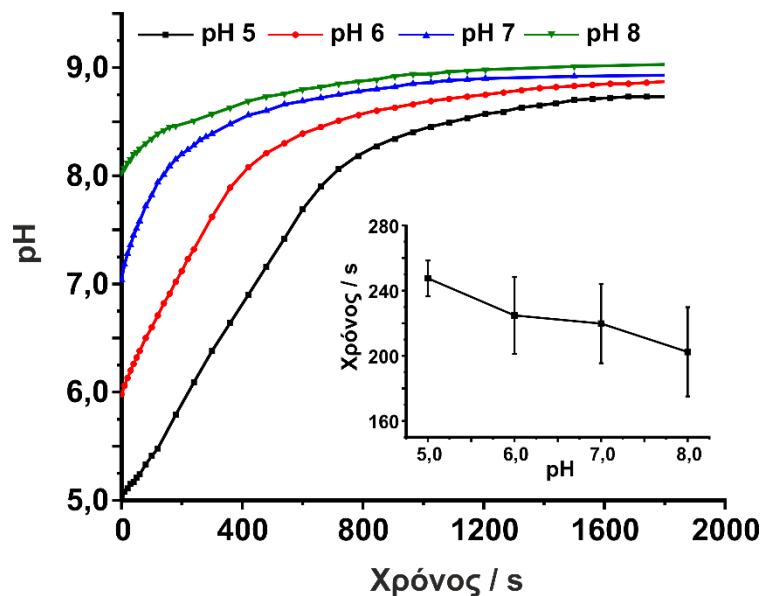
C _{ουρίας} (mM)	Μετρήσεις				MO $\pm$ SD	RSD%
	t ₁ (s)	t ₂ (s)	t ₃ (s)	t ₄ (s)	(n=4)	
100	1037	1064	1032	1187	1080 $\pm$ 73	6,7
150	576	716	670	539	625,3 $\pm$ 81,9	13,1
200	433	462	326	483	426,0 $\pm$ 69,8	16,4
300	313	314	262	368	314,2 $\pm$ 43,3	13,8
400	312	300	292	260	291,0 $\pm$ 22,2	7,6

Πίνακας 3. Προσδιορισμός της ουρίας σε πραγματικά δείγματα ούρων με τη συσκευή BioPoC. Οι τιμές συγκέντρωσης της συσκευής BioPoC είναι αποτέλεσμα τεσσάρων διαφορετικών μετρήσεων και παρουσιάζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση αυτών.

Δείγμα	Συσκευή BioPoC mM ουρίας	Μέθοδος αναφοράς mM ουρίας	Σχετικό σφάλμα %
Δείγμα 1	265±29	245	8,2
Δείγμα 2	290±32	257	12,8

Δεδομένου ότι το pH των ούρων κυμαίνεται από 4,5 έως 8^{105} , εξετάστηκε επιπλέον η επίδραση του αρχικού pH των ούρων στους χρόνους απόκρισης του βιοαισθητήρα. Για αυτό το λόγο, ένα δείγμα ούρων με αρχικό pH 6,7, χωρίστηκε σε τέσσερα μέρη και ρυθμίστηκε το pH του κάθε ενός σε τιμές 5, 6, 7 ή 8 προσθέτοντας 1 M HCl ή 1 M NaOH. Τα πειράματα της κινητικής της ενζυμικής αντίδρασης πραγματοποιήθηκαν με ένα ηλεκτρόδιο pH σε κυψελίδα δείγματος 5 mL, υπό ανάδευση. Η συγκέντρωση της ουρεάσης που προστέθηκε ήταν 30 U και ο χρόνος μετρήθηκε από τη στιγμή της προσθήκης του ενζύμου. Τα πειράματα απόκρισης της συσκευής BioPoC πραγματοποιήθηκαν με βιοαισθητήρες αποτελούμενους από δύο μεμβράνες Eudragit® S100 συνολικού πάχους $32,7 \pm 3,8$ μm , παρασκευασμένες από διάλυμα συμπολυμερούς 15% w/v, τροποποιημένες με 3 U ουρεάση. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το pH των προτύπων διαλυμάτων της καμπύλης αναφοράς θα πρέπει να είναι ίδιο με αυτό του δείγματος που εξετάζεται, αφού στην αντίθετη περίπτωση, i) η κινητική της υδρόλυσης της ουρίας παρουσία της ουρεάσης (**Σχήμα 14**) και ii) τα ισοδύναμα υδροξυλιόντα που απαιτούνται για την αποδόμηση της μεμβράνης (τα οποία παρουσιάζονται ως προς το χρόνο που απαιτείται για την αποδόμηση της μεμβράνης σε κάθε pH, **Σχήμα 14 ένθετο**), διαφέρουν. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, σε αυτό το πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης της συσκευής BioPoC, ο προσδιορισμός της ουρίας απαιτεί να προηγηθεί η μέτρηση του pH του δείγματος προκειμένου να επιλεγεί η καταλληλότερη καμπύλη βαθμονόμησης, ανάλογα με το αρχικό pH του δείγματος. Παρ' όλο που η μέτρηση του pH του δείγματος μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα με ένα πεχαμετρικό χαρτί, η συσκευή BioPoC θα μπορούσε δυνητικά να αναβαθμιστεί ώστε να παρέχει τη μέτρηση του pH του δείγματος,

επιλέγοντας στη συνέχεια την κατάλληλη καμπύλη βαθμονόμησης. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μία αραίωση του δείγματος με ένα ρυθμιστικό διάλυμα συγκεκριμένου pH, το οποίο θα επιτρέπει την ανάλυση όλων των δειγμάτων με μία μόνο καμπύλη βαθμονόμησης.



Σχήμα 14. Καμπύλες κινητικής της ενζυμικής αντίδρασης σε δείγματα ούρων με διαφορετικό αρχικό pH 5-8, τα οποία περιέχουν την ίδια συγκέντρωση ουρίας.

2.5 Συμπεράσματα

Στην εργασία αυτή αναπτύχθηκε μια ιατροδιαγνωστική συσκευή χρησιμοποιώντας i) μια «ελεύθερη» μεμβράνη παρασκευασμένη από ένα συμπολυμερές αποκρινόμενο στο pH, η οποία μπορεί να κατασκευαστεί σε μεγάλες ποσότητες με χαμηλό κόστος και με αναπαραγώγιμο τρόπο, ii) έναν νέο τύπο σήματος, το χρόνο, η μέτρηση του οποίου απαιτεί απλές ηλεκτρονικές διατάξεις, χαμηλού κόστους, και iii) έναν έτοιμο προς χρήση βιοαισθητήρα, κατασκευασμένο από χαμηλού κόστους, εμπορικά διαθέσιμα υλικά, που επιτρέπει εφαρμογές με προσθήκη μη αραιωμένων βιολογικών δειγμάτων.

Τα δεδομένα δείχνουν ότι η συσκευή BioP_{OC} προσφέρει εξαιρετική εκλεκτικότητα έναντι των συστατικών ενός βιολογικού δείγματος, ρυθμιζόμενο εύρος ανίχνευσης,

ευκολία στην πραγματοποίηση της ανάλυσης και δυνατότητα εφαρμογής της συσκευής από μη εκπαιδευμένο προσωπικό, η οποία βρίσκεται σε πλήρη συμμόρφωση με τα κριτήρια ASSURED που θέτει ο ΠΟΥ. Επιπλέον, έχει σχεδιαστεί για να έχει μικρό μέγεθος, μικρό βάρος και χαμηλή κατανάλωση ενέργειας.

Η εφαρμογή της τεχνολογίας BioPoC μπορεί να επεκταθεί σε ένα μεγάλο εύρος βιοχημικών δεικτών με τον κατάλληλο συνδυασμό αποκρινόμενων πολυμερών και ενζύμων, όπως οι αμιδοϋδρολάσες (EC 3.5.x.x), λυάσες άνθρακα οξυγόνου (E.C 4.3.x.x), που παράγουν αμμωνία, σε συνδυασμό με μεμβράνες πολυμερών αποκρινόμενων στο pH, ή άλλες οξειδοοδουκτάσες που χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως δέκτη (EC 1.1.3.x, EC 1.2.3.x), οι οποίες παράγουν H₂O₂, σε συνδυασμό με μεμβράνες πολυμερών αποκρινόμενων στο H₂O₂. Ως εκ τούτου, η συσκευή BioPoC, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια αναλυτική συσκευή για τον προσδιορισμό διαφόρων βιοχημικών δεικτών σε αναλύσεις πεδίου.

Σε σύγκριση με προηγούμενες εργασίες για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων βασισμένων σε φαινόμενα αποδόμησης πολυμερών, η τεχνολογία BioPoC προσφέρει σαφή πλεονεκτήματα όσον αφορά την απλότητα, τη φορητότητα και τη δυνατότητα χρήσης για εφαρμογές στο σημείο περίθαλψης.

3 Βιοαισθητήρας κρεατινίνης τύπου κάρτας SIM συζευγμένος με «έξυπνα» κινητά

3.1 Περίληψη

Στο κεφάλαιο αυτό προτείνεται μία νέα συσκευή και ένας νέου τύπου βιοαισθητήρας, σε μορφή κάρτας SIM, που βασίζεται σε ένα κάθετο κανάλι ροής σε χαρτί, τροποποιημένο με συμπολυμερή αποκρινόμενα στο pH. Ο βιοαισθητήρας ενσωματώθηκε σε μία συσκευή που έχει τη δυνατότητα απομακρυσμένης σύνδεσης με «έξυπνα» κινητά, και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης στα ούρα. Αρχικά, ένα κάθετο μικρορευστομηχανικό κανάλι δημιουργήθηκε με την τεχνική εκτύπωσης κεριού σε ένα χρωματογραφικό χαρτί. Η υδρόφιλη επιφάνεια καλύφθηκε με το τυχαίο συμπολυμερές πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας)/πολυ(μεθακρυλικό οξύ) (PMMA-co-PMAA), ένα συμπολυμερές αποκρινόμενο στο pH. Για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης, στην επιφάνεια του συμπολυμερούς ακινητοποιήθηκε το ένζυμο δεϊμινάση της κρεατινίνης (creatinine deiminase, CD). Τα αποτελέσματα έδειξαν, αφενός, μηδενική ροή του δείγματος ούρων στο τροποποιημένο με το PMMA-co-PMAA κάθετο κανάλι ροής, απουσία του ενζύμου CD (αυτό αποδεικνύει τη μεγάλη εκλεκτικότητα της μεθόδου έναντι των συστατικών της μήτρας του δείγματος), και αφετέρου, τη ροή του δείγματος στο κανάλι μετά την αποδόμηση του συμπολυμερούς που προκαλείται από την ενζυμικά παραγόμενη αμμωνία κατά την εκλεκτική υδρόλυση της κρεατινίνης παρουσία του ενζύμου. Για την κατασκευή του βιοαισθητήρα το τροποποιημένο με CD/PMMA-co-PMAA χαρτί συνδυάστηκε με τρεις αγώγιμες ταινίες σε μία συστοιχία που επιτρέπει την αυτόματη έναρξη και παύση της λειτουργίας του χρονομέτρου, κατά την προσθήκη του δείγματος και στο τέλος της μέτρησης, αντίστοιχα. Ο χρόνος αυτός αντιστοιχεί στο χρόνο αποδόμησης του συμπολυμερούς και είναι ανάλογος της συγκέντρωσης της κρεατινίνης. Το κύκλωμα αυτόματης έναρξης και παύσης της λειτουργίας του χρονομέτρου βασίζεται σε μετρήσεις της ηλεκτρικής αντίστασης μεταξύ των τριών αγώγιμων ταινιών. Οι παραπάνω μετρήσεις γίνονται με τη βοήθεια δύο κυκλωμάτων που ελέγχονται μέσω ενός μικροεπεξεργαστή με Bluetooth®, ώστε να είναι δυνατή η ασύρματη επικοινωνία της συσκευής με το «έξυπνο κινητό».

Χρησιμοποιώντας νέα συμπολυμερή PMMA-co-PMAA σε διάφορα μέσα μοριακά βάρη κατά αριθμό ($\bar{M}_n$) και κλάσματα όγκου (f) μεταξύ των δυο μονομερών, τα οποία αποκρίνονται στο pH, επιτυγχάνονται ρυθμιζόμενες ιδιότητες αποδόμησης. Με την επιλογή του κατάλληλου συμπολυμερούς (f , $\bar{M}_n$ και συγκέντρωση του συμπολυμερούς) το εύρος ανίχνευσης ρυθμίστηκε στα 3-30 mM κρεατινίνης, το οποίο καλύπτει το φυσιολογικό εύρος της συγκέντρωσης της κρεατινίνης στα ούρα. Η συσκευή χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης στα ούρα.

3.2 Εισαγωγή

Η κρεατινίνη είναι σημαντικός βιοδείκτης της υγείας του ανθρώπινου οργανισμού και σχετίζεται με τη λειτουργία των νεφρών, των μυών και του θυροειδούς αδένος. Μετά τη γλυκόζη, είναι ο βιοδείκτης που έχει μελετηθεί περισσότερο στην κλινική χημεία¹⁰⁶. Η αυξημένη συγκέντρωση της κρεατινίνης στα βιολογικά δείγματα είναι ένδειξη δυσλειτουργίας των νεφρών¹⁰⁷, ενώ σχετίζεται επιπλέον, με διάφορους τύπους μυϊκών διαταραχών και καρδιαγγειακά προβλήματα¹⁰⁸. Η συγκέντρωση της κρεατινίνης αποτελεί επίσης δείκτη της αξιοπιστίας των ούρων ως δείγματα, κυρίως σε ελέγχους ντόπινγκ αθλητών, θεωρώντας ότι συγκέντρωση κρεατινίνης πολύ μικρότερη από το φυσιολογικό όριο μπορεί να αφορά προσπάθεια αλλοίωσης του δείγματος με αραίωση¹⁰⁹.

Μέχρι σήμερα, η πιο διαδεδομένη και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού της κρεατινίνης είναι η μέθοδος Jaffe¹¹⁰, με την οποία παράγεται ένα χρωμογόνο συστατικό κατά την αντίδραση της κρεατινίνης με πικρικό οξύ σε αλκαλικές συνθήκες. Παρ' όλο που είναι μία οικονομική μέθοδος με πολύ μικρό χρόνο ανάλυσης (περίπου 15 λεπτά), ενδέχεται να παρεμποδίζεται από πρωτεΐνες, από τη γλυκόζη και το ακετοξικό οξύ¹¹¹. Επιπλέον, η απαίτηση για ένα ισχυρό αλκαλικό περιβάλλον κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, περιορίζει τη δυνατότητα εφαρμογής της σε αναλύσεις πεδίου¹⁰⁶. Εναλλακτικά, έχει προταθεί στη βιβλιογραφία μία μη ενζυμική μέθοδος, όπου η κρεατινίνη συμπλοκοποιείται με το χαλκό, χωρίς ωστόσο να εξαλείφει τα προβλήματα εκλεκτικότητας της μεθόδου. Σε αυτές τις μεθόδους, προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα ζητήματα στόμωσης του

αισθητήρα και εκλεκτικότητας, απαιτούνται περίπλοκα και χρονοβόρα πρωτόκολλα προκατεργασίας των δειγμάτων^{88,112}.

Τα προβλήματα παρεμποδίσεων από τα συστατικά της μήτρας μπορούν να ελαττωθούν χρησιμοποιώντας ηλεκτροχημικές μεθόδους που χρησιμοποιούν μία αλληλουχία ενζυμικών αντιδράσεων. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος συνδυασμός ενζύμων για τον έμμεσο προσδιορισμό της κρεατινίνης είναι η αμιδοϋδρολάση της κρεατινίνης, η αμιδινοϋδρολάση της κρεατίνης και η οξειδάση της σαρκοσίνης, από το οποίο προκύπτει ως τελικό προϊόν το H_2O_2 ^{106,113,114}. Ωστόσο, οι μέθοδοι πολλαπλών ενζύμων έχουν ως αποτέλεσμα το αυξημένο κόστος και την πολυπλοκότητα της ανάλυσης εξαιτίας της συνεργιστικής δράσης των ενζύμων, ενώ η παρουσία των ενδιάμεσων προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων επηρεάζει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων^{106,115}. Εναλλακτικά, έχουν προταθεί άλλες μέθοδοι που βασίζονται σε βιοαισθητήρες τροποποιημένους με δεϊμινάση της κρεατινίνης (CD) συζευγμένους με ποτενσιομετρικούς^{116–118} ή αμπερομετρικούς^{119–121} ανιχνευτές ή ανιχνευτές τρανζίστορ επίδρασης πεδίου (Field Effect Transistors, FET)^{122,123}. Οι μέθοδοι αυτές παρουσιάζουν περιορισμένη εκλεκτικότητα ως προς την κρεατινίνη, ενώ ο σχεδιασμός τους δεν ευνοεί τη χρήση τους σε χώρους εκτός εργαστηρίου από μη εκπαιδευμένο προσωπικό.

Μια μέθοδος συμβατή με PoC αναλύσεις για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης έχει ήδη προταθεί και βασίζεται σε ένα εκλεκτικό ηλεκτρόδιο αμμωνίου με ακινητοποιημένη CD, το οποίο συνδέεται με μια ιονανταλλακτική μεμβράνη για την απομάκρυνση των παρεμποδίζοντων κατιόντων που περιέχονται στα ούρα¹²⁴. Παρόλο που αυτή η PoC τεχνολογία ενσωματώθηκε σε μία συσκευή lab-on-a-chip, για τη διεξαγωγή της ανάλυσης απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι τόσο κατά τον εγκλιματισμό (>2h) όσο και κατά την απόκριση (μέχρι 1 h) του αισθητήρα.

Μία ενδιαφέρουσα μέθοδος για τον PoC προσδιορισμό της κρεατινίνης χρησιμοποιώντας ένα θερμιδομετρικό ανιχνευτή και CD έχει επίσης προταθεί στη βιβλιογραφία¹²⁵. Ένα μειονέκτημα αυτής της συσκευής είναι η πολύπλοκη κατασκευή των μεταλλακτών θερμότητας και η αναγκαιότητα για θερμικά απομονωμένους κρυστάλλους χαλαζία, ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο θόρυβος σήματος που προκαλείται από τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος και τις μηχανικές αναταράξεις λόγω της άντλησης του δείγματος. Η ανάπτυξη νέων διαγνωστικών

συσκευών, που να πληρούν τις προϋποθέσεις του ΠΟΥ, βρίσκεται ακόμα στο στάδιο της εξέλιξης, ενισχύοντας έτσι την ανάγκη για περαιτέρω ερεύνα.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η ανάπτυξη μια νέας PoC αναλυτικής συσκευής για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης στα ούρα, προσφέροντας i) μεγάλη εκλεκτικότητα ως προς τα υπόλοιπα συστατικά των ούρων και κυρίως, αντοχή σε θέματα στόμωσης του βιοαισθητήρα, αντιμετωπίζοντας έτσι δύο από τα κυριότερα προβλήματα που παρουσιάζονται στην εφαρμογή των ηλεκτροχημικών και οπτικών ανιχνευτών, ii) χαμηλού κόστους μεταλλάκτες που συμμορφώνονται με τα κριτήρια ASSURED που έχει θεσπίσει ο ΠΟΥ¹⁰¹, ξεπερνώντας έτσι τα εμπόδια που σχετίζονται με το υψηλό κόστος και την περίπλοκη κατασκευή των μικρής κλίμακας μεταλλακτών και τις δυσκολίες στην μεταφορά αυτών των τεχνολογιών σε βιομηχανική κλίμακα, iii) βιοαισθητήρες έτοιμους για χρήση χωρίς να απαιτείται κάποιο στάδιο προκατεργασίας του δείγματος, iv) βιοχημική ανάλυση με εφαρμογή μίας μόνο σταγόνας δείγματος και λειτουργία με την ελάχιστη παρέμβαση του τελικού χρήστη, και v) μία απλή λειτουργία «εισαγωγής δείγματος-εξαγωγής αποτελεσμάτων», που επιτρέπει τη χρήση από μη εκπαιδευμένους χρήστες. Ο προσδιορισμός της κρεατινίνης των ούρων πραγματοποιείται με μία μικρού μεγέθους, φιλική στο χρήστη, πολυλειτουργική βιοαναλυτική συσκευή, βασισμένη σε μία έξυπνη συστοιχία τριών αγώγιμων ταινιών και σε ένα βιοαισθητήρα χαρτιού τροποποιημένο με συμπολυμερές αποκρινόμενο στο pH και το ένζυμο CD, συνδυασμένα όλα σε μορφή κάρτας SIM και ενσωματωμένα σε μία αντίστοιχη θήκη για κάρτες SIM.

Για να επιτευχθεί η επιθυμητή αναλυτική λειτουργία του βιοαισθητήρα, μία σειρά από τυχαία συμπολυμερή PMMA-co-PMAA σε διάφορα μοριακά βάρη κατά αριθμό $\bar{M}_n$ και κλάσματα όγκου f , με ρυθμιζόμενες ιδιότητες αποδόμησης, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν. Η συσκευή που σχεδιάστηκε περιλαμβάνει ένα ενσωματωμένο κανάλι για την προσθήκη του δείγματος, και μπορεί να συνδεθεί με οποιασδήποτε έξυπνη συσκευή η οποία υποστηρίζει το σύστημα Android O.S, μέσω ασύρματης επικοινωνίας με Bluetooth®. Η συσκευή διαθέτει μία αυτόματη λειτουργία ενεργοποίησης και απενεργοποίησης του χρονομέτρου για τη μέτρηση του χρόνου αποδόμησης της αποκρινόμενης στο pH πολυμερικής μεμβράνης μέσω της μέτρησης της ηλεκτρικής αντίστασης μεταξύ των αγώγιμων ταινιών, χωρίς την παρέμβαση από τον τελικό χρήστη. Οι υπολογισμοί και η εμφάνιση της συγκέντρωσης της κρεατινίνης

αγνώστων δειγμάτων, στην οθόνη του «έξυπνου» κινητού, πραγματοποιούνται μέσα από μία εφαρμογή. Η αξιολόγηση της λειτουργίας της συσκευής πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων ούρων.

3.3 Πειραματικό μέρος

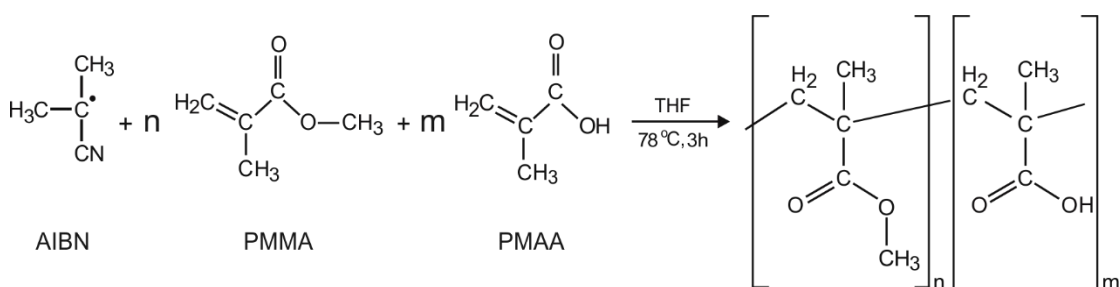
3.3.1 Αντιδραστήρια

Η δεϊμινάση της κρεατινίνης από μικροοργανισμό (EC 3.5.4.21), 13,7 units/mg αγοράστηκε από την εταιρεία Creative Enzymes. Το λαουρυλο-θεικό νάτριο (sodium lauryl sulfate, SLS), ο φθαλικός διβουτυλεστέρας (dibutyl phthalate, DBP), η ουρία, το ουρικό οξύ και το μεθακρυλικό οξύ (MAA) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Ο μεθακρυλικός μεθυλεστέρας (MMA) και το αζω-δισ-ισοβουτυρυλονιτρίλιο (azobisisobutyronitrile, AIBN) αγοράστηκαν από την εταιρεία Acros Organics. Η κρεατινίνη αγοράστηκε από την εταιρεία Alfa Aesar. Η ισοπροπανόλη (isopropanol, IPA) και το τετραϋδροφουράνιο (tetrahydrofuran, THF) αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck. Το συμπολυμερές Eudragit® S100 παραχωρήθηκε δωρεάν από την εταιρεία Evonik Nutrition & Care GmbH (Darmstadt, Germany). Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε δις-αποσταγμένο νερό (double distilled water, DDW). Το χρωματογραφικό χαρτί No.1, ήταν της εταιρείας Whatman. Τα διαλύματα τεχνητών ούρων (artificial urine, AU) προετοιμάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται σε προηγούμενη μελέτη¹²⁶ και διατηρήθηκαν στους -20 °C για μία εβδομάδα. Για τις δοκιμασίες μηδενικής απόκρισης στο τυφλό δείγμα (ZBR), στις μεμβράνες PMMA-co-PMAA ή στα τροποποιημένα με το ίδιο συμπολυμερές χρωματογραφικά χαρτιά, τα τεχνητά ούρα δεν περιείχαν κρεατινίνη. Το pH όλων των διαλυμάτων τεχνητών ούρων ρυθμίστηκε στο 6,5.

3.3.2 Σύνθεση των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA

Η σύνθεση των τυχαίων συμπολυμερών με διαφορετικά $\bar{M}_n$ και f έγινε μέσω πολυμερισμού ελευθέρων ριζών υπό συνθήκες υψηλού κενού. Η αντίδραση της σύνθεσης του συμπολυμερούς παρουσιάζεται στο **Σχήμα 15**. Σε μία σφαιρική φιάλη

των 500 mL, εξοπλισμένη με στρόφιγγα, προστέθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες από τα μονομερή MMA και MAA, καθώς και ο εκκινητής AIBN και ο διαλύτης THF. Διαφορετικές ποσότητες των μονομερών και του εκκινητή χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση του συμπολυμερούς με τα επιθυμητά $\bar{M}_n$ και f . Στην περίπτωση του PMMA-co-PMAA με $\bar{M}_n \sim 120$ kg/mol και f_{PMMA} (κλάσμα όγκου PMMA ως προς το PMAA) ίσο με 0,66, 21 mL (197 mmol) του MMA, 8,36 mL (98 mmol) του MAA και 0,29 g (1,76 mmol) του AIBN προστέθηκαν στη φιάλη. Σε όλες τις περιπτώσεις προστέθηκαν 50 mL THF στη φιάλη και το μείγμα αναδεύτηκε για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι όλα τα συστατικά να διαλυθούν πλήρως. Η σφαιρική φιάλη συνδέθηκε με γραμμή υψηλού κενού, το διάλυμα ψύχθηκε σε υγρό άζωτο και η στρόφιγγα άνοιξε ώστε να απομακρυνθεί όλο το οξυγόνο και τα υπόλοιπα αέρια που υπάρχουν στη γραμμή. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε δύο φορές ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το οξυγόνο. Στη συνέχεια, η φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 80 °C υπό ανάδευση για τρεις ώρες. Τέλος, το συμπολυμερές καταβυθίστηκε σε παγωμένο εξάνιο και ξηράθηκε όλο το βράδυ υπό κενό. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στη σύνθεση των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA_{x-y:z} παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**. Οι δείκτες x-y:z είναι οι κατά προσέγγιση τιμές των $\bar{M}_n$ και f , αντίστοιχα, με το f να εκφράζει το λόγο των εστερομάδων ως προς τις ελεύθερες καρβοξυλομάδες στο συμπολυμερές.



Σχήμα 15. Αντίδραση σύνθεσης του συμπολυμερούς PMMA-co-PMAA.

Πίνακας 4. Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των διαφόρων συμπολυμερών PMMA-co-PMAA.

Συμπολυμερές	$\bar{M}_n$ (kg/mol)	MMA	MAA	AIBN
PMMA-co-PMAA _{120-2:1}	122	21 mL (197 mmol)	8,36 mL (98 mmol)	0,29 g (1,76 mmol)
PMMA-co-PMAA _{120-2,5:1}	124	21 mL (197 mmol)	6,68 mL (79 mmol)	0,28 g (1,70 mmol)
PMMA-co-PMAA _{120-3:1}	121	21 mL (197 mmol)	5,57 mL (66 mmol)	0,28 g (1,70 mmol)
PMMA-co-PMAA _{60-2:1}	62	21 mL (197 mmol)	8,36 mL (98 mmol)	0,46 g (2,80 mmol)
PMMA-co-PMAA _{60-2,5:1}	61	21 mL (197 mmol)	6,68 mL (79 mmol)	0,44 g (2,68 mmol)
PMMA-co-PMAA _{30-2:1}	31	21 mL (197 mmol)	8,36 mL (98 mmol)	0,85 g (5,18 mmol)
PMMA-co-PMAA _{30-2,5:1}	32	21 mL (197 mmol)	6,68 mL (79 mmol)	0,83 g (5,06 mmol)

3.3.3 Μελέτες χαρακτηρισμού των συμπολυμερών

Το $\bar{M}_n$ και η κατανομή μοριακών βαρών ($\mathcal{D}$) των τυχαίων συμπολυμερών υπολογίστηκαν με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (size exclusion chromatography, SEC). Οι μετρήσεις τόσο για τις πρότυπες ουσίες πολυστυρενίου (με $\bar{M}_{n\text{κορυφής}}$: 4,3 έως 3000 kg/mol) όσο και για τα τυχαία συμπολυμερή λήφθηκαν σε διαλύτη THF. Φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$) σε DMSO-d₆ λήφθηκαν με ένα φασματόμετρο Bruker AVANCE II 400 MHz και τα δεδομένα επεξεργάστηκαν μέσω του λογισμικού UxNMR (Bruker). Η θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (differential scanning calorimetry, DSC), μέσω της οποίας υπολογίζεται η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) των συμπολυμερών, πραγματοποιήθηκε με τη διάταξη Q20 TA, με ρυθμό αλλαγής της θερμοκρασίας 5 °C/min, από 0 έως 140 °C. Τρεις θερμικοί κύκλοι (δύο θέρμανσης και ένας ψύξης)

πραγματοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό Advantage v5.4.0 (TA instruments). Οι μετρήσεις της γωνίας επαφής πραγματοποιήθηκαν στο όργανο OCA 25 (DataPhysics). Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (scanning electron microscopy, SEM) λήφθηκαν με το μικροσκόπιο JEOL JSM-6510 LV σε υλικά επικαλυμμένα με χρυσό με καθοδική ιοντοβολή (sputtering) (Polaron SC7620). Οι μελέτες της εμπέδησης διεξήχθησαν με τον ηλεκτροχημικό αναλυτή PGSTAT12/FRA11 (Metrohm Autolab) σε εκτυπωμένες ηλεκτροχημικές κυψελίδες μέσω της τεχνικής screen-printing, οι οποίες κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο μας και αποτελούνται από το ηλεκτρόδιο εργασίας (διαμέτρου 4 mm) και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο, εκτυπωμένα από μελάνι γραφίτη, καθώς και το ηλεκτρόδιο ψευδοαναφοράς, εκτυπωμένο με μελάνι αργύρου¹²⁷. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα 20 kHz εφαρμόζοντας μια ημιτονοειδή μεταβολή του δυναμικού (rms 0,01 V) πάνω σε σταθερό δυναμικό 0 V DC. Ο ηλεκτρολύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,02 M PB, pH 6,5-7,5. Το ηλεκτρόδιο εργασίας τροποποιήθηκε με 2 μ L διαλύματος 4% w/v μείγματος 9/1 w/w PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1}/PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1} σε 97/3 v/v IPA/DDW το οποίο περιέχει 35% w/w DBP (ως προς το στερεό συμπολυμερές). Τα ηλεκτρόδια, πριν τη χρήση τους, παρέμειναν σε θερμοκρασία 60 °C για 1 h ώστε να στεγνώσουν.

3.3.4 Κατασκευή των ελεύθερων μεμβρανών PMMA-co-PMAA

Τα διαλύματα PMMA-co-PMAA συγκέντρωσης 0,25-4% w/v παρασκευάστηκαν όπως περιεγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα. Συνοπτικά, κατάλληλη ποσότητα στερεού συμπολυμερούς προστέθηκε σε 50 mL διαλύτη και μετά από ισχυρή ανάδευση για δύο μέρες, απαερώθηκε υπό κενό και αποθηκεύτηκε σε σφραγισμένο δοχείο στους 20 °C. Στην περίπτωση του εμπορικά διαθέσιμου συμπολυμερούς Eudragit® S100, το οποίο αντιστοιχεί στο συμπολυμερές PMMA-co-PMAA με αναλογία MMA/MAA 2/1 και $\bar{M}_n$ 120 kg/mol, το επιφανειοδραστικό SLS, το οποίο βοηθάει τη διαλυτοποίηση του συμπολυμερούς στο μείγμα διαλυτών IPA/DDW, περιέχεται στο υλικό. Απουσία του SLS, η διαλυτοποίηση του συμπολυμερούς αυτού σε πολικούς διαλύτες είναι αδύνατη. Για τη διαλυτοποίηση του εργαστηριακά συντιθέμενου συμπολυμερούς PMMA-co-PMAA στο μείγμα IPA/DDW (97/3 v/v),

είναι απαραίτητη η προσθήκη του επιφανειοδραστικού υλικού. Η ποσότητα επιφανειοδραστικού που επιλέχθηκε είναι 0,3% w/w SLS, ίδια με αυτή που περιέχεται στο Eudragit® S100 και υπολογίζεται ως προς το στερεό συμπολυμερές. Εξετάστηκε, επίσης, η επίδραση πλαστικοποιητή στις ιδιότητες των μεμβρανών με την προσθήκη 35% w/w DBP (η ποσότητα υπολογίζεται ως προς το στερεό συμπολυμερές) στο διάλυμα του συμπολυμερούς. Στην περίπτωση που τα διαλύματα PMMA-co-PMAA παρασκευάζονται σε διαλύτη THF, δεν είναι απαραίτητη η προσθήκη του SLS, καθώς το συμπολυμερές διαλύεται εύκολα σε μη πολικούς διαλύτες.

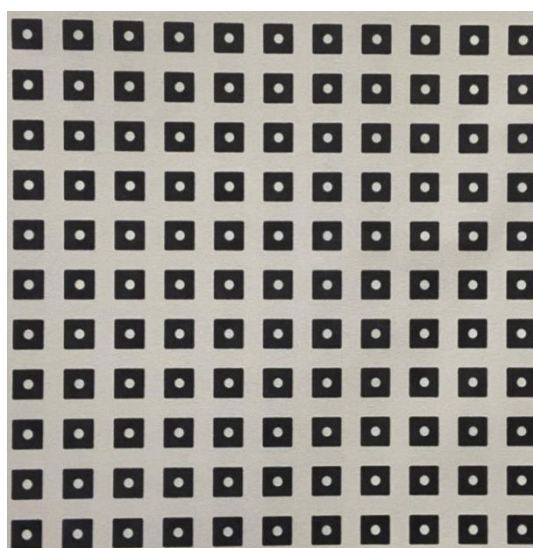
Η κατασκευή των μεμβρανών πραγματοποιήθηκε όπως και στην πρώτη μελέτη για την ανάπτυξη του βιοαισθητήρα της ουρίας. Σε αυτή την περίπτωση όμως η διαδικασία του σχηματισμού της μεμβράνης δεν πραγματοποιήθηκε χειροκίνητα, αλλά με ένα μηχανικό επάλειπτρο υγρής στρώσης (Elcometer 4340). Για το σχηματισμό των μεμβρανών, επάνω σε μια λεία, καθαρή και στεγνή επιφάνεια, το μηχανικό επάλειπτρο μετακινεί με σταθερή ταχύτητα και πίεση τον οδηγό μορφοποίησης των μεμβρανών, απλώνοντας το διάλυμα του συμπολυμερούς, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 16**. Η εφαρμογή του μηχανικού επάλειπτρου στην κατασκευή των μεμβρανών, βελτιώνει την επαναληψιμότητα της διαδικασίας εφόσον οι συνθήκες πίεσης και ταχύτητας του οδηγού είναι ίδιες κάθε φορά, κάτι που δεν μπορεί να επιτευχθεί με τη χειροκίνητη διαδικασία. Οι μεμβράνες μετά το σχηματισμό τους παραμένουν σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας και παραλαμβάνονται σε λουτρό DDW όπως περιεγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα.



Σχήμα 16. Κατασκευή μεμβρανών με το μηχανικό επάλειπτρο υγρής στρώσης.

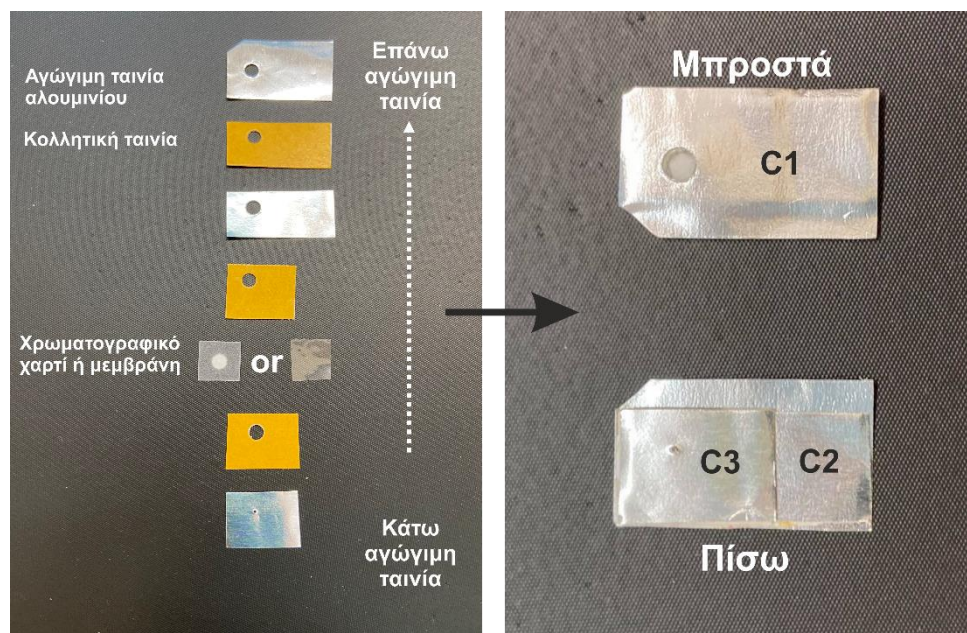
3.3.5 Συναρμολόγηση του βιοαισθητήρα σε μορφή κάρτας SIM

Δύο διαφορετικές μορφές του βιοαισθητήρα κατασκευάστηκαν και εξετάστηκε η λειτουργία τους. Ο πρώτος βιοαισθητήρας κατασκευάστηκε με «ελεύθερες» μεμβράνες του συμπολυμερούς PMMA-co-PMAA, διαστάσεων $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$. Οι μεμβράνες που κατασκευάστηκαν και εξετάστηκαν, απλώθηκαν σε αρχικό πάχος υγρής μεμβράνης 3 και 4 mil, από συμπολυμερή με $\bar{M}_n$ 30-120 kg/mol και διάλυμα συγκέντρωσης 4% w/v σε διαλύτη IPA/DDW 97/3, με ή χωρίς προσθήκη πλαστικοποιητή. Η δεύτερη μορφή βιοαισθητήρα βασίζεται σε τροποποιημένα με το συμπολυμερές PMMA-co-PMAA χρωματογραφικά χαρτιά, τα οποία έχουν προηγουμένως μορφοποιηθεί με κερί, δημιουργώντας υδρόφιλες και υδρόφοβες ζώνες. Το κάθετο υδρόφιλο κανάλι μικροροής, διαμέτρου 4 mm, στο χρωματογραφικό χαρτί, κατασκευάστηκε με εκτύπωση κεριού με τον εκτυπωτή ColorQube 8580DN (Xerox) και θερμική επεξεργασία στους 120°C για 30 δευτερόλεπτα. Στο **Σχήμα 17** παρουσιάζεται το χρωματογραφικό χαρτί μετά την εκτύπωση του υδρόφοβου μελανιού. Το υδρόφιλο κανάλι που σχηματίστηκε, καλύφθηκε με 2 μL διαλύματος PMMA-co-PMAA ($\bar{M}_n$ 30-120 kg/mol, 0,25-3% w/v σε 97/3 v/v IPA/DDW), και ακολούθησε θερμική επεξεργασία στους 60°C για 30 λεπτά.



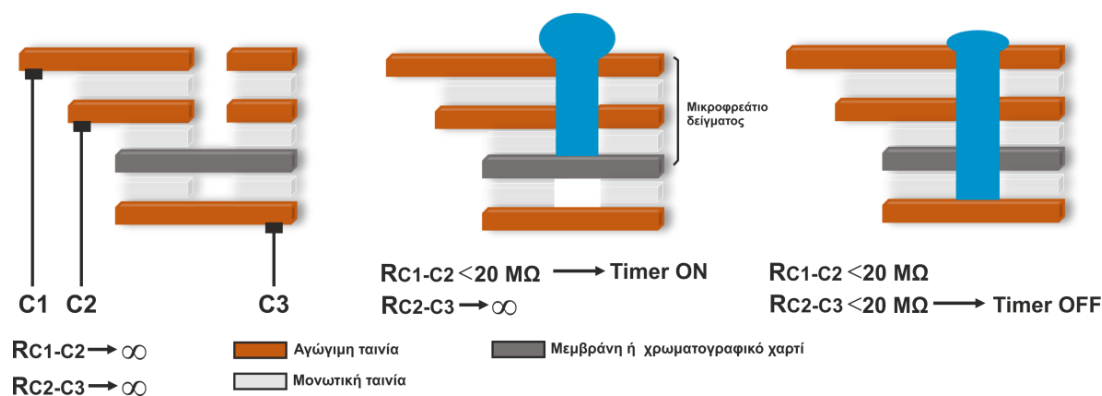
Σχήμα 17. Χρωματογραφικό χαρτί εκτυπωμένο με μελάνι κεριού για τη δημιουργία υδρόφιλων κάθετων μικρορευστομηχανικών καναλιών. Οι διαστάσεις κάθε εκτυπωμένου καναλιού είναι $1 \times 1 \text{ cm}^2$ και η διάμετρος 4 mm.

Η κατασκευή του βιοαισθητήρα σε μορφή κάρτας SIM παρουσιάζεται στο **Σχήμα 18**. Ο βιοαισθητήρας αποτελείται από τη μεμβράνη PMMA-co-PMAA ή το τροποποιημένο με PMMA-co-PMAA χαρτί, δύο αγώγιμες ταινίες αλουμινίου ($2,0 \times 1,2 \text{ cm}^2$, πάχους $30 \text{ }\mu\text{m}$) μορφοποιημένες με οπή διαμέτρου 3 mm , τρεις κολλητικές ταινίες διπλής όψης (πάχους $100 \text{ }\mu\text{m}$) μορφοποιημένες με οπή διαμέτρου 3 mm που λειτουργούν ως μονωτικά μεταξύ των αγώγιμων ταινιών, και μία ταινία αλουμινίου τροποποιημένη με μια οπή που δημιουργείται με μία καρφίτσα. Η μικρή οπή στην τελευταία ταινία αλουμινίου αποτρέπει το σχηματισμό φυσαλίδων στο κανάλι, όπως εξηγήθηκε και σε προηγούμενη ενότητα. Οι μεμβράνες PMMA-co-PMAA και τα τροποποιημένα με PMMA-co-PMAA χρωματογραφικά χαρτιά, τροποποιήθηκαν επιπλέον με CD, η οποία ακινητοποιήθηκε με φυσική προσρόφηση στην επιφάνεια του συμπολυμερούς, προσθέτοντας $2 \text{ }\mu\text{L}$ από διάλυμα $1 \text{ U}/\mu\text{L}$ CD σε 1 mM PB pH 6,5, και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Για την αξιολόγηση των βιοαισθητήρων ως προς τη μηδενική απόκριση στο τυφλό δείγμα (ZBR), παραλείπεται η προσθήκη του ενζύμου.



Σχήμα 18. Τα διάφορα στοιχεία του βιοαισθητήρα και η τελική του μορφή (εμπρόσθια και οπίσθια όψη). Ο τελικός βιοαισθητήρας προκύπτει ενώνοντας τις επιμέρους ταινίες με τη σειρά που παρουσιάζονται στην εικόνα.

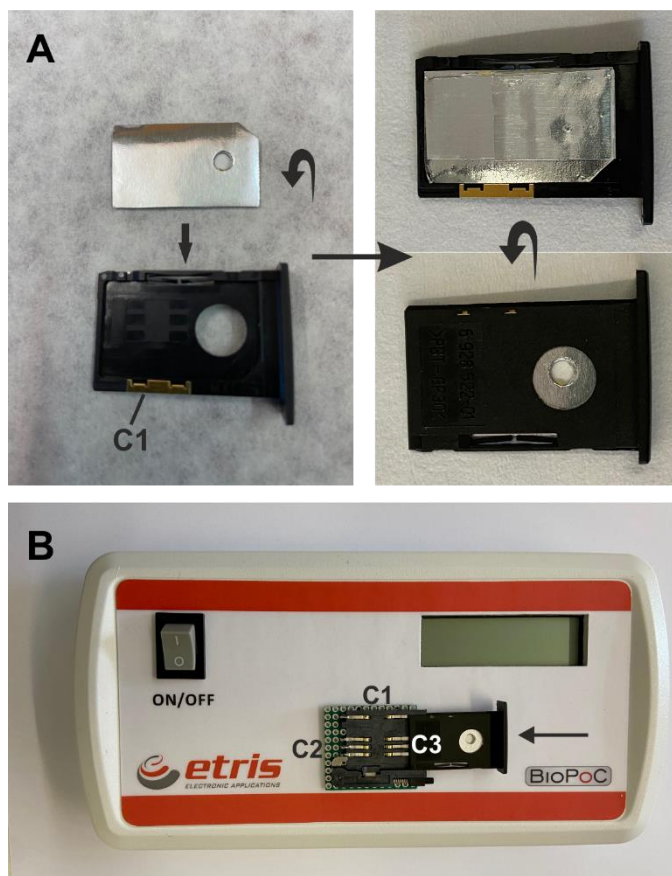
Η διάταξη των αγωγίμων ταινιών στο βιοαισθητήρα αυτό έχει σχεδιαστεί με τρόπο ώστε να προσφέρει τη μέγιστη αυτοματοποίηση στη διαδικασία της μέτρησης του χρόνου της ανάλυσης. Με την απλή προσθήκη μίας επιπλέον αγωγίμης ταινίας και την κατάλληλη συσκευή ελέγχου της αντίστασης μεταξύ αυτών, είναι εφικτό να πραγματοποιείται η εκκίνηση και ο τερματισμός της μέτρησης του χρόνου ανάλυσης χωρίς να απαιτείται από το χρήστη οποιαδήποτε ενέργεια που θα μπορούσε να οδηγήσει ακόμη και σε σφάλμα της μέτρησης αν δεν υπήρχε αυστηρός συντονισμός στις κινήσεις της προσθήκης του δείγματος και της έναρξης ενός εξωτερικού χρονομέτρου. Στο **Σχήμα 19**, περιγράφεται σχηματικά η ακριβής διαδικασία της έναρξης της μέτρησης του χρόνου και του τερματισμού της, που αντιστοιχεί στην προσθήκη του δείγματος και στην κάθετη ροή του δείγματος κατά μήκος όλου του καναλιού μετά την αποδόμηση της μεμβράνης. Αρχικά, κατά την προσθήκη του δείγματος η άπειρη ηλεκτρική αντίσταση μεταξύ των δύο πρώτων αγωγίμων ταινιών C1 και C2, γίνεται αμέσως πεπερασμένη και αυτόματα δίνεται η εντολή στο ηλεκτρονικό σύστημα για τη μέτρηση του χρόνου. Τη στιγμή της προσθήκης του δείγματος και κατά τη διάρκεια της μέτρησης, η αντίσταση μεταξύ των δύο τελευταίων αγωγίμων επαφών C2 και C3 είναι άπειρη, εφόσον δεν έχει επέλθει το στάδιο της αποδόμησης της μεμβράνης. Μετά την αποδόμησης της μεμβράνης και την επακόλουθη ροή του δείγματος στο κανάλι, η αντίσταση μεταξύ των αγωγίμων επαφών C2 και C3, λαμβάνει μία πεπερασμένη τιμή, και η ενέργεια αυτή σηματοδοτεί αυτόματα τη λήξη της μέτρησης του χρόνου και τον τερματισμό του χρονομέτρου. Όλη η διαδικασία που περιεγράφηκε παραπάνω, λαμβάνει χώρα αυτόματα χωρίς να χρειάζεται καμία ενέργεια του χρήστη της συσκευής, μηδενίζοντας τα σφάλματα που μπορεί να προκύπτουν από την έναρξη και τον τερματισμό ενός εξωτερικού χρονομέτρου.



Σχήμα 19. Σχηματική απεικόνιση της αυτοματοποιημένης μέτρησης του χρόνου ανάλυσης στο νέο βιοαισθητήρα BioPoC.

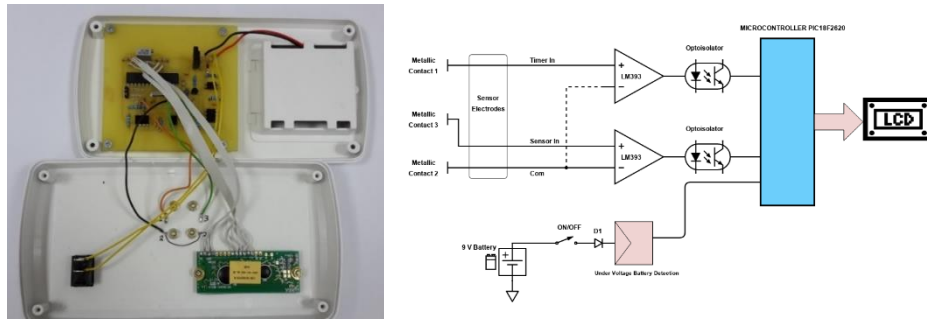
3.3.6 Σύνδεση και λειτουργία του βιοαισθητήρα τύπου SIM με τη συσκευή

Όπως παρουσιάζεται στο **Σχήμα 20Α**, ο βιοαισθητήρας προσαρμόζεται σε μία θήκη κάρτας SIM έτσι ώστε το άνοιγμα της θήκης να ευθυγραμμίζεται με το κανάλι του δείγματος στον βιοαισθητήρα, και η αγώγιμη ταινία C1 να αντικρίζει τη μεταλλική επαφή C1 της θήκης. Η θήκη, στη συνέχεια, εισάγεται στον υποδοχέα της, ο οποίος φέρει 8 μεταλλικές επαφές (δύο συστοιχίες τριών επαφών και μία συστοιχία δύο επαφών) και βρίσκεται ενσωματωμένος στο επάνω μέρος της συσκευής (**Σχήμα 20Β**). Η θήκη τοποθετείται στον υποδοχέα έτσι ώστε οι αγώγιμες ταινίες του βιοαισθητήρα C1, C2 και C3 να έρχονται σε επαφή με τις αντίστοιχες μεταλλικές επαφές του υποδοχέα, δηλαδή τις δύο συστοιχίες των τριών επαφών C2 και C3 και τη μία συστοιχία των δύο επαφών C1. Η πρώτη συσκευή BioPoC που χρησιμοποιείται στη μελέτη αυτή, παρουσιάζεται στο **Σχήμα 20Β** και έχει σχεδιαστεί ώστε να είναι αυτόνομη και δίνει το αποτέλεσμα της ανάλυσης στην οθόνη.

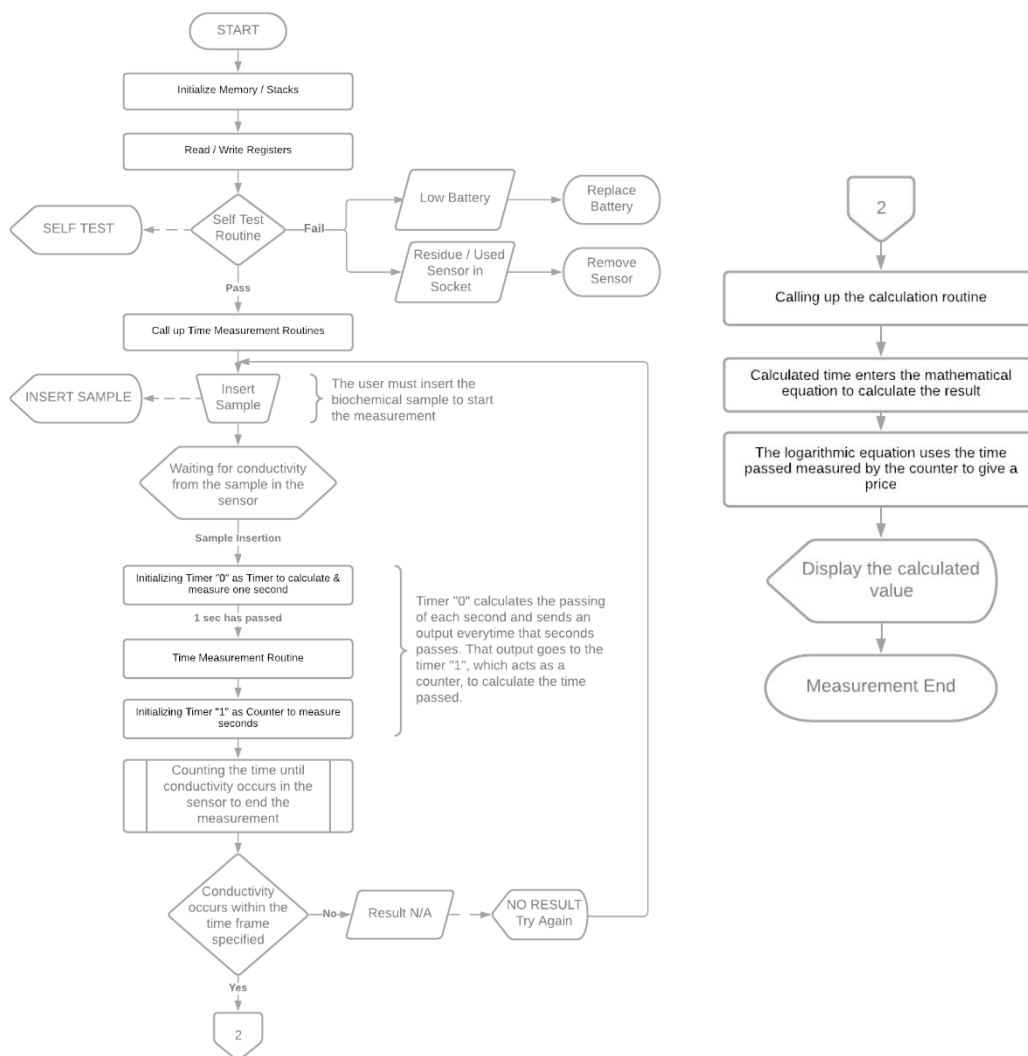


Σχήμα 20. Τοποθέτηση βιοαισθητήρα στη θήκη τύπου SIM και ενσωμάτωσή της στη συσκευή BioPoC.

Ο ηλεκτρονικός σχεδιασμός της συσκευής BioPoC που παρουσιάζεται στο **Σχήμα 21**, περιλαμβάνει ένα συγκριτή LM393 μέσω του οποίου ελέγχονται οι λειτουργίες της ηλεκτρονικής ενεργοποίησης του χρονομέτρου και της ηλεκτρικής αντίστασης. Η μέτρηση του χρόνου και η διεπαφή της οθόνης ελέγχονται μέσω του μικροεπεξεργαστή PIC18F26Q10. Η τροφοδοσία της συσκευής γίνεται από μια μπαταρία 9 V και ελέγχεται από ένα κύκλωμα προστασίας από ανάποδη πολικότητα τάσης και ένα κύκλωμα ελέγχου χαμηλής τάσης της μπαταρίας και προειδοποίησης.

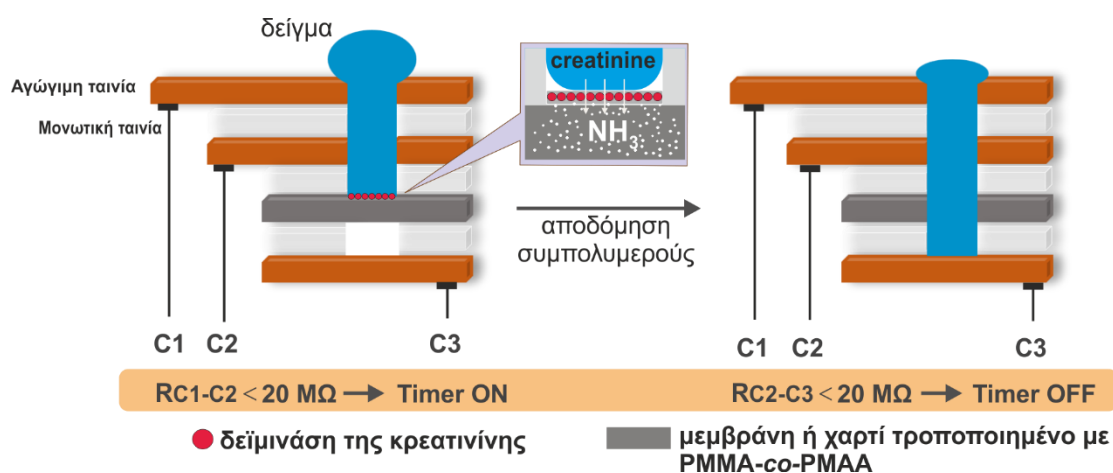


Σχήμα 21. Εσωτερικό ηλεκτρονικό σύστημα της συσκευής BioPoC και σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας (block diagram).



Σχήμα 22. Διάγραμμα ροής της λειτουργίας της συσκευής.

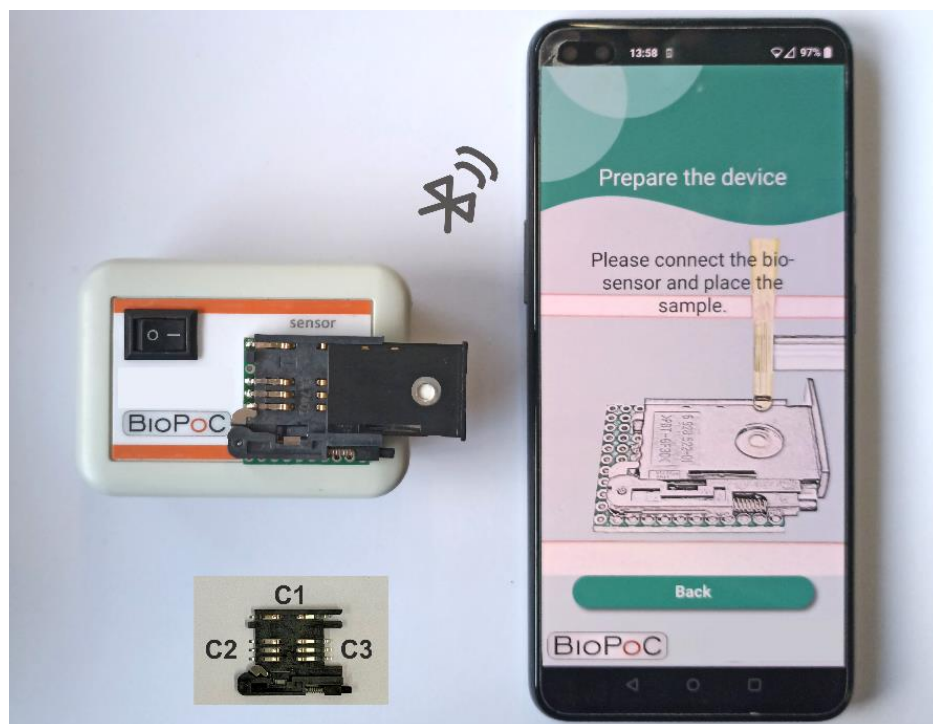
Η αρχή λειτουργίας του βιοαισθητήρα απόκρισης στην κρεατινίνη παρουσιάζεται στο **Σχήμα 23**. Ο βιοαισθητήρας αποτελείται από τη μεμβράνη απόκρισης ή το χρωματογραφικό χαρτί, τροποποιημένο με το συμπολυμερές απόκρισης στο pH. Ο προσδιορισμός της κρεατινίνης πραγματοποιείται έμμεσα, μέσω της αμμωνίας που παράγεται κατά την ενζυμική αντίδραση της κρεατινίνης με τη δειμινάση της κρεατινίνης (CD). Το ένζυμο CD καταλύει την υδρόλυση της κρεατινίνης σε N-μεθυλοουδανοϊνή και αμμωνία, αυξάνοντας το pH του διαλύματος, το οποίο στη συνέχεια προκαλεί την αποδόμηση της μεμβράνης ή της επικάλυψης PMMA-co-PMAA του χαρτιού.



Σχήμα 23. Αρχή λειτουργίας της μεθόδου.

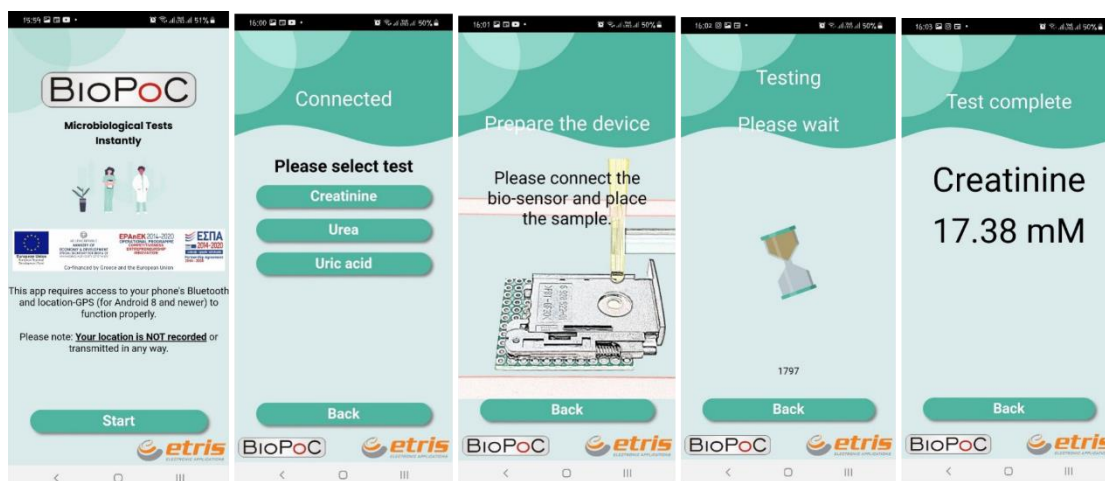
Για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης στα πραγματικά δείγματα ούρων, χρησιμοποιήθηκε μία νέα συσκευή, η οποία συνδέεται ασύρματα με «έξυπνες» συσκευές (**Σχήμα 24**). Η λειτουργία της συσκευής ελέγχεται μέσω της εφαρμογής «BioP^oC», η οποία διατίθεται ελεύθερα στο ηλεκτρονικό κατάστημα Google Play. Οι βασικές λειτουργίες της εφαρμογής παρουσιάζονται σε εικόνες στο **Σχήμα 25**. Ο υποδοχέας και η θήκη τύπου κάρτας SIM διατηρήθηκαν και σε αυτή τη συσκευή ώστε να χρησιμοποιείται ο ίδιος βιοαισθητήρας. Η συσκευή δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη να επιλέξει μεταξύ τριών αναλυτών: την ουρία, την κρεατινίνη και το ουρικό οξύ, τοποθετώντας τον αντίστοιχο βιοαισθητήρα στη θήκη της κάρτας SIM. Στην

παρούσα μελέτη η λειτουργία της συσκευής εξετάστηκε με τον προσδιορισμό της κρεατινίνης. Ανάλογα με την επιλογή του αναλύτη, ο μικροεπεξεργαστής χρησιμοποιεί την κατάλληλη καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης. Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης και οι τιμές των αντίστοιχων παραμέτρων, στην περίπτωση της κρεατινίνης (βλ. παράγραφο 3.4.6), (γ_0 , A, R_0), εισάγονται στην εφαρμογή μέσω ιστοσελίδας που προστατεύεται με κωδικό. Μετά την ανάλυση του πραγματικού δείγματος, ο χρόνος που μετρείται από το ηλεκτρονικό χρονόμετρο, εισάγεται αυτόματα μέσα από την εφαρμογή στην εξίσωση της καμπύλης αναφοράς και η συγκέντρωση της κρεατινίνης που υπολογίζεται, εμφανίζεται στην οθόνη του κινητού. Με βάση τα δεδομένα της καμπύλης αναφοράς, υπάρχει περιορισμός στη μέτρηση του χρόνου, ο οποίος είναι μεταξύ 1800 και 40 δευτερολέπτων, με βάση τις συγκεντρώσεις κρεατινίνης που επιλέχθηκαν. Στην περίπτωση που ο χρόνος είναι μικρότερος των 40 δευτερολέπτων, η μέτρηση απορρίπτεται και ζητείται από το χρήστη να επαναλάβει την ανάλυση αραιώνοντας το δείγμα.



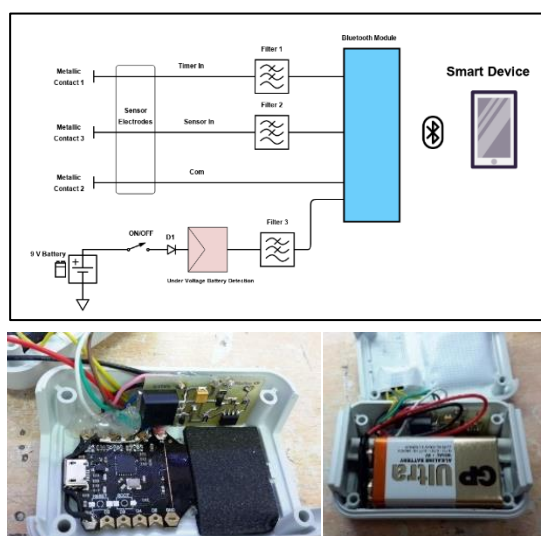
Σχήμα 24. Συσκευή BioPoC και η αντίστοιχη εφαρμογή στο κινητό.

Πειραματικό μέρος

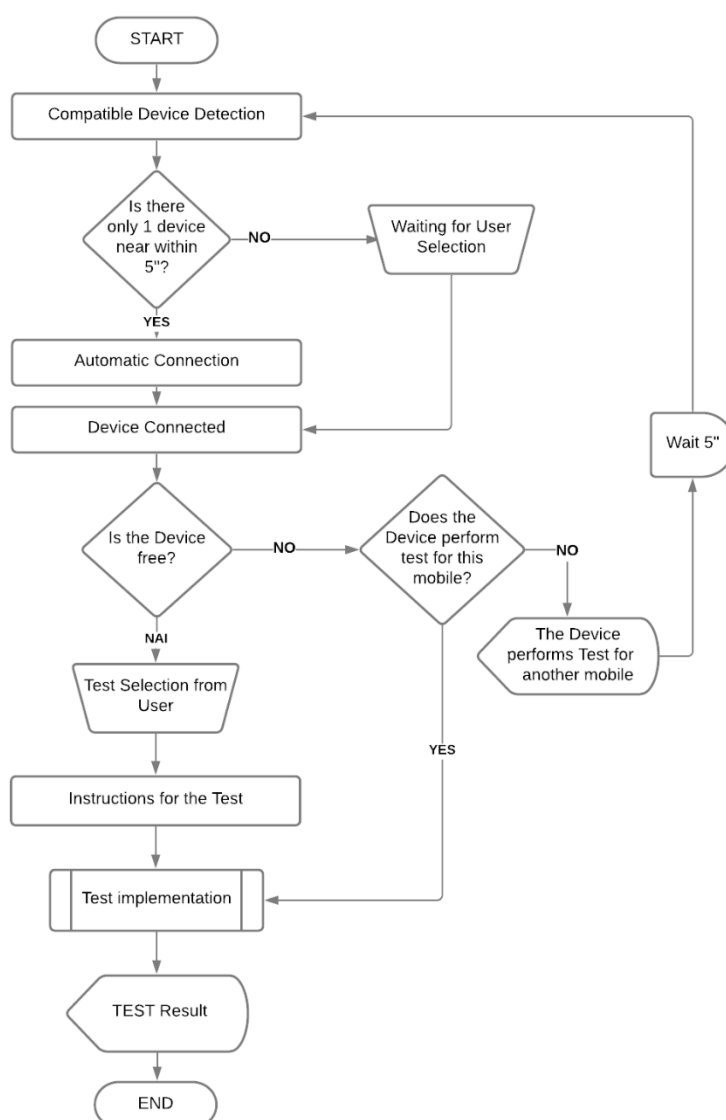


Σχήμα 25. Εφαρμογή BioPoC.

Στη νέα συσκευή BioPoC, η μέτρηση του χρόνου, η μέτρηση της ηλεκτρικής αντίστασης, η ανίχνευση της χαμηλής μπαταρίας και η επικοινωνία με την έξυπνη συσκευή πραγματοποιούνται μέσω Bluetooth Module (CC 2540). Η συσκευή αυτή, αντίθετα από την προηγούμενη, δεν περιλαμβάνει οθόνη για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, αλλά συνδέεται μέσω της εφαρμογής με έξυπνα κινητά τα οποία χρησιμοποιούν λογισμικό Android OS 5.1 ή νεότερο, και Bluetooth® v4.0 +LE. Το σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας της συσκευής και το εσωτερικό της παρουσιάζονται στο Σχήμα 26. Στο Σχήμα 27 παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής.



Σχήμα 26. Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας (blocking diagram) και το εσωτερικό της συσκευής.



Σχήμα 27. Διάγραμμα ροής.

3.3.7 Υπολογισμός του ρυθμού αποδόμησης των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA

Για τον υπολογισμό του ρυθμού αποδόμησης των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA, σε ποτήρι ζέσεως 10 mL προστέθηκαν 2 mL διαλύματος 15% w/v PMMA-co-PMAA (30-120 kg/mol) σε διαλύτη THF, και παρέμειναν 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να εξατμιστεί πλήρως ο διαλύτης. Η μεμβράνη που σχηματίστηκε

παραλήφθηκε με DDW, ξεπλύθηκε και παρέμεινε για 12 ώρες σε πυριαντήριο στους 45 °C. Στη συνέχεια, ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε σε 50 mL 0,1 M PB pH 6,0-8,5 για 60 λεπτά. Η μεμβράνη που παρέμεινε μετά τη διαδικασία αυτή, ξεπλύθηκε πολύ καλά με DDW και αφού στέγνωσε για 12 ώρες στους 45 °C, ζυγίστηκε ξανά. Από τη διαφορά στη μάζα υπολογίστηκε ο ρυθμός αποδόμησης των συμπολυμερών, ο οποίος εκφράζεται ως η απώλεια μάζας σε mg ως προς το χρόνο (1 λεπτό) και την αρχική μάζα σε g, για κάθε pH. Κάθε μέτρηση (σε κάθε pH) πραγματοποιήθηκε τρεις φορές και τα αποτελέσματα εκφράζονται με το μέσο όρο των μετρήσεων και την τυπική απόκλιση μεταξύ των τριών τιμών.

3.3.8 Πορεία εργασίας

Η επίδραση του αρχικού pH στον έμμεσο προσδιορισμό βιοδεικτών μέσω του προσδιορισμού της αμμωνίας εξετάστηκε στην προηγούμενη ενότητα. Για την εξάλειψη αυτής της επίδρασης στον προσδιορισμό της κρεατινίνης, προηγήθηκε ένα στάδιο αραίωσης και ρύθμισης του pH των δειγμάτων. Για την καλύτερη προσομοίωση της ρυθμιστικής χωρητικότητας των πραγματικών δειγμάτων ούρων, τα πρότυπα διαλύματα κρεατινίνης προετοιμάστηκαν σε διάλυμα τεχνητών ούρων AU. Για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν προσθέτοντας 30 μ L προτύπων διαλυμάτων κρεατινίνης σε AU ή δειγμάτων ούρων, αραιωμένα 1+1 v/v με DDW. Η αραίωση πραγματοποιήθηκε τόσο στα πραγματικά δείγματα όσο και στα πρότυπα διαλύματα κρεατινίνης, ώστε να παραμείνει σταθερή η επίδραση της μήτρας και να ρυθμιστεί η συγκέντρωση στο εύρος ανίχνευσης του βιοαισθητήρα. Το pH των προτύπων διαλυμάτων ή των πραγματικών δειγμάτων ρυθμίστηκε μετά την αραίωση στο 6,5. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε τέσσερις φορές, χρησιμοποιώντας νέο βιοαισθητήρα κάθε φορά. Τα δείγματα ούρων λήφθηκαν από υγιείς εθελοντές άντρες και γυναίκες σύμφωνα με τις οδηγίες της επιτροπής ηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

3.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

3.4.1 Χαρακτηρισμός των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA

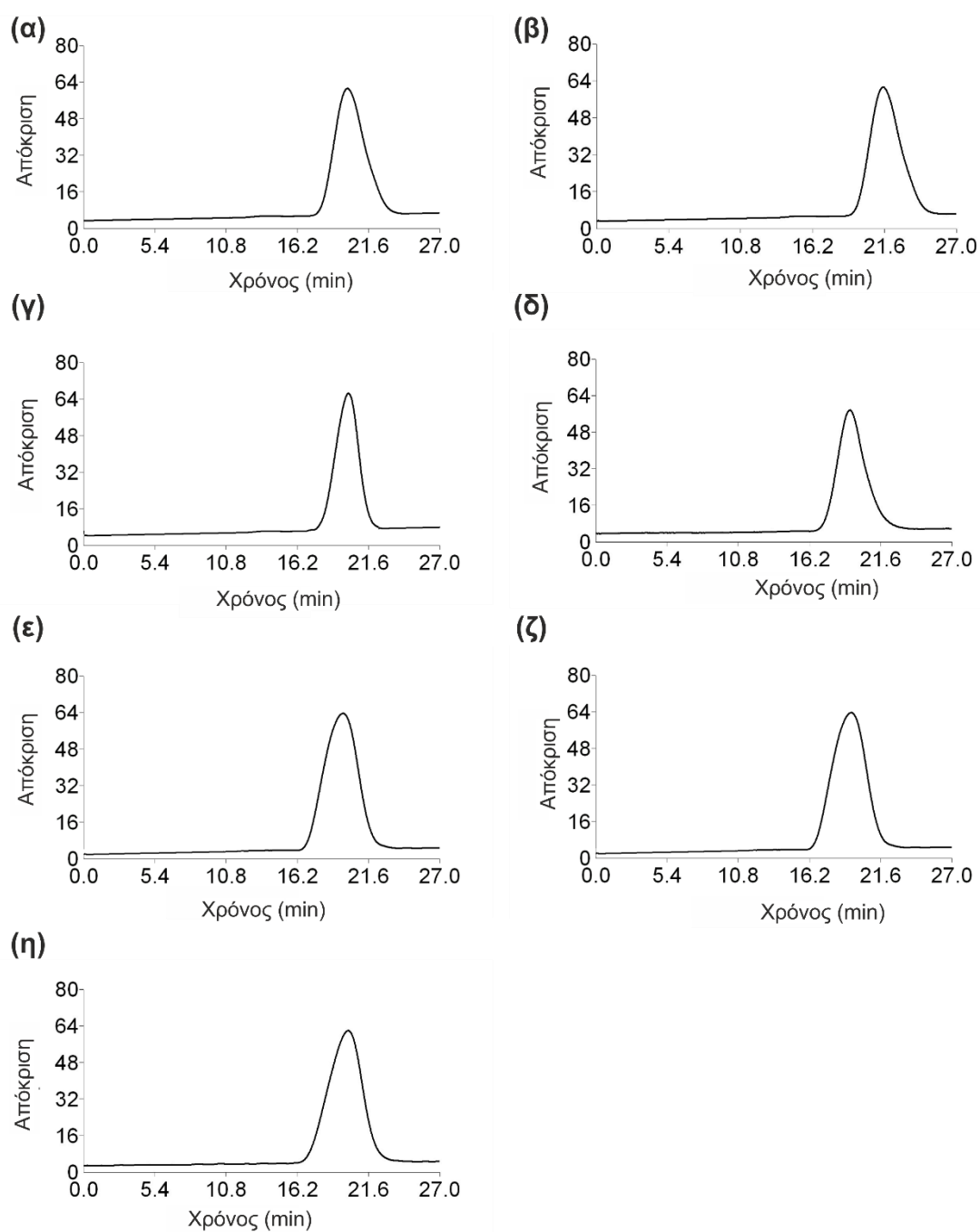
Το $\bar{M}_n$ και το $\mathcal{D}$ των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA_{x-y-z} που συντέθηκαν, εξετάστηκαν με την τεχνική SEC. Το μέσο μοριακό βάρος $\bar{M}_n$ δίνεται από την παρακάτω εξίσωση

$$\bar{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} = \frac{N_1 M_1 + N_2 M_2 + N_3 M_3 + \dots}{N_1 + N_2 + N_3 + \dots}$$

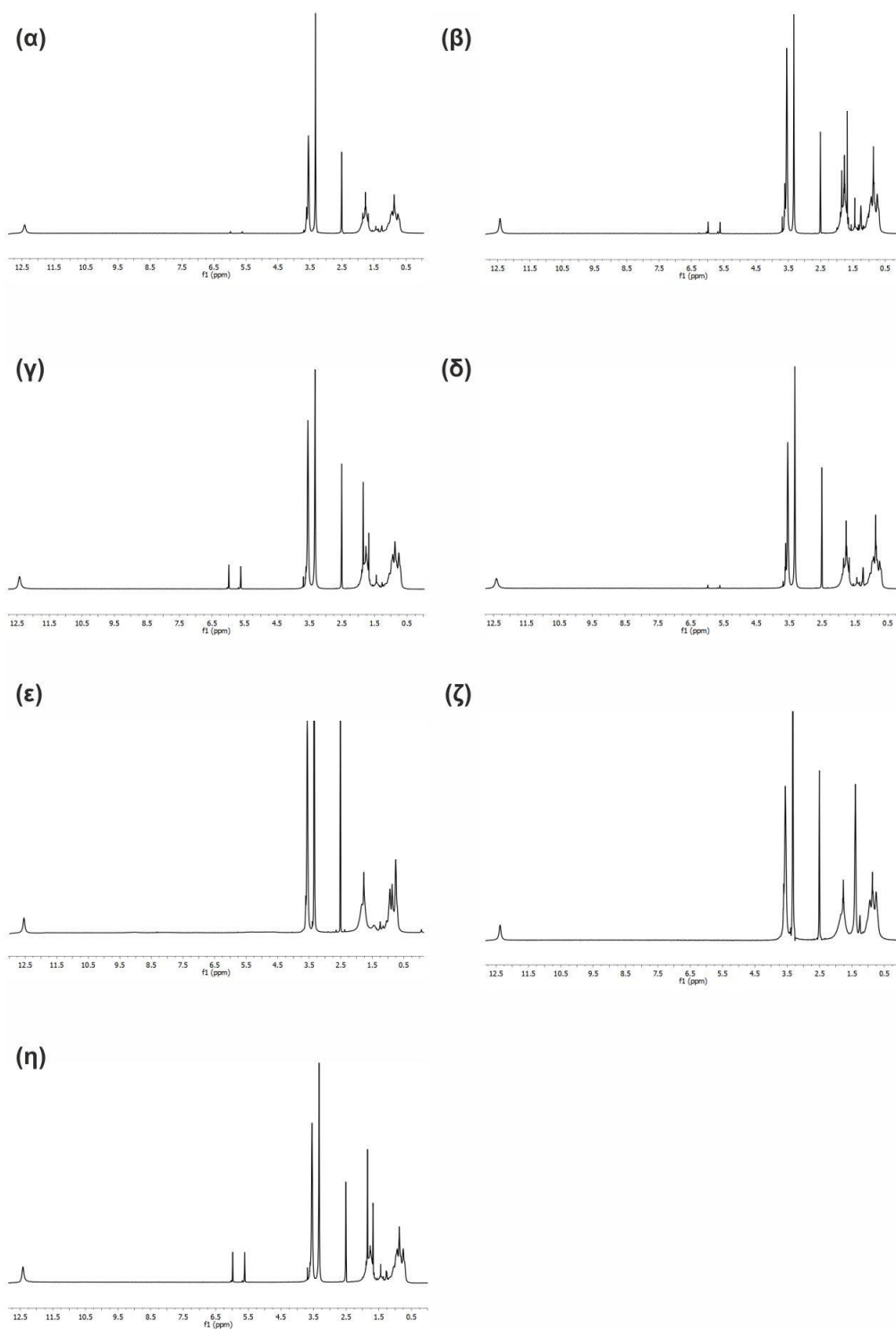
όπου N_i είναι ο αριθμός moles μακρομορίων i με μοριακό βάρος M_i .

Τα αποτελέσματα, τα οποία παρουσιάζονται στο **Σχήμα 28**, δείχνουν μικρή κατανομή των μοριακών βαρών ($\mathcal{D} < 1,6$), γεγονός που αποδεικνύει ότι τα συμπολυμερή αποτελούνται από μόρια ίδιου περίπου μοριακού βάρους. Η ομοιογένεια των συμπολυμερών συνεπάγεται το σχηματισμό ομοιογενών μεμβρανών, οι οποίες θα έχουν τον ίδιο αριθμό καρβοξυλομάδων κατά μήκος τους, και κατ' επέκταση θα υπάρχει επαναληψιμότητα στην απόκριση τους σε κάθε διάλυμα.

Η επιτυχής σύνθεση των συμπολυμερών εξετάστηκε επίσης με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$. Από τα αποτελέσματα των φασμάτων που παρουσιάζονται στο **Σχήμα 29**, υπολογίστηκε επίσης και το κλάσμα όγκου f για κάθε συμπολυμερές, εκφρασμένο ως προς το PMMA (f_{PMMA}). Η χαρακτηριστική μετατόπιση της κορυφής που αντιστοιχεί στα έξι πρωτόνια των μεθυλομάδων του PMMA παρουσιάζεται στα 1,95-3,75 ppm, ενώ η μετατόπιση των κορυφών στα 4,90-6,10 ppm οφείλεται στα δύο άτομα υδρογόνου του β άνθρακα του PMMA. Οι μετατοπίσεις στα 2,00 και 5,70 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια των μεθυλομάδων του PMAA. Οι μετατοπίσεις που οφείλονται στις υδροξυλομάδες του PMAA εμφανίζονται στα 12,2-12,6 ppm. Επίσης, από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ αποδεικνύεται ότι όσο μεγαλύτερο είναι το f_{PMMA} σε κάθε δείγμα, τόσο μεγαλύτερη είναι και η κορυφή στα 12,6 ppm. Τα δεδομένα από το μοριακό χαρακτηρισμό των συμπολυμερών με τις τεχνικές SEC και $^1\text{H-NMR}$ παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 5**.



Σχήμα 28. Χρωματογραφήματα αποκλεισμού μεγεθών (SEC) για τα συμπολυμερή (α) PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1}, (β) PMMA-co-PMAA_{30-2:1}, (γ) PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1}, (δ) PMMA-co-PMAA_{60-2:1}, (ε) PMMA-co-PMAA_{120-2,5:1}, (ζ) PMMA-co-PMAA_{120-3:1} και (η) PMMA-co-PMAA_{120-2:1}.

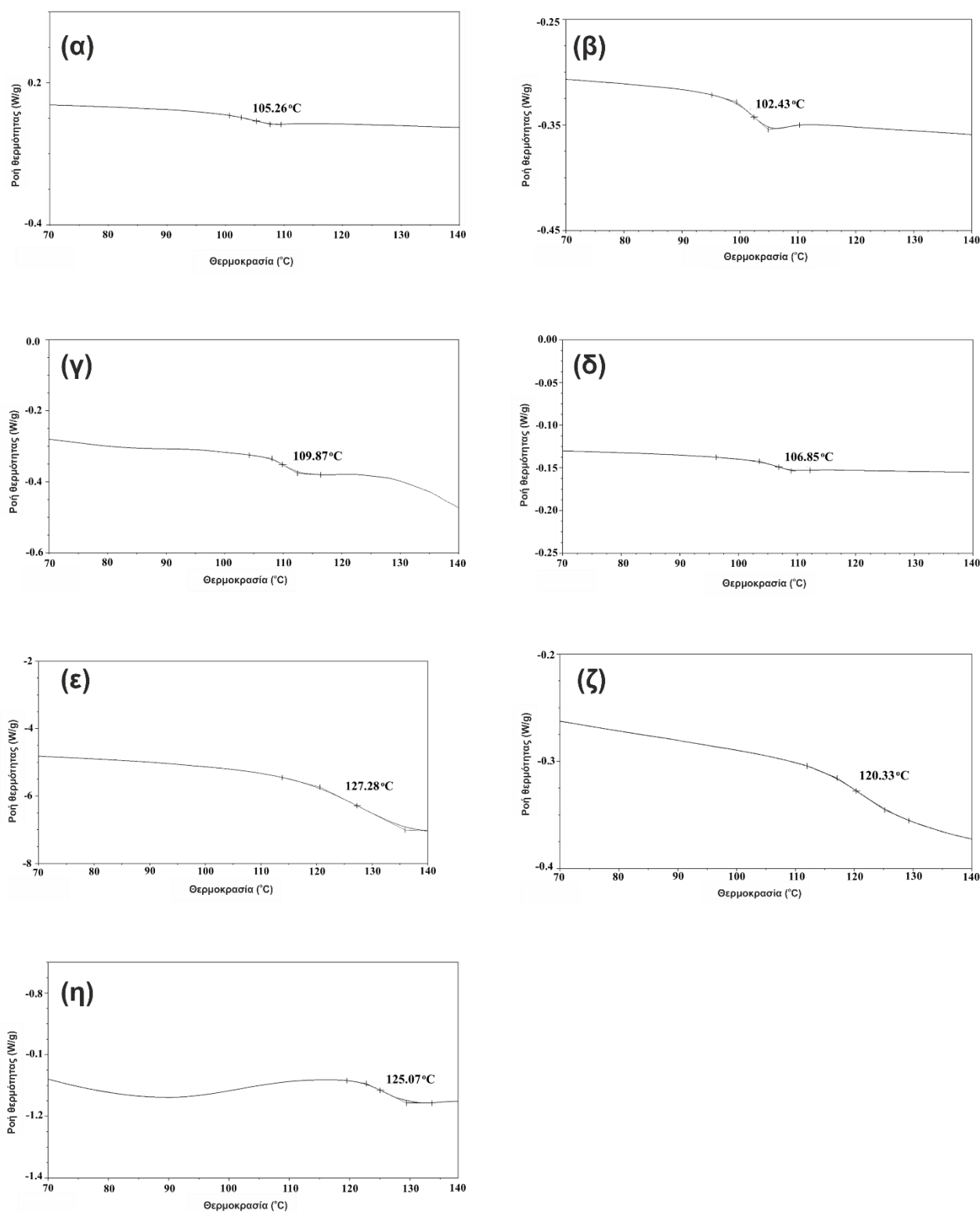


Σχήμα 29. Φάσματα ^1H -NMR για τα συμπολυμερή (α) PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1}, (β) PMMA-co-PMAA_{30-2:1}, (γ) PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1}, (δ) PMMA-co-PMAA_{60-2:1}, (ε) PMMA-co-PMAA_{120-2,5:1}, (ζ) PMMA-co-PMAA_{120-3:1} και (η) PMMA-co-PMAA_{120-2:1}.

Πίνακας 5. Μοριακός χαρακτηρισμός των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA.

Συμπολυμερές	$\bar{M}_n$ (kg/mol)	$\bar{D}$	f_{PMMA}
PMMA-co-PMAA _{120-2:1}	122	1,4	0,66
PMMA-co-PMAA _{120-2,5:1}	124	1,5	0,71
PMMA-co-PMAA _{120-3:1}	121	1,4	0,76
PMMA-co-PMAA _{60-2:1}	62	1,6	0,67
PMMA-co-PMAA _{60-2,5:1}	61	1,5	0,72
PMMA-co-PMAA _{30-2:1}	31	1,5	0,66
PMMA-co-PMAA _{30-2,5:1}	32	1,6	0,71

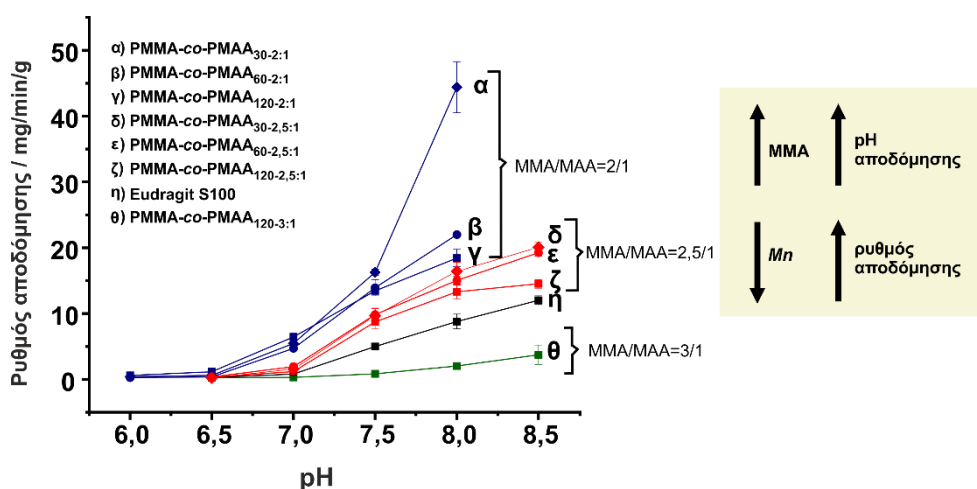
Οι μετρήσεις που λήφθηκαν με την τεχνική DSC παρουσιάζονται στο **Σχήμα 30**, και αποδεικνύουν μία μονή ενδόθερμη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης T_g για το κάθε εξεταζόμενο συμπολυμερές, η οποία βρίσκεται ανάμεσα στις T_g των ομοπολυμερών PMMA και PMAA. Λαμβάνοντας υπόψη τη χημική ανομοιοότητα μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων, εξαιτίας του τυχαίου χαρακτήρα των συμπολυμερών, η συμπεριφορά αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει μικροφασικός διαχωρισμός όταν τα συμπολυμερή μελετώνται σε μεγάλο όγκο. Επιπλέον, κανένα από τα συμπολυμερή δεν εμφάνισε μεταπτώσεις όσον αφορά το σημείο τήξης (T_m) και το σημείο κρυστάλλωσης (T_c), αποδεικνύοντας ότι τα συμπολυμερή είναι εξ ολοκλήρου άμορφα.



Σχήμα 30. Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC) για τα συμπολυμερή (α) PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1}, (β) PMMA-co-PMAA_{30-2:1}, (γ) PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1}, (δ) PMMA-co-PMAA_{60-2:1}, (ε) PMMA-co-PMAA_{120-2,5:1}, (ζ) PMMA-co-PMAA_{120-3:1} και (η) PMMA-co-PMAA_{120-2:1}.

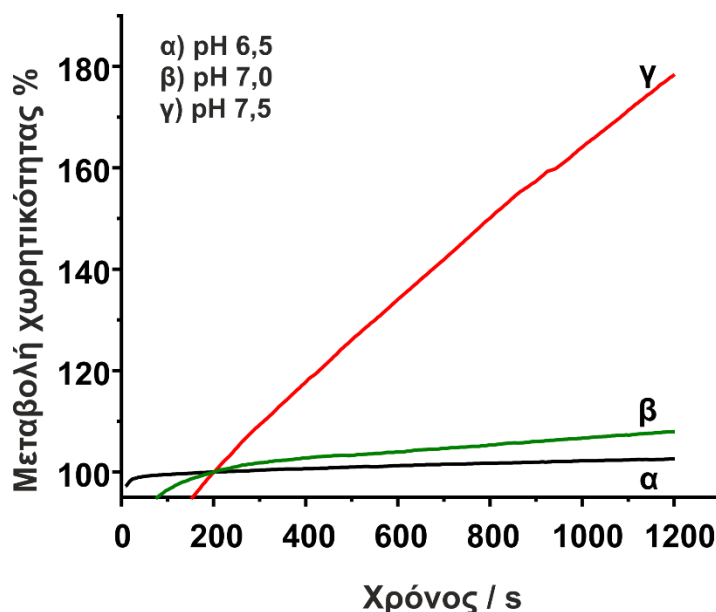
3.4.2 Ρυθμός αποδόμησης των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA σε διαφορετικά pH

Ο ρυθμός αποδόμησης των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA στα διαφορετικά pH παρουσιάζεται στο **Σχήμα 31**. Ως υλικό αναφοράς για το PMMA-co-PMAA_{120-2:1} χρησιμοποιήθηκε το συμπολυμερές Eudragit® S100, το οποίο έχει μοριακό βάρος κατά βάρος, M_w περίπου 125 kg/mol και ο λόγος των εστερομάδων (MMA) προς τις καρβοξυλομάδες (MAA) είναι 2:1¹²⁸. Από τα διάγραμμα στο Σχήμα 31 προκύπτουν δύο συμπεράσματα, i) για συμπολυμερή με την ίδια τιμή f_{PMMA} , η αύξηση του $\bar{M}_n$ έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού αποδόμησης όσο αυξάνεται το pH και ii) όσο αυξάνεται το f_{PMMA} , δηλαδή όσο αυξάνεται ο λόγος MMA/MAA, το pH στο οποίο ξεκινά η αποδόμηση μετατοπίζεται σε πιο αλκαλικές τιμές. Έτσι, τα συμπολυμερή με λόγο MMA/MAA περίπου 2:1, δηλαδή με f_{PMMA} περίπου 0,66, αποδομοούνται σε pH >6, τα συμπολυμερή με λόγο MMA/MAA 2,5:1, δηλαδή με f_{PMMA} περίπου 0,71, αποδομοούνται σε pH >6,5, ενώ, τέλος, τα συμπολυμερή με λόγο MMA/MAA 3:1, δηλαδή $f_{PMMA}=0,76$ αποδομοούνται σε pH >7. Μία σημαντική παρατήρηση στο διάγραμμα αυτό είναι ότι τα συμπολυμερή με λόγο MMA/MAA 2:1 και 2,5:1 έχουν σημαντικά μεγαλύτερο ρυθμό αποδόμησης σε σχέση με το Eudragit® S100. Μάλιστα το PMMA-co-PMAA_{120-2:1}, το συμπολυμερές δηλαδή που αντιστοιχεί στο Eudragit® S100, έχει τρεις φορές μεγαλύτερο ρυθμό αποδόμησης και η αποδόμηση του ξεκινά σε χαμηλότερο pH. Οποιαδήποτε διαφορά παρατηρείται μεταξύ των PMMA-co-PMAA_{120-2:1} και Eudragit® S100 οφείλεται στην τυχαία φάση των συμπολυμερών αυτών. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αποκλίσεων σε μικροσκοπική κλίμακα, και ως εκ τούτου κάθε συμπολυμερές έχει διαφορετικό ρυθμό αποδόμησης. Ο ρυθμός αποδόμησης, κυρίως σε εύρος pH κοντά σε αυτό στο οποίο ξεκινάει η αποδόμηση του συμπολυμερούς, καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ευαισθησία και το χρόνο απόκρισης της μεθόδου. Αυτό σημαίνει ότι όταν ο ρυθμός αποδόμησης είναι μεγαλύτερος, απαιτείται μικρότερη ποσότητα κρεατινίνης, και κατ' επέκταση και ενζυμικά παραγόμενης αμμωνίας για την αποδόμηση του συμπολυμερούς. Εναλλακτικά, για μία δεδομένη συγκέντρωση της κρεατινίνης, ο χρόνος απόκρισης του βιοαισθητήρα θα είναι μικρότερος, και το όριο ανίχνευσης μικρότερο.



Σχήμα 31. Ρυθμός αποδόμησης των διαφόρων συμπολυμερών.

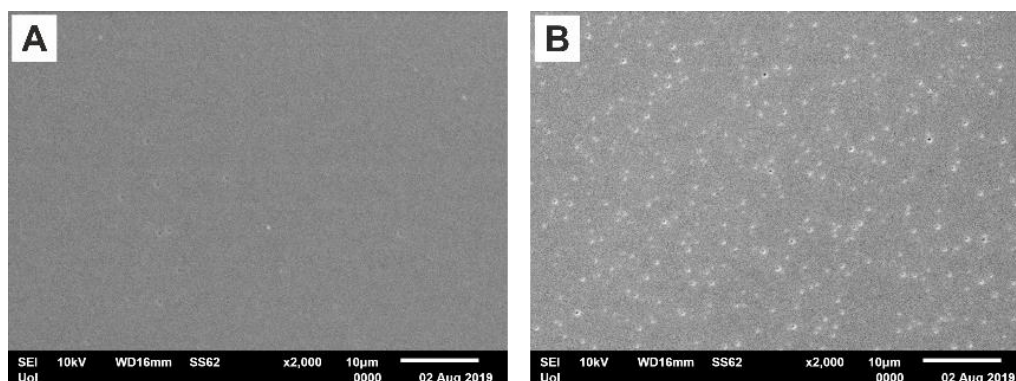
Μια πιο ακριβής μελέτη του ρυθμού αποδόμησης πραγματοποιήθηκε με την παρακολούθηση της μεταβολής της χωρητικότητας της διεπιφάνειας μεταξύ ενός ηλεκτροδίου και ενός λεπτού φιλμ του συμπολυμερούς PMMA-co-PMAA που εναποτίθεται πάνω στο ηλεκτρόδιο. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1} και PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1} σε αναλογία 9/1 w/w, σε διαλύτη 97/3 v/v IPA/DDW που περιέχει 35% w/w DBP (ως προς το στερεό συμπολυμερές). Ο συνδυασμός του συμπολυμερούς για αυτή τη μελέτη επιλέχθηκε λόγω της καλύτερης συμπεριφοράς που παρουσίασαν οι αντίστοιχες μεμβράνες ως προς το κριτήριο ZBR. Τα διαγράμματα χωρητικότητας (C)-χρόνου (t) παρουσιάζονται στο **Σχήμα 32** και τα αποτελέσματα συμφωνούν σε πολύ μεγάλο βαθμό με αυτά που παρουσιάζονται στο **Σχήμα 31**. Στο pH 6,5 το συμπολυμερές είναι σταθερό, ενώ από το pH 7 ξεκινάει η αποδόμηση και η χωρητικότητα μεταβάλλεται λόγω της αλλαγής στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Στο pH 7,5 η αποδόμηση πραγματοποιείται με μεγαλύτερο ρυθμό.



Σχήμα 32. Μελέτη σταθερότητας του μείγματος συμπολυμερών PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1} και PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1} σε αναλογία 9/1 w/w, με την τεχνική της Φασματοσκοπίας Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης.

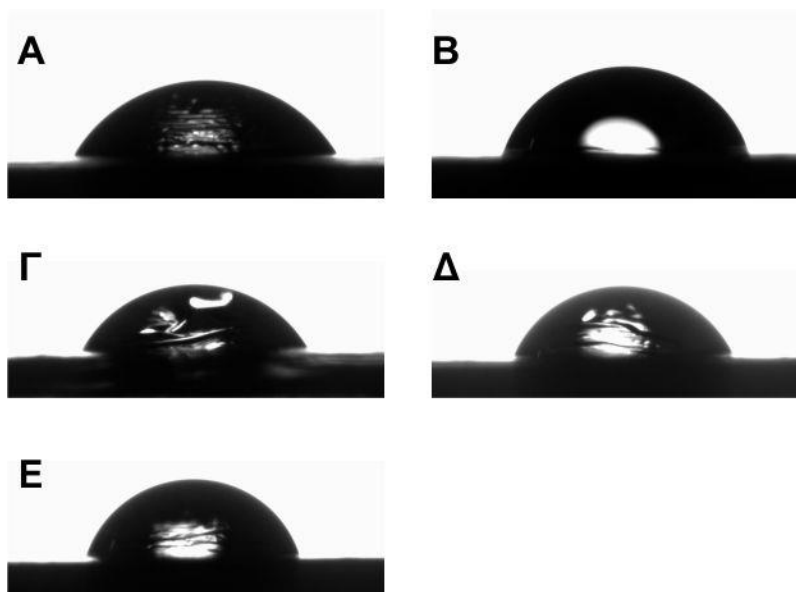
3.4.3 Εικόνες SEM και μετρήσεις γωνίας επαφής

Η μορφολογία των μεμβρανών που κατασκευάστηκαν από διάλυμα 4% w/v PMMA-co-PMAA_{120-2,5:1} σε διαλύτη 97/3 v/v IPA/DDW ή THF, εξετάστηκε με τη λήψη εικόνων SEM στα 10 kV (**Σχήμα 33**). Οι δύο διαλύτες IPA/DDW και THF επιλέχθηκαν επειδή σχηματίζουν διαυγή διαλύματα με το συμπολυμερές, έχουν αργό ρυθμό εξάτμισης και κυρίως δημιουργούν ομοιογενείς μεμβράνες, οι οποίες μπορούν εύκολα να αποκολληθούν από τη γυάλινη επιφάνεια. Στις εικόνες SEM φαίνεται η επίδραση του διαλύτη στη μορφολογία της μεμβράνης. Ο διαλύτης IPA/DDW δημιουργεί ομοιογενείς μεμβράνες χωρίς το σχηματισμό πόρων κατά την εξάτμισή του, αντίθετα με το THF που δημιουργεί μεγάλο πορώδες στην επιφάνεια της μεμβράνης, με ακανόνιστους πόρους, διαφορετικών μεγεθών, το οποίο καθιστά το διαλύτη αυτό ακατάλληλο για τη συγκεκριμένη εφαρμογή.



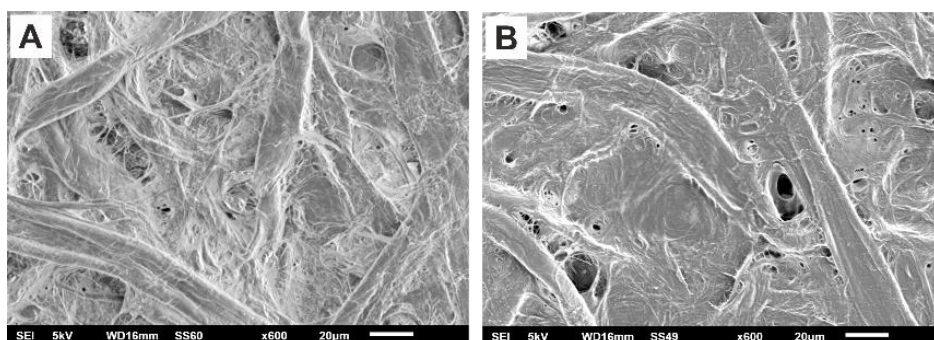
Σχήμα 33. Εικόνες SEM μεμβρανών του συμπολυμερούς PMMA-co-PMAA_{120-2,5:1} σε διαλύτη (Α) 97/3 v/v IPA/DDW και (Β) THF.

Η διαβρεξιμότητα της επιφάνειας της πολυμερικής μεμβράνης εξετάστηκε με μετρήσεις της γωνίας επαφής (**Σχήμα 34**). Οι μεμβράνες που εξετάστηκαν κατασκευάστηκαν από το συμπολυμερές PMMA-co-PMAA_{120-2,5:1} σε διαλύτες IPA/DDW και THF. Η γωνία επαφής μεταξύ των εξεταζόμενων μεμβρανών και μιας σταγόνας (6 µL) DDW βρέθηκε $59,6 \pm 3,9^\circ$ για τη μεμβράνη που παρασκευάστηκε σε διαλύτη IPA/DDW, και $74,6 \pm 3,9^\circ$ σε THF. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο τουλάχιστον τριών μετρήσεων. Η ίδια μελέτη πραγματοποιήθηκε σε μεμβράνες κατασκευασμένες σε διαλύτη IPA/DDW από συμπολυμερή με M_n 60 kg/mol και μείγμα 9/1 w/w 30/60 kg/mol, και οι τιμές βρέθηκαν $60,5 \pm 5,0^\circ$ and $61,4 \pm 4,3^\circ$, αντίστοιχα, αποδεικνύοντας ότι το $\bar{M}_n$ έχει ελάχιστη επίδραση στη γωνία επαφής. Αντίθετα, μεγάλη αύξηση της γωνίας επαφής παρατηρήθηκε όταν η μεμβράνη από το μείγμα 9/1 w/w 30/60 kg/mol περιείχε πλαστικοποιητή 35% DBP, όπου βρέθηκε $66,6 \pm 3,0^\circ$.



Σχήμα 34. Μέτρηση γωνίας επαφής των μεμβρανών του συμπολυμερούς (Α) PMMA-co-PMAA_{120-2,5:1} σε διαλύτη 97/3 v/v IPA/DDW, (Β) PMMA-co-PMAA_{120-2,5:1} σε διαλύτη THF, (Γ) PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1} σε διαλύτη 97/3 v/v IPA/DDW, (Δ) PMMA-co-PMAA_{30/60(9/1)-2,5:1} σε διαλύτη 97/3 v/v IPA/DDW και (Ε) PMMA-co-PMAA_{30/60(9/1)-2,5:1} σε διαλύτη 97/3 v/v IPA/DDW που περιέχει 35% w/w DBP.

Εικόνες SEM λήφθηκαν επιπλέον και σε χρωματογραφικά χαρτιά τροποποιημένα με 2 μ L διαλύματος 1% w/v PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1} σε διαλύτη 97/3 v/v IPA/DDW που περιέχει 35% w/w DBP (Σχήμα 35). Με την προσθήκη του συμπολυμερούς, καλύπτονται οι ίνες του χαρτιού δημιουργώντας μία πιο λεία επιφάνεια, ενώ καλύπτονται και οι πόροι μεταξύ των ινών μέσα από τους οποίους διέρχεται το δείγμα. Η προσθήκη του πλαστικοποιητή προσφέρει αυξημένη αντοχή στο σπάσιμο της μεμβράνης ή στη δημιουργία ρωγμών καθιστώντας έτσι πιο εύκολο το χειρισμό μιας «ελεύθερης» μεμβράνης, ενώ παράλληλα, συμβάλλει στην ομοιογένεια της επικάλυψης των χρωματογραφικών χαρτιών. Επιπλέον, οι υδρόφοβες ιδιότητες που προσθέτει ο πλαστικοποιητής στις μεμβράνες, οδηγούν σε βιοαισθητήρες με καλύτερη συμπεριφορά όσον αφορά στο κριτήριο ZBR.



Σχήμα 35. Εικόνες SEM σε χρωματογραφικό χαρτί (A) μη τροποποιημένο και (B) τροποποιημένο με συμπολυμερές PMMA-co-PMAA_{120-2,5:1} σε διαλύτη 97/3 v/v IPA/DDW και 35% w/w DBP.

3.4.4 Επιλογή συμπολυμερούς PMMA-co-PMAA

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, απαραίτητη προϋπόθεση για τη λήψη αξιόπιστων αναλυτικών τιμών είναι να πληρείται το κριτήριο ZBR για τα εξεταζόμενα διαλύματα προς ανάλυση. Το κριτήριο ZBR σημαίνει ότι το δείγμα, σε αυτή την περίπτωση τα ούρα, δεν διαπερνούν τη μη τροποποιημένη με ένζυμο μεμβράνη για ένα συγκεκριμένο χρόνο, ο οποίος για τις ανάγκες αυτού του πειράματος ορίστηκε στη 1 ώρα, ακριβώς όπως και στην προηγούμενη μελέτη για το βιοαισθητήρα της ουρίας. Στην περίπτωση που πληρείται το κριτήριο ZBR, οποιοδήποτε σήμα παράγεται από τη συσκευή μετά την προσθήκη του δείγματος στην ενζυμικά τροποποιημένη μεμβράνη, οφείλεται αποκλειστικά στην εκλεκτική αποδόμηση της μεμβράνης από την παραγόμενη αμμωνία κατά την υδρόλυση της κρεατινίνης. Έτσι, με την εκπλήρωση του κριτηρίου ZBR εξασφαλίζονται α) αξιόπιστα αποτελέσματα και β) εκλεκτικότητα της μεθόδου ως προς τα υπόλοιπα συστατικά της μήτρας του δείγματος.

Για την κατασκευή του βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης στα ούρα επιλέχθηκε το συμπολυμερές PMMA-co-PMAA_{x-2,5:1}. Η επιλογή έγινε λαμβάνοντας υπόψιν i) το pH στο οποίο ξεκινάει η αποδόμηση του συμπολυμερούς, ii) το ρυθμό αποδόμησης του και iii) την επίδραση του pH στην ενεργότητα του ενζύμου CD. Το pH στο οποίο ξεκινάει η αποδόμηση του πολυμερούς είναι ένα πολύ σημαντικό κριτήριο για την επιλογή του, διότι ακόμη και αν μία μεμβράνη πληροί το

κριτήριο ZBR σε κάθε μετρούμενο δείγμα, εάν το pH του δείγματος είναι μεγαλύτερο από το pH αποδόμησης του συμπολυμερούς, το τελευταίο θα αποδομηθεί ανεξάρτητα της συγκέντρωσης της κρεατινίνης που περιέχεται στο δείγμα. Σε αυτή την περίπτωση το σήμα θα οφείλεται στην αποδόμηση της μεμβράνης λόγω του αρχικού pH του δείγματος και όχι στην αύξηση του pH λόγω της ενζυμικά παραγόμενης αμμωνίας. Έτσι, με δεδομένο ότι το pH του δείγματος δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερο από το pH αποδόμησης της μεμβράνης PMMA-co-PMAA_{x-2,5:1}, ώστε να πληρείται το κριτήριο ZBR, το pH του δείγματος ρυθμίζεται σε κάθε περίπτωση 0,5 μονάδες λιγότερο από το pH αποδόμησης του συμπολυμερούς. Το δεύτερο κριτήριο με το οποίο επιλέχθηκε το συγκεκριμένο συμπολυμερές είναι ο ρυθμός αποδόμησης του. Σε ένα συγκεκριμένο εύρος pH, η κλίση της καμπύλης του ρυθμού αποδόμησης καθορίζει και την ποσότητα του συμπολυμερούς που θα διαλυθεί σε ορισμένο χρόνο. Ως προς αυτό το κριτήριο, το επιλεγμένο συμπολυμερές PMMA-co-PMAA_{x-2,5:1} παρουσιάζει μεγαλύτερη κλίση από το Eudragit® S100, που σημαίνει μεγαλύτερη ευαισθησία σε μικρότερες συγκεντρώσεις του αναλύτη. Το τρίτο κριτήριο, που είναι η ενζυμική ενεργότητα της δεϊμινάσης της κρεατινίνης, καθόρισε την επιλογή του συμπολυμερούς PMMA-co-PMAA_{x-2,5:1} έναντι του PMMA-co-PMAA_{x-2:1}. Σύμφωνα με την παραπάνω συζήτηση, έπρεπε να επιλεγεί το PMMA-co-PMAA_{x-2:1}, η καμπύλη του ρυθμού αποδόμησης του οποίου παρουσιάζει μεγαλύτερη κλίση. Το συμπολυμερές αυτό όμως, ξεκινά να αποδομείται σε pH >6,5, και σύμφωνα με το πρώτο κριτήριο, το pH του δείγματος έπρεπε να ρυθμιστεί στο 6, ώστε να εξασφαλίζεται το κριτήριο ZBR. Η δεϊμινάση της κρεατινίνης παρουσιάζει τη βέλτιστη ενεργότητα στο pH 8,5, ενώ στο pH 6,5 η ενεργότητα μειώνεται στο 50% και στο pH 6 είναι μικρότερη από 20% της αρχικής¹²⁹. Δεδομένου λοιπόν ότι το συμπολυμερές PMMA-co-PMAA_{x-2:1} αποδομείται σε pH >6, ενώ το PMMA-co-PMAA_{x-2,5:1} σε pH >6,5, και η ενεργότητα του ενζύμου στο pH 6,5 είναι σημαντικά μεγαλύτερη από το pH 6, επιλέγεται το συμπολυμερές PMMA-co-PMAA_{x-2,5:1} ως βέλτιστο για την εφαρμογή αυτή.

3.4.5 Βιοαισθητήρες κατασκευασμένοι με μεμβράνες PMMA-co-PMAA

Η κατασκευή του βιοαισθητήρα πραγματοποιήθηκε με μεμβράνες διαλύματος συμπολυμερών 4% w/v PMMA-co-PMAA_{x-2,5:1} σε IPA/DDW με πάχος υγρού υμενίου

3 και 4 mil. Για την απόκριση του βιοαισθητήρα στις συγκεντρώσεις της κρεατινίνης στα ούρα, απαιτείται μία αρκετά πιο λεπτή μεμβράνη από αυτή με την οποία κατασκευάστηκε ο βιοαισθητήρας της ουρίας (διάλυμα συμπολυμερούς 15% w/v, πάχος υμενίου 8 mil), δεδομένου ότι η συγκέντρωση της κρεατινίνης (4,4 με 18 mM)¹³⁰ είναι σχεδόν δέκα φορές μικρότερη από αυτή της ουρίας (150 με 388 mM)¹⁰⁴. Επομένως, οι μελέτες επικεντρώθηκαν στην κατασκευή ενός πιο ευαίσθητου βιοαισθητήρα με μεμβράνες κατασκευασμένες από αραιά διαλύματα συμπολυμερούς και μικρό πάχος. Δοκιμάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί μεταξύ του πάχους της μεμβράνης και της συγκέντρωσης του διαλύματος συμπολυμερών, με το συνδυασμό 4% w/v PMMA-co-PMAA_{x-2,5:1} και πάχος 3 ή 4 mil, να δείχνει πιο κατάλληλος για τη συγκεκριμένη εφαρμογή. Διαλύματα μικρότερης συγκέντρωσης απαιτούν τουλάχιστον διπλάσιο πάχος υμενίου ώστε η προκύπτουσα μεμβράνη να έχει την απαιτούμενη μηχανική αντοχή, ενώ για διάλυμα συγκέντρωσης 4% w/v, τα 3 mil είναι το μικρότερο πάχος υμενίου που μπορεί να σχηματίσει μεμβράνη. Ένας ακόμη περιορισμός στο σχηματισμό «ελεύθερων» μεμβρανών είναι και το μοριακό βάρος των συμπολυμερών. Κάτω από ένα κρίσιμο μοριακό βάρος, οι μεμβράνες δεν έχουν την απαιτούμενη μηχανική αντοχή. Τα συμπολυμερή PMMA-co-PMAA_{120-2,5:1} και PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1} μπορούν να σχηματίσουν μεμβράνες με αρχικό πάχος υμενίου τουλάχιστον 3 mil, αυτό όμως δεν συμβαίνει και για το συμπολυμερές PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1}. Για να είναι δυνατός ο σχηματισμός μεμβράνης με αυτό το συμπολυμερές, παρασκευάζεται ένα μείγμα των συμπολυμερών PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1} και PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1} σε αναλογία 9/1 w/w. Αυτό το μικρό ποσοστό (10%) του συμπολυμερούς με $\bar{M}_n$ 60 kg/mol στο διάλυμα του συμπολυμερούς με $\bar{M}_n$ 30 kg/mol, αυξάνει τη μηχανική αντοχή της μεμβράνης που κατασκευάζεται.

Τα πειράματα για το κριτήριο ZBR πραγματοποιήθηκαν με δύο τυχαία δείγματα ούρων αραιωμένα 1+1 v/v με DDW και ρύθμιση του pH τους στις τιμές 6,5 ή 7. Η ρύθμιση του pH στο 6,5 πραγματοποιήθηκε με βάση το pH στο οποίο ξεκινάει η αποδόμηση του συμπολυμερούς, ενώ εξετάστηκε και το pH 7 όπου η ενεργότητα του ενζύμου είναι μεγαλύτερη. Αναφέρεται ότι τα δύο τυχαία δείγματα διαφέρουν ως προς την πυκνότητα τους, τουλάχιστον όπως προκύπτει από την οπτική παρατήρηση αυτών. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**, προκύπτει ότι η διαπερατότητα της μεμβράνης επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη σύσταση των

Πειραματικό μέρος

ούρων. Όσον αφορά τις άλλες παραμέτρους, το $\bar{M}_n$ των συμπολυμερών είχε ελάχιστη επίδραση στο ZBR. Συγκρίνοντας τις μεμβράνες με διαφορετικά $\bar{M}_n$, 120 kg/mol, 60 kg/mol και μείγμα 9/1 w/w 30/60 kg/mol, καλύτερα αποτελέσματα ως προς το ZBR παρουσίασε το τελευταίο. Αυτό οφείλεται στους μικρότερους πόρους που σχηματίζονται στη μεμβράνη όταν οι μοριακές αλυσίδες του συμπολυμερούς έχουν μικρότερο μέγεθος. Μία ελάχιστα βελτιωμένη απόκριση παρατηρήθηκε στις μεμβράνες που περιέχουν πλαστικοποιητή, λόγω της υδρόφοβης ιδιότητας που προσφέρει στο συμπολυμερές, χωρίς, ωστόσο, να δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν όταν το pH του δείγματος ρυθμίστηκε στο 6,5 αντί για 7, το οποίο εξηγείται από το προφίλ της αποδόμησης των συμπολυμερών ως προς το pH, που μελετήθηκε προηγουμένως.

Πίνακας 6. Μελέτη του κριτηρίου ZBR σε διάφορες μεμβράνες και δείγματα ούρων.

Πάχος υγρού υμενίου, 4 mil					
$\bar{M}_n$ (kg/mol)	Πάχος μεμβράνης (μm)	Πλαστικοποιητής (35% w/w ως προς το πολυμερές)	pH	Αριθμός μεμβρανών που πληρούν το ZBR (δοκιμάστηκαν 20)	
				Δείγμα 1	Δείγμα 2
120	$2,40 \pm 0,18$	-	7	0/20	16/20
60	$2,14 \pm 0,11$	-	7	0/20	16/20
30/60 (9/1 w/w)	$2,14 \pm 0,13$	-	7	2/20	18/20
30/60 (9/1 w/w)	$2,41 \pm 0,12$	DBP	7	4/20	20/20
30/60 (9:1 w/w)		DBP	6,5	10/20	20/20
Πάχος υγρού υμενίου, 3 mil					
30/60 (9/1 w/w)	$2,26 \pm 0,14$	DBP	7	2/20	14/20
30/60 (9/1 w/w)		DBP	6,5	12/20	16/20

Η μελέτη για το κριτήριο ZBR πραγματοποιήθηκε επίσης σε μεμβράνες που παρασκευάστηκαν από διάλυμα 4% w/v PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1} σε διάφορους

διαλύτες, όπως THF, THF/DDW (v/v 99/1 και 98/2), THF/DDW/DBP (99/1 v/v με πλαστικοποιητή 35% w/w ως προς το στερεό συμπολυμερές), και IPA/DDW (99/1, 98/2, 90/10, 80/20 v/v). Επίσης, μεμβράνες πάχους 4 mil οι οποίες παρασκευάστηκαν από το μείγμα συμπολυμερών 30/60 kg/mol (9/1 w/w) σε 97/3 v/v IPA/DDW αξιολογήθηκαν παρουσία άλλων πλαστικοποιητών, με σκοπό την αύξηση της υδροφοβικότητας της μεμβράνης, όπως DBP (50% w/w), διοκτυλος φθαλικός εστέρας (50% w/w) και διαιθυλο φθαλικός εστέρας (35% w/w). Ωστόσο, καμία από αυτές τις μεμβράνες δεν πληροί το κριτήριο ZBR απόλυτα. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασε η μεμβράνη 4% w/v PMMA-co-PMAA_{30/60(9/1)-2,5:1} με 35% w/w DBP σε δείγμα με pH 6,5. Για καλύτερα αποτελέσματα, όπου όλοι οι βιοαισθητήρες θα πληρούν το κριτήριο ZBR, είναι απαραίτητη η αύξηση της συγκέντρωσης των συμπολυμερών στο διάλυμα κατασκευής της μεμβράνης από 4% σε 6-8% w/v. Με τα διαλύματα συγκέντρωσης 4% w/v, τα ιδανικά αποτελέσματα επιτεύχθηκαν όταν το πάχος του υγρού υμενίου κατά την παρασκευή της μεμβράνης αυξήθηκε σε 8 mil, το οποίο αντιστοιχεί σε πάχος μεμβράνης $4,1 \pm 0,2$ μm. Στην περίπτωση αυτή όμως οι βιοαισθητήρες έχουν όριο ανίχνευσης 8 mM κρεατινίνης, συγκέντρωση αρκετά μεγαλύτερη από το ελάχιστο φυσιολογικό όριο της κρεατινίνης στα ούρα. Συνεπώς, το συμπέρασμα αυτής της μελέτης είναι ότι δεν είναι δυνατό να βρεθεί μία «ελεύθερη» μεμβράνη που να ικανοποιεί ταυτόχρονα τη συνθήκη ZBR και την ανίχνευση συγκεντρώσεων κρεατινίνης στο εύρος περίπου 4-18 mM. Η μεμβράνη 4% w/v PMMA-co-PMAA_{30/60(9/1)-2,5:1} με 35% w/w DBP, έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς τις υπόλοιπες, χωρίς ωστόσο αυτά να είναι ικανοποιητικά για την ανάπτυξη λειτουργικών βιοαισθητήρων.

3.4.6 Βιοαισθητήρες κατασκευασμένοι με τροποποιημένα με PMMA-co-PMAA χρωματογραφικά χαρτιά

Για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από τους βιοαισθητήρες με τις «ελεύθερες» μεμβράνες των συμπολυμερών και, κυρίως, όσον αφορά το κριτήριο ZBR, προχωρήσαμε στο σχεδιασμό ενός νέου βιοαισθητήρα, ο οποίος κατασκευάστηκε με χρωματογραφικό χαρτί τροποποιημένο με το συμπολυμερές. Αρχικά, το χαρτί τροποποιήθηκε με εκτύπωση ink-jet, με μελάνι κεριού, ώστε να

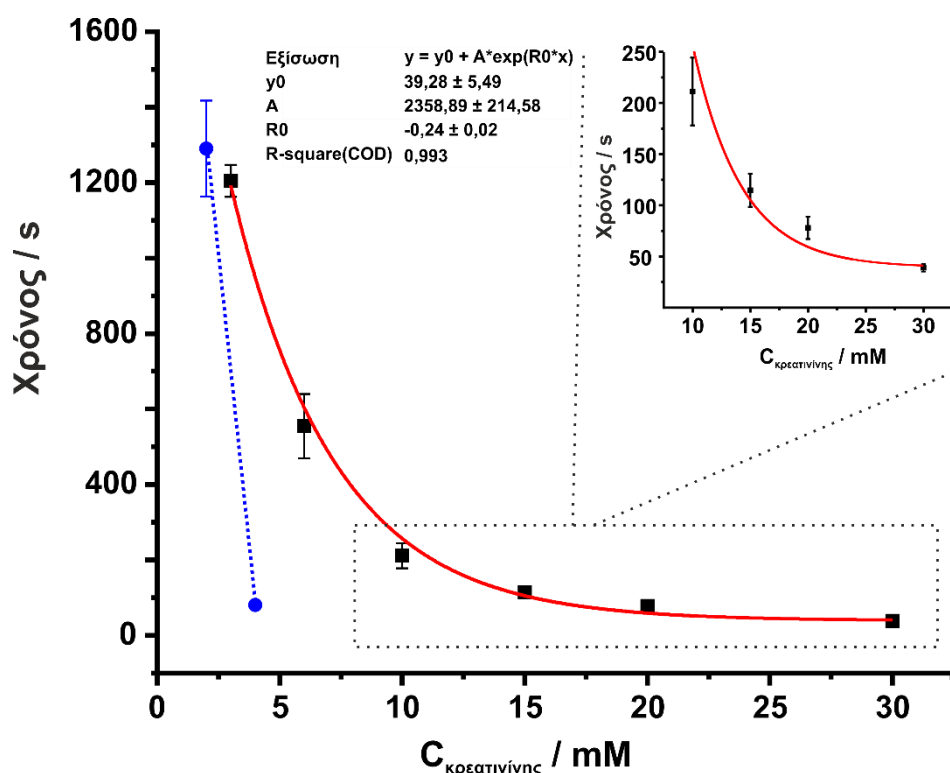
αποτρέπεται η οριζόντια διάχυση του υγρού δείγματος διαμέσου των ινών (Σχήμα 17).

Οι μελέτες για το κριτήριο ZBR πραγματοποιήθηκαν σε τροποποιημένα με το συμπολυμερές χαρτιά και δείγμα ούρων αραιωμένο με DDW (1+1 v/v) και ρύθμιση του pH στην τιμή 6,5, όπως έγινε και στην περίπτωση των μεμβρανών. Το συμπολυμερές που επιλέχθηκε και σε αυτή την περίπτωση ήταν το PMMA-co-PMAA_{x-2,5:1} με $\bar{M}_n$ 120, 60 και 30 kg/mol. Στη μελέτη των τροποποιημένων χαρτιών χρησιμοποιήθηκε το PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1} χωρίς να απαιτείται η παρασκευή μείγματος με το PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1}, το οποίο είχε ως μόνο σκοπό το σχηματισμό μεμβράνης. 2 mL διαλύματος PMMA-co-PMAA_{x-2,5:1} με συγκεντρώσεις 0,25, 0,5, 1, 2 και 3% w/v σε διαλύτη 97/3 v/v IPA/DDW που περιέχει 35% w/w DBP, προστέθηκαν στα χρωματογραφικά χαρτιά και κατασκευάστηκε ο βιοαισθητήρας. Σε συγκεντρώσεις PMMA-co-PMAA_{x-2,5:1} μεγαλύτερες ή ίσες του 0,5% w/v, όλοι οι εξεταζόμενοι βιοαισθητήρες ικανοποίησαν το κριτήριο ZBR. Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι πολύ μικρότερες από αυτή που απαιτείται για την κατασκευή των μεμβρανών, προσφέροντας έτσι στους βιοαισθητήρες μεγαλύτερη ευαισθησία. Τελικά, επιλέχθηκε το συμπολυμερές με $\bar{M}_n$ 30 kg/mol λαμβάνοντας υπόψιν το μεγαλύτερο ρυθμό αποδόμησης του, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 31.

Για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης στα ούρα, το χρωματογραφικό χαρτί με PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1} τροποποιήθηκε με το ένζυμο CD, το οποίο ακινητοποιήθηκε στο επάνω μέρος του χαρτιού με φυσική προσρόφηση. Η ιδανική ποσότητα του ενζύμου επιλέχθηκε μετρώντας το χρόνο που χρειάζεται ο βιοαισθητήρας με 1% w/v PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1} για τον προσδιορισμό 3 mM κρεατινίνης σε διαλύματα τεχνητών ούρων αραιωμένα 1+1 v/v με DDW pH 6,5. Οι συγκεντρώσεις ενζύμου που δοκιμάστηκαν ήταν 1, 2, 3 και 4 U CD. Η μεγαλύτερη απόκριση, δηλαδή ο μικρότερος χρόνος ανάλυσης, παρατηρήθηκε με τα 2 U CD.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι βιοαισθητήρες που κατασκευάστηκαν με διαλύματα PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1} ως προς το εύρος συγκεντρώσεων στο οποίο αποκρίνονται, χρησιμοποιώντας ως πρότυπα δείγματα, διαλύματα τεχνητών ούρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις κρεατινίνης, αραιωμένα 1 + 1 v/v με DDW και pH 6,5. Οι βιοαισθητήρες κατασκευάστηκαν από διαλύματα συγκέντρωσης 0,5 και 1% σε 97/3 v/v IPA/DDW και 35% w/w DBP, και τροποποιήθηκαν με 2 U CD. Οι

βιοαισθητήρες με συγκέντρωση συμπολυμερούς 1% αποκρίνονται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων κρεατινίνης 3-30 mM (οι τιμές αναφέρονται στις αρχικές συγκεντρώσεις κρεατινίνης στα διαλύματα τεχνητών ούρων, πριν την αραίωση), το οποίο καλύπτει επαρκώς το φυσιολογικό εύρος κρεατινίνης στα ούρα (4,4-18 mM). Οι βιοαισθητήρες με συγκέντρωση συμπολυμερούς 0,5% αποκρίνονται σε ένα πολύ μικρό εύρος συγκεντρώσεων κρεατινίνης, το οποίο φτάνει μόλις τα 4 mM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Σχήμα 36** και οι αναλυτικές μετρήσεις στον **Πίνακα 7**.



Σχήμα 36. Απόκριση βιοαισθητήρων τροποποιημένων με (διακεκομμένη γραμμή) 0,5% και (συνεχόμενη γραμμή) 1% w/v PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1} σε 97/3 v/v IPA/DDW/DBP και 2 U CD σε διαλύματα τεχνητών ούρων, αραιωμένα 1 + 1 v/v με DDW που περιέχουν αρχικές συγκεντρώσεις κρεατινίνης 3-30 mM.

Πίνακας 7. Οι χρόνοι απόκρισης των βιοαισθητήρων με 1% w/v PMMA-co-PMAA_{30-2,5:1} σε 97/3 v/v IPA/DDW/DBP και 2 U CD, σε διαλύματα τεχνητών ούρων, αραιωμένα 1 + 1 v/v με DDW. MO: μέσος όρος, SD: τυπική απόκλιση, RSD: σχετική τυπική απόκλιση.

C _{κρεατινίνης} (Mm)	Μετρήσεις (χρόνος / s)				MO± SD (n=4)	RSD (%)
	t1	t2	t3	t4		
3	1147	1225	1202	1244	1205±42	3,5
6	625	541	440	613	555±85	15,3
10	187	191	208	259	211±33	15,6
15	123	127	91	118	115±16	13,9
20	75	77	67	93	78±11	14,1
30	35	39	38	44	39±4	10,2

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, σημαντική παράμετρος στη λειτουργία των βιοαισθητήρων αποτελεί το μέσο στο οποίο θα παρασκευαστούν τα πρότυπα διαλύματα για τη βαθμονόμηση της συσκευής. Η επιλογή διαλύματος τεχνητών ούρων, έναντι ενός κοινού ρυθμιστικού διαλύματος, για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων, στοχεύει στην καλύτερη προσομοίωση της ιοντικής ισχύς και της ρυθμιστικής χωρητικότητας των πραγματικών δειγμάτων. Με την εφαρμογή της εκθετικής εξίσωσης που εξάγεται από την καμπύλη του Σχήματος 36, ο προτεινόμενος βιοαισθητήρας χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης σε δείγματα ούρων αραιωμένα 1 + 1 v/v με DDW και pH 6,5. Τα αποτελέσματα του βιοαισθητήρα συγκρίθηκαν με εκείνα που λήφθηκαν με τη μέθοδο αναφοράς που χρησιμοποιείται στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, και το σχετικό σφάλμα βρέθηκε <7,1%, το οποίο είναι απόλυτα ικανοποιητικό. Αναλυτικά τα αποτελέσματα των δειγμάτων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8** και αποδεικνύουν ότι η προτεινόμενη μέθοδος είναι αξιόπιστη.

Η μελέτη της σταθερότητας του βιοαισθητήρα έδειξε ότι κατά την αποθήκευση του στους 4 °C, το ένζυμο διατηρεί την ενεργότητα στο 90% της αρχικής για τουλάχιστον δύο μήνες.

Η αναγκαιότητα της συγκεκριμένη ανάλυσης σε πραγματικά δείγματα ούρων, το εξαιρετικά χαμηλό κόστος του βιοαισθητήρα, το χαμηλό κόστος κατασκευής της συσκευής και η απλότητα στην εφαρμογή της μεθόδου αποτελούν σημαντικά πλεονεκτήματα και συνεισφέρουν καθοριστικά προς τη δημιουργία αναλυτικών συσκευών για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης σε αναλύσεις πεδίου σύμφωνα με τις προδιαγραφές ASSURED του ΠΟΥ. Η μόνη παρέμβαση που απαιτείται από τον τελικό χρήστη για την εφαρμογή αυτή, είναι η ρύθμιση του pH, που γενικά θεωρείται σχετικά εύκολη.

Εναλλακτικά, προκειμένου να αποφύγουμε τη ρύθμιση του αρχικού pH του δείγματος, θα μπορούσαμε να δουλέψουμε με μια πολυπαραμετρική καμπύλη βαθμονόμηση χρησιμοποιώντας δύο παραμέτρους: το χρόνο αποδόμησης του πολυμερούς και το pH. Μια τέτοια προσέγγιση παρουσιάστηκε στη εργασία των Gaddes et al.¹²⁵, όμως το σφάλμα των μετρήσεων ήταν πολύ μεγάλο. Σημειώνεται ότι στη συγκεκριμένη εργασία δε δίνονται λεπτομέρειες για τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την κατασκευή της πολυπαραμετρικής καμπύλης βαθμονόμησης ώστε να εκτιμηθούν ή να διορθωθούν κάποιες παράμετροι που ενδεχομένως θα οδηγούσαν σε πιο αξιόπιστα αναλυτικά δεδομένα.

Πίνακας 8. Απόκριση βιοαισθητήρων κρεατινίνης σε πραγματικά δείγματα ούρων. ΜΟ: μέσος όρος, R.E.: σχετικό σφάλμα.

Δείγμα ούρων	Χρόνος απόκρισης (ΜΟ σε s)	BioPoC (mM)	Μέθοδος αναφοράς (mM)	R.E. (%)
1	177±8	11,91±0,26	12,82	-7,06
2	54±7	21,64±1,97	21,30	1,59
3	79±9	17,19±0,99	16,27	5,69

3.5 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την ανάπτυξη ενός πολυλειτουργικού βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης σε ούρα, που βασίζεται σε υποστρώματα χαρτιού τροποποιημένα με συμπολυμερή PMMA-co-PMAA και το ένζυμο δεϊμινάση της κρεατινίνης με απόκριση στο pH. Ο βιοαισθητήρας σχεδιάστηκε με τρεις κατάλληλα διευθετημένες αγωγίμες ταινίες αλουμινίου, ώστε να σχηματίζει μία συνδεσμολογία που να μπορεί να προσαρμοστεί σε μία βάση κάρτας SIM. Η τελική συσκευή τύπου SIM συνδέεται ασύρματα με ένα έξυπνο κινητό και προσφέρει α) μηδενική παρεμπόδιση από τα συστατικά της μήτρας του δείγματος και υψηλή αντοχή σε φαινόμενα στόμωσης του βιοαισθητήρα από βιομόρια που περιέχονται σε βιολογικά υγρά, β) ελάχιστο κόστος κατασκευής και ανάλυσης, και γ) ευκολία στη χρήση και εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα ούρων.

Μία ποικιλία από αποκρινόμενα στο pH συμπολυμερή PMMA-co-PMAA, με διάφορα μοριακά βάρη κατά αριθμό και διαφορετικούς λόγους μεταξύ των επιμέρους μονομερών, συντέθηκαν μέσω πολυμερισμού ελευθέρων ριζών. Τα νέα αυτά συμπολυμερή έχουν διαφορετικές ιδιότητες όσον αφορά την αποδόμηση τους σε διαφορετικές τιμές pH, επιτρέποντας έτσι το σχεδιασμό και τη βέλτιστη επιλογή των συμπολυμερών, ως προς την ευαισθησία και το χρόνο απόκρισης, για κάθε ανάλυση.

Η προτεινόμενη τεχνολογία δεν απαιτεί πολύπλοκα στάδια προκατεργασίας του δείγματος, αποφεύγοντας έτσι τους μεγάλους χρόνους ανάλυσης που αναφέρονται σε αντίστοιχες μεθόδους με ηλεκτροχημικούς¹³¹, ποτενσιομετρικούς¹³² ή θερμιδομετρικούς¹²⁵ ανιχνευτές. Η έξυπνη διάταξη του βιοαισθητήρα τύπου SIM, η οποία παρουσιάστηκε στη βιβλιογραφία για πρώτη φορά, συνδυάζει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως υψηλό βαθμό ολοκλήρωσης, ενσωματωμένο μικροφρεάτιο για το δείγμα, αυτόματη λειτουργία για τη μέτρηση του χρόνου αποδόμησης της μεμβράνης, εύκολη προσαρμογή σε ηλεκτρονικές διατάξεις που συνολικά διευκολύνουν τη χρήση του βιοαισθητήρα από μη εκπαιδευμένο προσωπικό και μειώνουν το κόστος κατασκευής της διάταξης και του βιοαισθητήρα και κατ' επέκταση το κόστος της ανάλυσης.

4 Αισθητήρας για την ανίχνευση του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού στο σημείο περίθαλψης

4.1 Περίληψη

Η έγκαιρη ανίχνευση του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού (*Helicobacter Pylori*, *H. Pylori*), ενός βακτηριδίου που προσβάλλει κυρίως το άντρο του στομάχου, προλαμβάνει σημαντικές ασθένειες, όπως το έλκος και ο καρκίνος. Ο έλεγχος πραγματοποιείται με γαστροσκόπηση κατά την οποία λαμβάνεται το βιοπτικό δείγμα, το οποίο στη συνέχεια ελέγχεται με ιστολογικές και άλλες εξετάσεις. Η σπουδαιότητα του άμεσου ελέγχου του βιοπτικού δείγματος, ενισχύει την ανάγκη για διαγνωστικά τεστ που θα πραγματοποιούνται ταυτόχρονα με τη λήψη του. Στην ενότητα αυτή, περιγράφεται η ανάπτυξη ενός αισθητήρα για τον προσδιορισμό του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, εφαρμόζοντας την τεχνολογία BioP_{OC}. Αξιοποιώντας το ένζυμο ουρεάση που παράγεται από το βακτήριο, αναπτύχθηκε ένας αισθητήρας απόκρισης στις μεταβολές του pH, παρουσία διαλύματος ουρίας. Πραγματοποιήθηκε μελέτη διαφόρων συμπολυμερών απόκρισης στο pH, για την ανάπτυξη ενός ευαίσθητου αισθητήρα που θα ανιχνεύει το *H. Pylori*, ακόμη και σε πρώιμα στάδια της μόλυνσης. Η ανάλυση των βιοπτικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο σημείο εξέτασης του ασθενή, παρέχοντας τα αποτελέσματα σε χρόνο μικρότερο από 30 λεπτά. Τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα με αυτά που λήφθηκαν με τις μεθόδους αναφοράς και βρέθηκε ότι ο αισθητήρας BioP_{OC} έχει ειδικότητα 92% και ευαισθησία 83%.

4.2 Εισαγωγή

Το Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter Pylori*, *H. Pylori*) είναι ένα gram-ελικοβακτηρίδιο που προκαλεί γαστρίτιδα, κυρίως στο άντρο, και προσβάλλει το βλεννογόνο του στομάχου¹³³. Περιέχει έξι με οκτώ μαστίγια στο ένα του άκρο, τα οποία χρησιμοποιεί για να κινείται και να διεισδύει στις περιοχές του στομάχου ή του άντρου. Το όξινο pH του στομάχου συμβάλλει στην έκφραση των γονιδίων του μικροβίου που παράγουν το ένζυμο ουρεάση¹³⁴. Με την ουρεάση το όξινο

περιβάλλον του στομάχου, το οποίο καταστρέφει τα βακτήρια, εξουδετερώνεται, λόγω της παραγωγής της αμμωνίας κατά την ενζυμική αντίδραση με την ουρία. Συχνές ασθένειες που μπορεί να προκαλέσει το *H. Pylori* είναι το έλκος στομάχου ή δωδεκαδάκτυλου και ο καρκίνος του στομάχου. Σε πολλές περιπτώσεις, η μόλυνση από *H. Pylori*, είναι ασυμπτωματική¹³⁵.

Η διάγνωση του *H. Pylori* πραγματοποιείται κυρίως με ενδοσκοπικά τεστ. Κατά τη γαστροσκόπηση, λαμβάνονται βιοπτικά δείγματα και πραγματοποιείται ιστολογική εξέταση και καλλιέργεια αυτών. Ένα άμεσο διαγνωστικό τεστ που έχει αναπτυχθεί και χρησιμοποιεί επίσης τα βιοπτικά δείγματα, είναι το τεστ ουρεάσης. Το τεστ ουρεάσης ή αλλιώς CLO (Campylobacter-like organism) τεστ, αποτελεί ένα οικονομικό τεστ, το οποίο παρέχει αποτελέσματα εντός 24 ωρών. Είναι ένα αξιόπιστο τεστ με ευαισθησία 85-90% και ειδικότητα 95-100%, το οποίο ελέγχει την παρουσία της ουρεάσης στο βιοπτικό δείγμα, προσθέτοντάς το σε ένα δοχείο που περιέχει ουρία και ένα δείκτη pH^{133,135}. Το αποτέλεσμα του τεστ επηρεάζεται από την παρουσία αίματος στο δείγμα, από τη λήψη αντιβιοτικών, βισμούθιου και αναστολέων αντλίας πρωτονίων.

Ένα μη επεμβατικό τεστ που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του *H. Pylori* είναι το τεστ αναπνοής ουρίας (Urea breath test), στο οποίο ο ασθενής λαμβάνει ένα χάπι ουρίας με C¹³. Μετά τη διάσπαση της ουρίας σε αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα παρουσία της ουρεάσης στο στομάχι, το CO₂ (μείγμα C¹²O₂ και C¹³O₂) εξέρχεται με την εκπνοή, η οποία συλλέγεται και μεταφέρεται για ανάλυση με φασματομετρία μάζας. Η διαδικασία αυτή, αν και είναι μη επεμβατική, είναι χρονοβόρα και υψηλού κόστους και δεν πληροί τις προϋποθέσεις για PoC αναλύσεις.

Η τεχνολογία BioP^oC που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ουρίας και της κρεατινίνης στα ούρα, εφαρμόστηκε επιπλέον στην ανίχνευση του *H. Pylori*. Ο αισθητήρας που κατασκευάστηκε για την εφαρμογή αυτή αποτελείται από την αποκρινόμενη στο pH μεμβράνη και από το διάλυμα της ουρίας που προστίθεται στη συσκευή. Το βιοπτικό δείγμα που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια της γαστροσκόπησης, τοποθετείται στο διάλυμα της ουρίας πάνω στον αισθητήρα. Η αρχή της μεθόδου είναι παρόμοια με αυτή του βιοαισθητήρα της ουρίας, όπου το αποκρινόμενο συμπολυμερές αποδομείται από την ενζυμικά παραγόμενη αμμωνία λόγω της υδρόλυσης της ουρίας από την ουρεάση που υπάρχει στο βιοπτικό δείγμα. Τα πρώτα

διαγνωστικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με το εμπορικά διαθέσιμο συμπολυμερές Eudragit® S100, ενώ στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν τα συμπολυμερή PMMA-co-PMAA_{x-y:z}, για την κατασκευή πιο ευαίσθητων αισθητήρων. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στη γαστρεντερολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

4.3 Πειραματικό μέρος

4.3.1 Κατασκευή του αισθητήρα

Ο αισθητήρας κατασκευάστηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα της κατασκευής του βιοαισθητήρα ουρίας, παραλείποντας το στάδιο της προσθήκης του ενζύμου. Συνοπτικά, ο αισθητήρας κατασκευάστηκε με μία μεμβράνη Eudragit® S100 ή PMMA-co-PMAA_{x-y:z}, η οποία τοποθετήθηκε μεταξύ δύο αγώγιμων ταινιών χαλκού που αρχικά έχουν καλυφθεί με ταινίες διπλής κολλητικής όψης μορφοποιημένες με διακορευτή διαμέτρου 3 mm. Οι μεμβράνες παρασκευάστηκαν από διαλύματα συγκέντρωσης 4% w/v σε IPA/DDW 97/3 και πάχος υμενίου 8 mil. Στην κάτω ταινία χαλκού δημιουργήθηκε μία οπή με μία καρφίτσα. Τέλος, 30 µL υδατικού διαλύματος ουρίας συγκέντρωσης 200 mM (pH 6,2) τοποθετήθηκαν στον αισθητήρα πριν την τοποθέτηση του βιοπτικού δείγματος.

4.3.2 Προσδιορισμός του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού

Τα βιοπτικά δείγματα λήφθηκαν κατά τη διάρκεια της γαστροσκόπησης με το ενδοσκόπιο GIF-165 της Olympus, από άντρες και γυναίκες ασθενείς μετά τη γραπτή συναίνεσή τους σύμφωνα με τις οδηγίες της επιτροπής ηθικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (28/27-12-2018). Μία απλουστευμένη μορφή της συσκευής BioP^oC, η οποία παρουσιάζεται στο **Σχήμα 37**, χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εφαρμογή. Στη μελέτη αυτή δεν απαιτείται η ακριβής καταγραφή του χρόνου λήψης του σήματος, καθώς πραγματοποιείται μία ποιοτική ανάλυση του βιοπτικού δείγματος, όπου ελέγχεται απλά η παρουσία του *H. Pylori* και όχι η συγκέντρωση αυτού. Ωστόσο, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε για χρόνο 30 λεπτών, σύμφωνα με τα κριτήρια

ASSURED ως προς το χρόνο. Η συσκευή BioPoC, η οποία παράγει ηχητικό σήμα μόλις η άπειρη ηλεκτρική αντίσταση μεταξύ των αγώγιμων ταινιών γίνει πεπερασμένη, προετοιμάστηκε με τον αισθητήρα και το διάλυμα ουρίας. Το δείγμα, αφού λήφθηκε με την ενδοσκόπηση, τοποθετήθηκε στον αισθητήρα χωρίς να προηγηθεί κάποιο στάδιο καθαρισμού. Ταυτόχρονα ενεργοποιήθηκε το χρονόμετρο, σημειώνοντας ως θετικό το δείγμα που παρήγαγε σήμα εντός 30 λεπτών. Επιπλέον, τα βιοπτικά δείγματα εξετάστηκαν με το CLO τεστ ή με βιοψία.



Σχήμα 37. Συσκευή BioPoC για τον προσδιορισμό του *H. Pylori*.

4.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

4.4.1 Ανίχνευση του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού στο σημείο περίθαλψης

Τα προκαταρκτικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς χρησιμοποιώντας έναν αισθητήρα αποτελούμενο από τη μεμβράνη Eudragit® S100 (4% w/v, 8 mil). Η μεμβράνη Eudragit® S100 αρχικά εξετάστηκε ως προς το κριτήριο ZBR σε 20 αισθητήρες με υδατικό διάλυμα ουρίας 200 Mm (pH 6,2). Όλοι οι αισθητήρες ανταποκρίθηκαν επιτυχώς στον έλεγχο αυτό. Στην αρχική δοκιμή σε είκοσι ασθενείς, τα αποτελέσματα του αισθητήρα BioPoC συμφωνούν απόλυτα με αυτά που λήφθηκαν από το CLO τεστ. Η εξέταση με τον αισθητήρα BioPoC πραγματοποιήθηκε

για μέγιστο χρόνο σήματος τα 30 λεπτά, ενώ η ανάγνωση του αποτελέσματος του CLO τεστ πραγματοποιήθηκε δύο φορές, η πρώτη μία ώρα μετά την εξέταση και η δεύτερη 24 ώρες μετά. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ευαισθησία του CLO τεστ είναι <82% για ανάγνωση του αποτελέσματος στα 30 λεπτά και <88% στις 3 ώρες, ενώ για επίτευξη ευαισθησίας >95% απαιτείται ανάγνωση μετά από 24 ώρες,. Η διαδικασία της λήψης του δείγματος και της ανίχνευσης του *H. Pylori* από τον αισθητήρα BioPoC παρουσιάζεται στο **Σχήμα 38**.

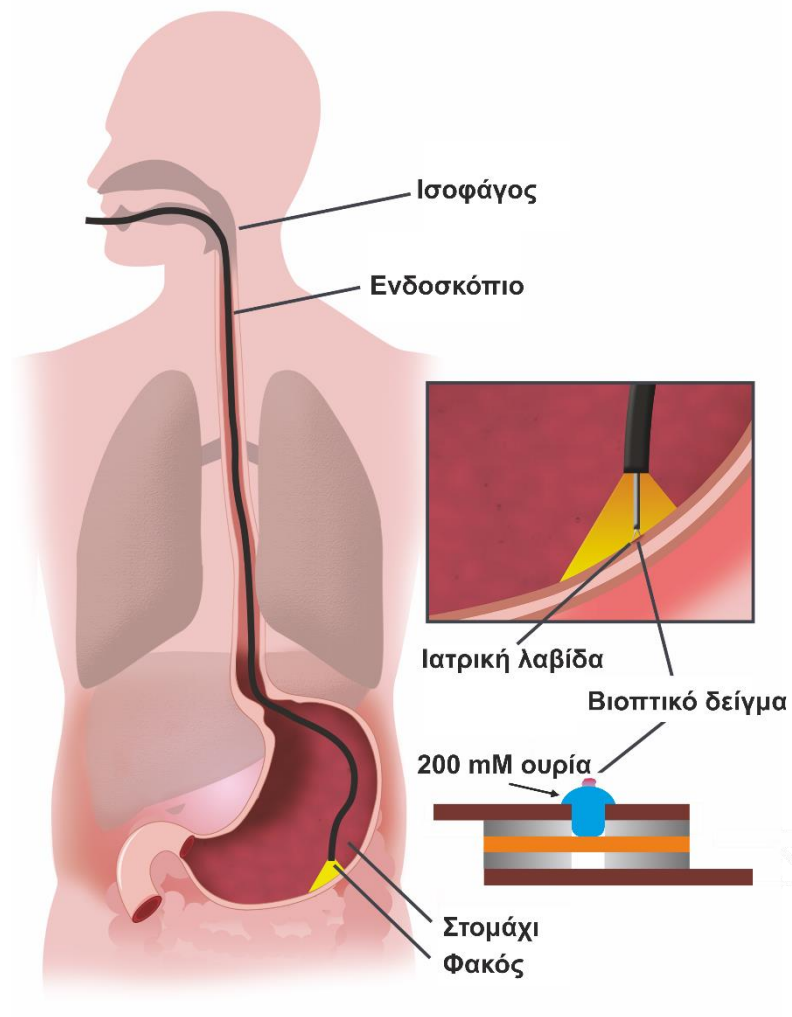
Οι πρώτες δοκιμές για τη λειτουργία της συσκευής ήταν επιτυχείς σε ποσοστό 100% ως προς τα αποτελέσματα του CLO τεστ, σε είκοσι ασθενείς. Ωστόσο, η σύγκριση του αισθητήρα σε αυτή την πρώτη δοκιμή πραγματοποιήθηκε μόνο ως προς το CLO τεστ, το οποίο έχει παρόμοια λειτουργία με τον αισθητήρα BioPoC και, συνεπώς, μπορεί να παράγει τα ίδια λανθασμένα αποτελέσματα. Οι επόμενες μελέτες πραγματοποιήθηκαν συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του αισθητήρα BioPoC με το CLO τεστ αλλά και με την ιστολογική εξέταση, η οποία παρέχει τα πιο ακριβή αποτελέσματα. Πριν την επιλογή των κατάλληλων μεμβρανών για τη συγκεκριμένη ανάλυση, προηγήθηκε μία εκτεταμένη μελέτη σε διάφορες μεμβράνες ως προς το κριτήριο ZBR παρουσία διαλύματος 200 mM ουρίας pH 6,2 για μία ώρα. Τα αποτελέσματα των μεμβρανών σε συνολικό αριθμό είκοσι εξεταζόμενων αισθητήρων για κάθε μεμβράνη, παρουσιάζεται στον **Πίνακα 9**.

Στις μεμβράνες που πληρούν το κριτήριο ZBR, εξετάστηκε περαιτέρω η ευαισθησία τους, ουσιαστικά ο χρόνος απόκρισης παρουσία του ενζύμου ουρεάσης ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση του *H. Pylori* σε πρώιμο στάδιο. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 31**, τα συμπολυμερή PMMA-co-PMAA_{x-y:z} έχουν μεγαλύτερο ρυθμό αποδόμησης από το Eudragit® S100.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 9, παρατηρείται ότι οι μεμβράνες που πληρούν το κριτήριο ZBR και στους είκοσι αισθητήρες που δοκιμάστηκαν είναι οι PMMA-co-PMAA_{30-2:1} σε πάχος 8 και 6 mil, η PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1} σε πάχος 8 mil και η PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1} με πλαστικοποιητή σε πάχος 8 mil. Αυτές οι μεμβράνες δοκιμάστηκαν ως προς την απόκρισή του σε διάλυμα ουρίας 200 mM, παρουσία ουρεάσης 0,05 U. Αυτή η συγκέντρωση ενζύμου επιλέχθηκε ως η μικρότερη συγκέντρωση στην οποία παράγουν σήμα οι αισθητήρες. Η αμέσως μικρότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε ήταν τα 0,03 U, όπου κανένας από τους εξεταζόμενους αισθητήρες δεν αποκρίθηκε.

Πειραματικό μέρος

Η απόκριση της κάθε μεμβράνης, σε δέκα αισθητήρες, παρουσία 200 mM ουρίας και 0,05 U ουρεάσης, παρουσιάζεται στον **Πίνακα 10**



Σχήμα 38. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της γαστροσκόπησης και της λήψης του βιοπτικού δείγματος. Τοποθέτηση του βιοπτικού δείγματος στον αισθητήρα BioPOC.

Πίνακας 9. Μελέτη του κριτηρίου ZBR σε διάφορες μεμβράνες παρουσία διαλύματος 200 mM ουρίας.

Συμπολυμερές	Συγκέντρωση συμπολυμερούς/ Πάχος υμενίου	Πλαστικοποιητής	Αριθμός μεμβρανών που πληρούν το ZBR (δοκιμάστηκαν 20)
PMMA-co-PMAA _{120-2:1}	4% 8 mil	----	14/20
PMMA-co-PMAA _{60-2:1}	4% 8 mil	----	17/20
PMMA-co-PMAA _{30-2:1}	4% 8 mil	----	20/20
PMMA-co-PMAA _{30-2:1}	4% 6 mil	----	20/20
PMMA-co-PMAA _{30-2:1}	4% 5 mil	----	19/20
PMMA-co-PMAA _{30-2:1}	4% 4 mil	----	12/20
PMMA-co-PMAA _{30-2:1}	5% 5 mil	----	17/20
PMMA-co-PMAA _{60-2,5:1}	4% 8 mil	----	20/20
PMMA-co-PMAA _{60-2,5:1}	4% 8 mil	35% w/w DBP	20/20

Πίνακας 10. Μελέτη του χρόνου απόκρισης αισθητήρων με διάφορες μεμβράνες σε διάλυμα ουρίας 200 mM και 0,05 U ουρεάση.

PMMA-co-PMAA _{30-2:1}		PMMA-co-PMAA _{60-2,5:1}	PMMA-co-PMAA _{60-2,5:1} +35%DBP
8 mil	6 mil	8 mil	8 mil
Χρόνος απόκρισης (s)			
288	151	171	195
410	147	158	210
254	96	169	254
190	175	258	172
220	161	342	255
240	194	157	218
180	156	192	225
226	238	268	251
178	273	403	276
119	440	1157	228
MO±SD 230±79	MO±SD 203±97	MO±SD 235±89	MO±SD 228±33

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 10, φαίνεται ότι η μεμβράνη με το μικρότερο χρόνο απόκρισης είναι η PMMA-co-PMAA_{30-2:1} /6 mil. Οι χρόνοι απόκρισης, ωστόσο, είναι παρόμοιοι για όλες τις μεμβράνες. Λαμβάνοντας, υπόψιν και τις μηχανικές ιδιότητες που θα πρέπει να έχει η μεμβράνη ώστε να παραμένει ακέραια μετά την προσθήκη του στερεού δείγματος, επιλέχθηκε η μεμβράνη PMMA-co-PMAA_{30-2:1} /8 mil λόγω του μεγαλύτερου πάχους. Σε 29 συνολικά βιοπτικά δείγματα που εξετάστηκαν, παρουσιάστηκε μεγάλος αριθμός ψευδώς θετικών δειγμάτων (10/29). Αυτό πιθανό να οφείλεται είτε στο pH του αρχικού διαλύματος ουρίας που είναι 6,2 και είναι μεγαλύτερο από το pH στο οποίο ξεκινά να αποδομείται το συμπολυμερές (6,0), είτε στις μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης. Ως εκ τούτου, οι μελέτες συνεχίστηκαν με τη μεμβράνη PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1} +35%DBP, η οποία αποδομείται σε pH>6,2 και λόγω του πλαστικοποιητή παρουσιάζει μεγαλύτερη μηχανική αντοχή. Η συγκεκριμένη μεμβράνη δοκιμάστηκε σε 104 δείγματα και από αυτά, τα 5 ήταν ψευδώς θετικά (ποσοστό 4,8%) και τα 6 ψευδώς αρνητικά (ποσοστό 5,8%). Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε ως προς τα αποτελέσματα των ιστολογικών εξετάσεων. Στην περίπτωση που το αποτέλεσμα της ιστολογικής εξέτασης ήταν απροσδιόριστο, λαμβάνονταν ως αρνητικό. Στον **Πίνακα 11**, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του αισθητήρα BioP_{OC} και του CLO τεστ ως προς την ιστολογική εξέταση.

Στα συνολικά αποτελέσματα του αισθητήρα με τη μεμβράνη PMMA-co-PMAA_{60-2,5:1} +35%DBP υπήρξαν και περιπτώσεις όπου ο αισθητήρας BioP_{OC} έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα, το οποίο συμφωνεί με τη βιοψία ενώ το CLO τεστ είχε δώσει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Ακόμη, σε ένα δείγμα το CLO τεστ χρειάστηκε 24 ώρες ώστε να γίνει η ανάγνωση του αποτελέσματος σωστά, ενώ ο αισθητήρας BioP_{OC} μόλις 20 λεπτά. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι ο αισθητήρας BioP_{OC} έχει ειδικότητα 92% και ευαισθησία 83%, ενώ το CLO τεστ έχει, στις 24 ώρες ανάγνωσης, ειδικότητα 82-100% και ευαισθησία 75-98%. Ως ευαισθησία ορίζεται η πιθανότητα να διαγνωστεί σωστά ένα θετικό αποτέλεσμα, ενώ ειδικότητα είναι η πιθανότητα να διαγνωστεί σωστά ένα αρνητικό αποτέλεσμα, και για τον υπολογισμό τους λαμβάνονται υπόψιν τα ψευδώς θετικά, ψευδώς αρνητικά, αληθώς θετικά και αληθώς αρνητικά αποτελέσματα της προτεινόμενης μεθόδου¹³⁶.

Για τον υπολογισμό της ευαισθησίας χρησιμοποιείται η εξίσωση

$$\text{Ευαισθησία\%} = 100 \times \text{αληθώς θετικά} / (\text{αληθώς θετικά} + \text{ψευδώς αρνητικά})$$

ενώ για την ειδικότητα η εξίσωση

$$\text{Ειδικότητα\%} = 100 \times \text{αληθώς αρνητικά} / (\text{αληθώς αρνητικά} + \text{ψευδώς θετικά})$$

Τα αποτελέσματα του αισθητήρα BioPoC και του CLO τεστ είναι αρκετά συγκρίσιμα, καθιστώντας τον αισθητήρα BioPoC μία αξιόπιστη μέθοδο ανίχνευσης του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, άμεσα, στο σημείο περίθαλψης.

Πίνακας 11. Αναλυτικά αποτελέσματα ανίχνευσης του *H. Pylori* με τον βιοαισθητήρα BioPoC και το CLO τεστ.

Μεμβράνη	Συνολικά δείγματα	BioPoC		CLO	
		Ψευδώς Θετικά	Ψευδώς Αρνητικά	Ψευδώς Θετικά	Ψευδώς Αρνητικά
PMMA-co-PMAA _{30-2:1}	29	10 (34,5%)	2 (6,9%)	1 (3,4%)	1 (3,4%)
PMMA-co-PMAA _{60-2,5:1} +35%DBP	104	5 (4,8%)	6 (5,8%)	2 (1,9%)	7 (6,7%)

4.5 Συμπεράσματα

Στην ενότητα αυτή, αναπτύχθηκε ένας αισθητήρας για την ανίχνευση του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού σε βιοπτικά δείγματα στομάχου. Η λοίμωξη από το Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού είναι συχνή και ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού προσβάλλεται από αυτό. Η έγκαιρη και έγκυρη ανίχνευση του *H. Pylori* είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για την διάγνωση όσο και για τη θεραπεία της νόσου. Αρκετές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την εξέταση των βιοπτικών δειγμάτων, με την πιο

άμεση και οικονομική μέθοδο να είναι το CLO τεστ. Όμως, ο μεγάλος χρόνος αναμονής που απαιτεί (από 1 έως 24 ώρες) αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα. Η ανάγκη για ένα εξίσου αξιόπιστο και οικονομικό τεστ που να παρέχει αποτελέσματα σε μικρότερο χρόνο, ιδανικά μέσα σε 30 λεπτά σύμφωνα με τα κριτήρια ASSURED, οδήγησε στην ανάπτυξη του αισθητήρα BioP^oC. Η ανάλυση αυτή είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί στο σημείο της εξέτασης, τη στιγμή που πραγματοποιείται η ενδοσκοπηση, χρησιμοποιώντας μία φορητή συσκευή που λειτουργεί με μία απλή μπαταρία. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από τρεις διαφορετικές μεθόδους, τον αισθητήρα BioP^oC, το CLO τεστ και τις ιστολογικές εξετάσεις, έδειξε ότι ο αισθητήρας παρέχει αποτελέσματα συγκρίσιμα με το CLO τεστ, σε μικρότερο χρόνο από αυτό.

Τα αποτελέσματα αφήνουν περιθώρια για την ανάπτυξη ενός αισθητήρα που θα παρέχει μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία. Για την επίτευξη της ανίχνευσης του *H. Pylori* ακόμη και σε πρώιμα στάδια όπου η συγκέντρωση της ουρεάσης είναι πολύ μικρή, ένας αισθητήρας με χρωματογραφικό χαρτί, τροποποιημένο με τα αποκρινόμενα στο pH συμπολυμερή, θα μπορούσε να αυξήσει την ευαισθησία της συσκευής BioP^oC. Επιπλέον, σε αυτή την περίπτωση αναμένεται ο αισθητήρας να είχε μεγαλύτερη μηχανική αντοχή, μειώνοντας τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Βιβλιογραφία

- (1) Lopez-Avila, V.; Hill, H. H. Field Analytical Chemistry. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (12), 289–306. <https://doi.org/10.1021/a19700121>.
- (2) Chudyk, W. Field Screening of Hazardous Waste Sites. Part 1. *Environ. Sci. Technol.* **1989**, *23* (5), 504–507. <https://doi.org/10.1021/es00063a002>.
- (3) Duan, C.; Li, J.; Zhang, Y.; Ding, K.; Geng, X.; Guan, Y. Portable Instruments for On-Site Analysis of Environmental Samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2022**, *154*, 116653. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116653>.
- (4) Wang, L.; Cheng, Y.; Naidu, R.; Chadalavada, S.; Bekele, D.; Gell, P.; Donaghey, M.; Bowman, M. Application of Portable Gas Chromatography–Mass Spectrometer for Rapid Field Based Determination of TCE in Soil Vapour and Groundwater. *Environ. Technol. Innov.* **2021**, *21*, 101274. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101274>.
- (5) Stierlin, É.; Michel, T.; Fernandez, X. Field Analyses of Lavender Volatile Organic Compounds: Performance Evaluation of a Portable Gas Chromatography–Mass Spectrometry Device. *Phytochem. Anal.* **2020**, *31* (6), 778–785. <https://doi.org/10.1002/pca.2942>.
- (6) Brandl, M.; Posniecek, T.; Preuer, R.; Weigelhofer, G. A Portable Sensor System for Measurement of Fluorescence Indices of Water Samples. *IEEE Sens. J.* **2020**, *20* (16), 1–1. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2020.2988588>.
- (7) O'Brien, N. A.; Hulse, C. A.; Friedrich, D. M.; Van Milligen, F. J.; von Gunten, M. K.; Pfeifer, F.; Siesler, H. W. Miniature Near-Infrared (NIR) Spectrometer Engine for Handheld Applications. In *Next-Generation Spectroscopic Technologies V*; Druy, M. A., Crocombe, R. A., Eds.; 2012; Vol. 8374, p 837404. <https://doi.org/10.1117/12.917983>.
- (8) Zamora-Rojas, E.; Pérez-Marín, D.; De Pedro-Sanz, E.; Guerrero-Ginel, J. E.; Garrido-Varo, A. In-Situ Iberian Pig Carcass Classification Using a Micro-Electro-Mechanical System (MEMS)-Based near Infrared (NIR) Spectrometer. *Meat Sci.* **2012**, *90* (3), 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.10.006>.
- (9) Díaz-González, M.; Fernández-Sánchez, C. Decentralized Analysis of Water Contaminants Using Compact (Bio)Electroanalytical Tools. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* **2019**, *10*, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.08.003>.
- (10) Smolka, M.; Puchberger-Enengl, D.; Bipoun, M.; Klasa, A.; Kiczakajlo, M.; Śmiechowski, W.; Sowiński, P.; Krutzler, C.; Keplinger, F.; Vellekoop, M. J. A Mobile Lab-on-a-Chip Device for on-Site Soil Nutrient Analysis. *Precis. Agric.* **2017**, *18* (2), 152–168. <https://doi.org/10.1007/s11119-016-9452-y>.
- (11) Brennwald, M. S.; Schmidt, M.; Oser, J.; Kipfer, R. A Portable and Autonomous Mass Spectrometric System for On-Site Environmental Gas Analysis. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50* (24), 13455–13463. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03669>.
- (12) Cozma, A.; Firculescu, A.-C.; Tudose, D.; Ruse, L. Autonomous Multi-Rotor Aerial Platform for Air Pollution Monitoring. *Sensors* **2022**, *22* (3), 860. <https://doi.org/10.3390/s22030860>.
- (13) Grandy, J. J.; Galpin, V.; Singh, V.; Pawliszyn, J. Development of a Drone-Based Thin-Film Solid-Phase Microextraction Water Sampler to Facilitate On-Site Screening of Environmental Pollutants. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (19), 12917–12924. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01490>.
- (14) Pu, Y.; Pérez-Marín, D.; O'Shea, N.; Garrido-Varo, A. Recent Advances in Portable and Handheld NIR Spectrometers and Applications in Milk, Cheese and Dairy Powders. *Foods* **2021**, *10* (10), 2377. <https://doi.org/10.3390/foods10102377>.
- (15) Riu, J.; Gorla, G.; Chakif, D.; Boqué, R.; Giussani, B. Rapid Analysis of Milk Using Low-

- Cost Pocket-Size NIR Spectrometers and Multivariate Analysis. *Foods* **2020**, *9* (8), 1090. <https://doi.org/10.3390/foods9081090>.
- (16) Amr, M.; Sabry, Y. M.; Khalil, D. Near-Infrared Optical MEMS Spectrometer-Based Quantification of Fat Concentration in Milk. In *2018 35th National Radio Science Conference (NRSC)*; IEEE, 2018; Vol. 9, pp 409–416. <https://doi.org/10.1109/NRSC.2018.8354389>.
- (17) Furutani, S.; Hagihara, Y.; Nagai, H. On-Site Identification of Meat Species in Processed Foods by a Rapid Real-Time Polymerase Chain Reaction System. *Meat Sci.* **2017**, *131* (April), 56–59. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.009>.
- (18) Giménez-Gómez, P.; Gutiérrez-Capitán, M.; Capdevila, F.; Puig-Pujol, A.; Fernández-Sánchez, C.; Jiménez-Jorquera, C. Robust L-Malate Bionzymatic Biosensor to Enable the on-Site Monitoring of Malolactic Fermentation of Red Wines. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *954*, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.061>.
- (19) Snider, T. H. SIMPLE BEDSIDE TEST OF RESPIRATORY FUNCTION. *J. Am. Med. Assoc.* **1959**, *170* (14), 1631. <https://doi.org/10.1001/jama.1959.03010140011004>.
- (20) Clark, L. C.; Lyons, C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102* (1), 29–45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.
- (21) Kost, G. J.; Jammal, M. A.; Ward, R. E.; Safwat, A. M. Monitoring of Ionized Calcium during Human Hepatic Transplantation: Critical Values and Their Relevance to Cardiac and Hemodynamic Management. *Am. J. Clin. Pathol.* **1986**, *86* (1), 61–70. <https://doi.org/10.1093/ajcp/86.1.61>.
- (22) Watson, D. Analytical Investigations Closer to the Patient. *Br. Med. J.* **1980**, *281* (July), 31–35. <https://doi.org/10.1136/bmj.281.6232.31>.
- (23) Sönksen, P. H.; Judd, S. L.; Lowy, C. HOME MONITORING OF BLOOD-GLUCOSE. *Lancet* **1978**, *311* (8067), 729–732. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)90854-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)90854-1).
- (24) Santrach, P. J.; Burritt, M. F. Point-of-Care Testing. *Mayo Clin. Proc.* **1995**, *70* (5), 493–494. <https://doi.org/10.4065/70.5.493>.
- (25) Wu, G.; Zaman, M. H. H. Low-Cost Tools for Diagnosing and Monitoring HIV Infection in Low-Resource Settings. *Bull. World Health Organ.* **2012**, *90* (12), 914–920. <https://doi.org/10.2471/BLT.12.102780>.
- (26) Land, K. J.; Boeras, D. I.; Chen, X.-S.; Ramsay, A. R.; Peeling, R. W. REASSURED Diagnostics to Inform Disease Control Strategies, Strengthen Health Systems and Improve Patient Outcomes. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4* (1), 46–54. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0295-3>.
- (27) The Global Fund. *HIV & Malaria Rapid Diagnostic Tests - Sourcing & Management of Health Products - The Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria*. <https://www.theglobalfund.org/en/sourcing-management/health-products/hiv-malaria-rapid-diagnostic-tests/>.
- (28) College of American Pathologists. *Point-Of-Care Testing Toolkit*; 2015.
- (29) *\$1-Million Prize Is Offered for Ways to Test for 2 Sex Diseases*. Los Angeles Times. <https://www.latimes.com/archives/la-xpm-1994-02-08-mn-20501-story.html> (accessed 2022-12-11).
- (30) Aledort, J. E.; Ronald, A.; Rafael, M. E.; Girosi, F.; Vickerman, P.; Le Blancq, S. M.; Landay, A.; Holmes, K.; Ridzon, R.; Hellmann, N.; Shea, M. V.; Peeling, R. W. Reducing the Burden of Sexually Transmitted Infections in Resource-Limited Settings: The Role of Improved Diagnostics. *Nature* **2006**, *444* (S1), 59–72. <https://doi.org/10.1038/nature05447>.
- (31) Christodouleas, D. C.; Kaur, B.; Chorti, P. From Point-of-Care Testing to EHealth Diagnostic Devices (EDiagnostics). *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4* (12), 1600–1616. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00625>.

- (32) Kumar, A. A.; Hennek, J. W.; Smith, B. S.; Kumar, S.; Beattie, P.; Jain, S.; Rolland, J. P.; Stossel, T. P.; Chunda-Liyoka, C.; Whitesides, G. M. From the Bench to the Field in Low-Cost Diagnostics: Two Case Studies. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54* (20), 5836–5853. <https://doi.org/10.1002/anie.201411741>.
- (33) Papanikolaou, E.; Simos, Y. V.; Spyrou, K.; Tzianni, E. I.; Vezyraki, P.; Tsamis, K.; Patila, M.; Tigas, S.; Prodromidis, M. I.; Gournis, D. P.; Stamatis, H.; Peschos, D.; Dounousi, E. Is Graphene the Rock upon Which New Era Continuous Glucose Monitors Could Be Built? *Exp. Biol. Med.* **2022**, No. Dm, 153537022211341. <https://doi.org/10.1177/15353702221134105>.
- (34) Juska, V. B.; Pemble, M. E. A Critical Review of Electrochemical Glucose Sensing: Evolution of Biosensor Platforms Based on Advanced Nanosystems. *Sensors* **2020**, *20* (21), 6013. <https://doi.org/10.3390/s20216013>.
- (35) Koopal, C. G. J.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M.; Ruiter, B. De; Schasfoort, R. B. M. Third-Generation Amperometric Biosensor for Glucose. Polypyrrole Deposited within a Matrix of Uniform Latex Particles as Mediator. **1992**, *29*, 159–175. [https://doi.org/10.1016/0302-4598\(92\)80064-N](https://doi.org/10.1016/0302-4598(92)80064-N).
- (36) Tehrani, F.; Teymourian, H.; Wuerstle, B.; Kavner, J.; Patel, R.; Furmidge, A.; Aghavali, R.; Hosseini-Toudeshki, H.; Brown, C.; Zhang, F.; Mahato, K.; Li, Z.; Barfidokht, A.; Yin, L.; Warren, P.; Huang, N.; Patel, Z.; Mercier, P. P.; Wang, J. An Integrated Wearable Microneedle Array for the Continuous Monitoring of Multiple Biomarkers in Interstitial Fluid. *Nat. Biomed. Eng.* **2022**, *6* (11), 1214–1224. <https://doi.org/10.1038/s41551-022-00887-1>.
- (37) Ince, B.; Sezgintürk, M. K. Lateral Flow Assays for Viruses Diagnosis: Up-to-Date Technology and Future Prospects. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2022**, *157*, 116725. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116725>.
- (38) Harris C. Daniel, L. A. C. *Αναλυτική Χημεία*; Broken Hill, 2021.
- (39) Park, J. Lateral Flow Immunoassay Reader Technologies for Quantitative Point-of-Care Testing. *Sensors* **2022**, *22* (19), 7398. <https://doi.org/10.3390/s22197398>.
- (40) Yang, J.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Zeng, X.; Liu, J.; Tian, Y.; Wang, H.; Xu, Z.; Shen, Y. Reverse Distal Similarity of Hapten Structure Enhancing Antibody's Group-Specificity: Development of an Immunochromatographic Strip for Tylosin and Tilmicosin in Milk and Water. *J. Food Compos. Anal.* **2023**, *116*, 105068. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2022.105068>.
- (41) Liang, Z.; Peng, T.; Jiao, X.; Zhao, Y.; Xie, J.; Jiang, Y.; Meng, B.; Fang, X.; Yu, X.; Dai, X. Latex Microsphere-Based Bicolor Immunochromatography for Qualitative Detection of Neutralizing Antibody against SARS-CoV-2. *Biosensors* **2022**, *12* (2), 103. <https://doi.org/10.3390/bios12020103>.
- (42) Moyano, A.; Serrano-Pertierra, E.; Salvador, M.; Martínez-García, J. C.; Rivas, M.; Blanco-López, M. C. Magnetic Lateral Flow Immunoassays. *Diagnostics* **2020**, *10* (5). <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS10050288>.
- (43) Cate, D. M.; Adkins, J. A.; Mettakoonpitak, J.; Henry, C. S. Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (1), 19–41. <https://doi.org/10.1021/ac503968p>.
- (44) Steggall, M. J. Urine Samples and Urinalysis. *Nurs. Stand.* **2007**, *22* (14–16), 42–45. <https://doi.org/10.7748/NS2007.12.22.14.42.C6303>.
- (45) Khan, L. B.; Read, H. M.; Ritchie, S. R.; Proft, T. Artificial Urine for Teaching Urinalysis Concepts and Diagnosis of Urinary Tract Infection in the Medical Microbiology Laboratory. *J. Microbiol. Biol. Educ.* **2017**, *18* (2). <https://doi.org/10.1128/jmbe.v18i2.1325>.
- (46) Pinto, V.; Sousa, P.; Catarino, S. O.; Correia-Neves, M.; Minas, G. Microfluidic Immunosensor for Rapid and Highly-Sensitive Salivary Cortisol Quantification.

- Biosens. Bioelectron.* **2017**, *90* (September 2016), 308–313.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.067>.
- (47) Lee, G.; Lee, J.; Kim, J.; Choi, H. S.; Kim, J.; Lee, S.; Lee, H. Single Microfluidic Electrochemical Sensor System for Simultaneous Multi-Pulmonary Hypertension Biomarker Analyses. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 7545. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06144-9>.
- (48) Beduk, T.; Beduk, D.; Hasan, M. R.; Guler Celik, E.; Kosel, J.; Narang, J.; Salama, K. N.; Timur, S. Smartphone-Based Multiplexed Biosensing Tools for Health Monitoring. *Biosensors* **2022**, *12* (8), 583. <https://doi.org/10.3390/bios12080583>.
- (49) Sun, A. C.; Hall, D. A. Point-of-Care Smartphone-Based Electrochemical Biosensing. *Electroanalysis* **2019**, *31* (1), 2–16. <https://doi.org/10.1002/elan.201800474>.
- (50) Zhang, M.; Cui, X.; Li, N. Smartphone-Based Mobile Biosensors for the Point-of-Care Testing of Human Metabolites. *Mater. Today Bio* **2022**, *14* (January), 100254. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100254>.
- (51) Koh, A.; Kang, D.; Xue, Y.; Lee, S.; Pielak, R. M.; Kim, J.; Hwang, T.; Min, S.; Banks, A.; Bastien, P.; Manco, M. C.; Wang, L.; Ammann, K. R.; Jang, K.-I.; Won, P.; Han, S.; Ghaffari, R.; Paik, U.; Slepian, M. J.; Balooch, G.; Huang, Y.; Rogers, J. A. A Soft, Wearable Microfluidic Device for the Capture, Storage, and Colorimetric Sensing of Sweat. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8* (366), 1–14.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf2593>.
- (52) He, X.; Xu, T.; Gu, Z.; Gao, W.; Xu, L.-P.; Pan, T.; Zhang, X. Flexible and Superwetable Bands as a Platform toward Sweat Sampling and Sensing. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (7), 4296–4300. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05875>.
- (53) Rahman, M. M.; Uddin, M. J.; Hong, J. H.; Bhuiyan, N. H.; Shim, J. S. Lab-in-a-Cup (LiC): An Autonomous Fluidic Device for Daily Urinalysis Using Smartphone. *Sensors Actuators B Chem.* **2022**, *355* (December 2021), 131336. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131336>.
- (54) Alizadeh, N.; Salimi, A.; Hallaj, R. A Strategy for Visual Optical Determination of Glucose Based on a Smartphone Device Using Fluorescent Boron-Doped Carbon Nanoparticles as a Light-up Probe. *Microchim. Acta* **2020**, *187* (1), 14. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3871-1>.
- (55) Lu, F.; Yang, Y.; Liu, Y.; Wang, F.; Ji, X.; He, Z. Point-of-Care Testing (POCT) of Patients with a High Concentration of Uric Acid by Using Alginate Hydrogel Microspheres Embedded with CdZnTeS QDs and Urate Oxidase (Alg@QDs-UOx MSs). *Analyst* **2021**, *146* (3), 949–955. <https://doi.org/10.1039/D0AN02029J>.
- (56) Roda, A.; Michelini, E.; Cevenini, L.; Calabria, D.; Calabretta, M. M.; Simoni, P. Integrating Biochemiluminescence Detection on Smartphones: Mobile Chemistry Platform for Point-of-Need Analysis. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (15), 7299–7304. <https://doi.org/10.1021/ac502137s>.
- (57) Yao, Y.; Li, H.; Wang, D.; Liu, C.; Zhang, C. An Electrochemiluminescence Cloth-Based Biosensor with Smartphone-Based Imaging for Detection of Lactate in Saliva. *Analyst* **2017**, *142* (19), 3715–3724. <https://doi.org/10.1039/C7AN01008G>.
- (58) Lee, S. C.-H.; Burke, P. J. NanoStat: An Open Source, Fully Wireless Potentiostat. *Electrochim. Acta* **2022**, *422* (October 2021), 140481. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.140481>.
- (59) Nemiroski, A.; Christodouleas, D. C.; Hennek, J. W.; Kumar, A. A.; Maxwell, E. J.; Fernández-Abedul, M. T.; Whitesides, G. M. Universal Mobile Electrochemical Detector Designed for Use in Resource-Limited Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (33), 11984–11989. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405679111>.
- (60) Guo, J. Smartphone-Powered Electrochemical Dongle for Point-of-Care Monitoring of Blood β -Ketone. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (17), 8609–8613.

- https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02531.
- (61) Imani, S.; Bhandodkar, A. J.; Mohan, A. M. V. V.; Kumar, R.; Yu, S.; Wang, J.; Mercier, P. P. A Wearable Chemical-Electrophysiological Hybrid Biosensing System for Real-Time Health and Fitness Monitoring. *Nat. Commun.* **2016**, 7 (May), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11650>.
- (62) Gao, W.; Emaminejad, S.; Nyein, H. Y. Y.; Challa, S.; Chen, K.; Peck, A.; Fahad, H. M.; Ota, H.; Shiraki, H.; Kiriya, D.; Lien, D.-H.; Brooks, G. A.; Davis, R. W.; Javey, A. Fully Integrated Wearable Sensor Arrays for Multiplexed in Situ Perspiration Analysis. *Nature* **2016**, 529 (7587), 509–514. <https://doi.org/10.1038/nature16521>.
- (63) Wei, M.; Gao, Y.; Li, X.; Serpe, M. J. Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications. *Polym. Chem.* **2017**, 8 (1), 127–143. <https://doi.org/10.1039/C6PY01585A>.
- (64) Cabane, E.; Zhang, X.; Langowska, K.; Palivan, C. G.; Meier, W. Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications in Nanomedicine. *Biointerphases* **2012**, 7 (1), 9. <https://doi.org/10.1007/s13758-011-0009-3>.
- (65) Hu, J.; Liu, S. Responsive Polymers for Detection and Sensing Applications: Current Status and Future Developments. *Macromolecules* **2010**, 43 (20), 8315–8330. <https://doi.org/10.1021/ma1005815>.
- (66) Gao, N.; You, H. Recent Applications of Point-of-Care Devices for Glucose Detection on the Basis of Stimuli-Responsive Volume Phase Transition of Hydrogel. *BioChip J.* **2021**, 15 (1), 23–41. <https://doi.org/10.1007/s13206-021-00001-8>.
- (67) Aran, K.; Parades, J.; Rafi, M.; Yau, J. F.; Acharya, A. P.; Zibinsky, M.; Liepmann, D.; Murthy, N. Stimuli-Responsive Electrodes Detect Oxidative Stress and Liver Injury. *Adv. Mater.* **2015**, 27 (8), 1433–1436. <https://doi.org/10.1002/adma.201404562>.
- (68) Antunez, E. E.; Mahon, C. S.; Tong, Z.; Voelcker, N. H.; Müllner, M. A Regenerable Biosensing Platform for Bacterial Toxins. *Biomacromolecules* **2021**, 22 (2), 441–453. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01318>.
- (69) Najafzadeh, F.; Ghasemi, F.; Hormozi-Nezhad, M. R. Anti-Aggregation of Gold Nanoparticles for Metal Ion Discrimination: A Promising Strategy to Design Colorimetric Sensor Arrays. *Sensors Actuators, B Chem.* **2018**, 270 (April), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.065>.
- (70) Ziai, Y.; Rinoldi, C.; Nakielski, P.; De Sio, L.; Pierini, F. Smart Plasmonic Hydrogels Based on Gold and Silver Nanoparticles for Biosensing Application. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* **2022**, 24, 100413. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2022.100413>.
- (71) Tokarev, I.; Tokareva, I.; Gopishetty, V.; Katz, E.; Minko, S. Specific Biochemical-to-Optical Signal Transduction by Responsive Thin Hydrogel Films Loaded with Noble Metal Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2010**, 22 (12), 1412–1416. <https://doi.org/10.1002/adma.200903456>.
- (72) Refaey, S. A. M.; Schwitzgebel, G.; Schneider, O. Electrochemical Impedance Studies on Oxidative Degradation, Overoxidative Degradation, Deactivation and Reactivation of Conducting Polymers. *Synth. Met.* **1999**, 98 (3), 183–192. [https://doi.org/10.1016/S0379-6779\(98\)00176-3](https://doi.org/10.1016/S0379-6779(98)00176-3).
- (73) Sumner, C.; Sabot, A.; Turner, K.; Krause, S. A Transducer Based on Enzyme-Induced Degradation of Thin Polymer Films Monitored by Surface Plasmon Resonance. *Anal. Chem.* **2000**, 72 (21), 5225–5232. <https://doi.org/10.1021/ac000411y>.
- (74) McNeil, C. J.; Athey, D.; Ball, M.; Ho, W. O.; Krause, S.; Armstrong, R. D.; Des Wright, J.; Rawson, K. Electrochemical Sensors Based on Impedance Measurement of Enzyme-Catalyzed Polymer Dissolution: Theory and Applications. *Anal. Chem.* **1995**, 67 (21), 3928–3935. <https://doi.org/10.1021/ac00117a018>.
- (75) Fernández-Sánchez, C.; McNeil, C. J.; Rawson, K.; Nilsson, O. Disposable Noncompetitive Immunosensor for Free and Total Prostate-Specific Antigen Based on

- Capacitance Measurement. *Anal. Chem.* **2004**, 76 (19), 5649–5656.
<https://doi.org/10.1021/ac0494937>.
- (76) Tam, T. K.; Ornatska, M.; Pita, M.; Minko, S.; Katz, E. Polymer Brush-Modified Electrode with Switchable and Tunable Redox Activity for Bioelectronic Applications. *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112 (22), 8438–8445. <https://doi.org/10.1021/jp801086w>.
- (77) Christodouleas, D. C.; Nemiroski, A.; Kumar, A. A.; Whitesides, G. M. Broadly Available Imaging Devices Enable High-Quality Low-Cost Photometry. *Anal. Chem.* **2015**, 87 (18), 9170–9178. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01612>.
- (78) Malkin, R. A. Design of Health Care Technologies for the Developing World. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2007**, 9 (1), 567–587.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151913>.
- (79) World Health Assembly, 58. EHealth: Report by the Secretariat. **2005**, World Health Organization.
- (80) Ashley, B. K.; Brown, M. S.; Park, Y.; Kuan, S.; Koh, A. Skin-Inspired, Open Mesh Electrochemical Sensors for Lactate and Oxygen Monitoring. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, 132, 343–351. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.02.041>.
- (81) Colozza, N.; Kehe, K.; Dionisi, G.; Popp, T.; Tsoutsouloupoulos, A.; Steinritz, D.; Moscone, D.; Arduini, F. A Wearable Origami-like Paper-Based Electrochemical Biosensor for Sulfur Mustard Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, 129, 15–23.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.002>.
- (82) Economou, A.; Kokkinos, C.; Prodromidis, M. Flexible Plastic, Paper and Textile Lab-on-a Chip Platforms for Electrochemical Biosensing. *Lab Chip* **2018**, 18 (13), 1812–1830. <https://doi.org/10.1039/C8LC00025E>.
- (83) Kim, J.; Jeerapan, I.; Sempionatto, J. R.; Barfidokht, A.; Mishra, R. K.; Campbell, A. S.; Hubble, L. J.; Wang, J. Wearable Bioelectronics: Enzyme-Based Body-Worn Electronic Devices. *Acc. Chem. Res.* **2018**, 51 (11), 2820–2828.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00451>.
- (84) Mishra, R. K.; Martín, A.; Nakagawa, T.; Barfidokht, A.; Lu, X.; Sempionatto, J. R.; Lyu, K. M.; Karajic, A.; Musameh, M. M.; Kyratzis, I. L.; Wang, J. Detection of Vapor-Phase Organophosphate Threats Using Wearable Conformable Integrated Epidermal and Textile Wireless Biosensor Systems. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 101, 227–234.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.044>.
- (85) Nyein, H. Y. Y.; Tai, L.-C.; Ngo, Q. P.; Chao, M.; Zhang, G. B.; Gao, W.; Bariya, M.; Bullock, J.; Kim, H.; Fahad, H. M.; Javey, A. A Wearable Microfluidic Sensing Patch for Dynamic Sweat Secretion Analysis. *ACS Sensors* **2018**, 3 (5), 944–952.
<https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00961>.
- (86) Lewis, G. G.; DiTucci, M. J.; Phillips, S. T. Quantifying Analytes in Paper-Based Microfluidic Devices Without Using External Electronic Readers. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, 51 (51), 12707–12710. <https://doi.org/10.1002/anie.201207239>.
- (87) Renault, C.; Anderson, M. J.; Crooks, R. M. Electrochemistry in Hollow-Channel Paper Analytical Devices. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (12), 4616–4623.
<https://doi.org/10.1021/ja4118544>.
- (88) Wang, A. G.; Dong, T.; Mansour, H.; Matamoros, G.; Sanchez, A. L.; Li, F. Paper-Based DNA Reader for Visualized Quantification of Soil-Transmitted Helminth Infections. *ACS Sensors* **2018**, 3 (1), 205–210. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00857>.
- (89) Coudron, L.; McDonnell, M. B.; Munro, I.; McCluskey, D. K.; Johnston, I. D.; Tan, C. K. L.; Tracey, M. C. Fully Integrated Digital Microfluidics Platform for Automated Immunoassay; A Versatile Tool for Rapid, Specific Detection of a Wide Range of Pathogens. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, 128, 52–60.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.014>.
- (90) Márquez, A.; Aymerich, J.; Dei, M.; Rodríguez-Rodríguez, R.; Vázquez-Carrera, M.;

- Pizarro-Delgado, J.; Giménez-Gómez, P.; Merlos, Á.; Terés, L.; Serra-Graells, F.; Jiménez-Jorquera, C.; Domínguez, C.; Muñoz-Berbel, X. Reconfigurable Multiplexed Point of Care System for Monitoring Type 1 Diabetes Patients. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *136*, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.04.015>.
- (91) Vargas, E.; Teymourian, H.; Tehrani, F.; Eksin, E.; Sánchez-Tirado, E.; Warren, P.; Erdem, A.; Dassau, E.; Wang, J. Enzymatic/Immunoassay Dual-Biomarker Sensing Chip: Towards Decentralized Insulin/Glucose Detection. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2019**, *58* (19), 6376–6379. <https://doi.org/10.1002/anie.201902664>.
- (92) Xianyu, Y.; Wu, J.; Chen, Y.; Zheng, W.; Xie, M.; Jiang, X. Controllable Assembly of Enzymes for Multiplexed Lab-on-a-Chip Bioassays with a Tunable Detection Range. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2018**, *57* (25), 7503–7507. <https://doi.org/10.1002/anie.201801815>.
- (93) Wang, J.; Karnaushenko, D.; Medina-Sánchez, M.; Yin, Y.; Ma, L.; Schmidt, O. G. Three-Dimensional Microtubular Devices for Lab-on-a-Chip Sensing Applications. *ACS Sensors* **2019**, *4* (6), 1476–1496. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00681>.
- (94) Conzuelo, F.; Ruff, A.; Schuhmann, W. Self-Powered Bioelectrochemical Devices. *Curr. Opin. Electrochem.* **2018**, *12*, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.05.010>.
- (95) Tavares, A. P. M.; Truta, L. A. A. N. A.; Moreira, F. T. C.; Carneiro, L. P. T.; Sales, M. G. F. Self-Powered and Self-Signalled Autonomous Electrochemical Biosensor Applied to Cancinoembryonic Antigen Determination. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *140*, 111320. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111320>.
- (96) Dal Dosso, F.; Tripodi, L.; Spasic, D.; Kokalj, T.; Lammertyn, J. Innovative Hydrophobic Valve Allows Complex Liquid Manipulations in a Self-Powered Channel-Based Microfluidic Device. *ACS Sensors* **2019**, *4* (3), 694–703. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01555>.
- (97) Escobedo, P.; Erenas, M. M.; Martínez-Olmos, A.; Carvajal, M. A.; Gonzalez-Chocano, S.; Capitán-Vallvey, L. F.; Palma, A. J. General-Purpose Passive Wireless Point-of-Care Platform Based on Smartphone. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *141*, 111360. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111360>.
- (98) Tran, V.; Walkenfort, B.; König, M.; Salehi, M.; Schlücker, S. Rapid, Quantitative, and Ultrasensitive Point-of-Care Testing: A Portable SERS Reader for Lateral Flow Assays in Clinical Chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2019**, *58* (2), 442–446. <https://doi.org/10.1002/anie.201810917>.
- (99) Wu, K.; Klein, T.; Krishna, V. D.; Su, D.; Perez, A. M.; Wang, J.-P. Portable GMR Handheld Platform for the Detection of Influenza A Virus. *ACS Sensors* **2017**, *2* (11), 1594–1601. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00432>.
- (100) Russell, S. M.; de la Rica, R. Policy Considerations for Mobile Biosensors. *ACS Sensors*. American Chemical Society June 22, 2018, pp 1059–1068. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b00289>.
- (101) Wu, G.; Zaman, M. H. Low-Cost Tools for Diagnosing and Monitoring HIV Infection in Low-Resource Settings. *Bull. World Health Organ.* **2012**, *90* (12), 914–920. <https://doi.org/10.2471/BLT.12.102780>.
- (102) Fernández-Sánchez, C.; McNeil, C. J.; Rawson, K. Electrochemical Impedance Spectroscopy Studies of Polymer Degradation: Application to Biosensor Development. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2005**, *24* (1), 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.08.010>.
- (103) Prodromidis, M. I. Impedimetric Immunosensors—A Review. *Electrochim. Acta* **2010**, *55* (14), 4227–4233. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.01.081>.
- (104) PUTNAM, D. F. Composition and Concentrative Properties of Human Urine. *NASA Contract. Reports* **1971**.
- (105) Bilobrov, V. M.; Chugaj, A. V.; Bessarabov, V. I. Urine PH Variation Dynamics in

- Healthy Individuals and Stone Formers. *Urol. Int.* **1990**, *45* (6), 326–331.
<https://doi.org/10.1159/000281730>.
- (106) Cánovas, R.; Cuartero, M.; Crespo, G. A. Modern Creatinine (Bio)Sensing: Challenges of Point-of-Care Platforms. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *130*, 110–124.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.048>.
- (107) Mitch, W. E.; Collier, V. U.; Walser, M. Creatinine Metabolism in Chronic Renal Failure. *Clin. Sci.* **1980**, *58* (4), 327–335. <https://doi.org/10.1042/cs0580327>.
- (108) Horn, M.; Frantz, S.; Remkes, H.; Laser, A.; Urban, B.; Mettenleiter, A.; Schnackerz, K.; Neubauer, S. Effects of Chronic Dietary Creatine Feeding on Cardiac Energy Metabolism and on Creatine Content in Heart, Skeletal Muscle, Brain, Liver and Kidney. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1998**, *30* (2), 277–284.
<https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0590>.
- (109) Love, S. A.; Seegmiller, J. C.; Kloss, J.; Apple, F. S. Urine Creatinine Concentrations in Drug Monitoring Participants and Hospitalized Patients. *J. Anal. Toxicol.* **2016**, *40* (8), 659–662. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw092>.
- (110) Jaffe, M. Ueber Den Niederschlag, Welchen Pikrinsäure in Normalem Harn Erzeugt Und Über Eine Neue Reaction Des Kreatinins. *bchm* **1886**, *10* (5), 391–400.
<https://doi.org/10.1515/bchm1.1886.10.5.391>.
- (111) Myers, G. L. Recommendations for Improving Serum Creatinine Measurement: A Report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin. Chem.* **2006**, *52* (1), 5–18.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.0525144>.
- (112) Raveendran, J.; P.E., R.; T., R.; G. Nair, B.; Satheesh Babu, T. G. Fabrication of a Disposable Non-Enzymatic Electrochemical Creatinine Sensor. *Sensors Actuators B Chem.* **2017**, *243*, 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.158>.
- (113) Kumar, P.; Jaiwal, R.; Pundir, C. S. An Improved Amperometric Creatinine Biosensor Based on Nanoparticles of Creatininase, Creatinase and Sarcosine Oxidase. *Anal. Biochem.* **2017**, *537*, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.08.022>.
- (114) Pundir, C. S.; Kumar, P.; Jaiwal, R. Biosensing Methods for Determination of Creatinine: A Review. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *126*, 707–724.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.11.031>.
- (115) Bass, D. E.; Dobalian, I. T. Ratio Between True and Apparent Creatinine in Sweat. *J. Appl. Physiol.* **1953**, *5* (9), 555–558. <https://doi.org/10.1152/jappl.1953.5.9.555>.
- (116) Guilbault, G. G.; Chen, S. P.; Kuan, S. S. A Creatinine Specific Enzyme Electrode. *Anal. Lett.* **1980**, *13* (18), 1607–1624. <https://doi.org/10.1080/00032718008055739>.
- (117) Magalhães, J. M. C. S.; Machado, A. A. S. C. Array of Potentiometric Sensors for the Analysis of Creatinine in Urine Samples. *Analyst* **2002**, *127* (8), 1069–1075.
<https://doi.org/10.1039/B201173E>.
- (118) Thompson, H.; Rechnitz, G. A. Ion Electrode Based Enzymic Analysis of Creatinine. *Anal. Chem.* **1974**, *46* (2), 246–249. <https://doi.org/10.1021/ac60338a031>.
- (119) Ortiz, M.; Botero, M. L.; Fragoso, A.; O’Sullivan, C. K. Amperometric Detection of Creatinine in Clinical Samples Based on Gold Electrode Arrays Fabricated Using Printed Circuit Board Technology. *Electroanalysis* **2020**, *32* (12), 3054–3059.
<https://doi.org/10.1002/elan.202060446>.
- (120) Shih, Y.-T.; Huang, H.-J. A Creatinine Deiminase Modified Polyaniline Electrode for Creatinine Analysis. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *392* (2–3), 143–150.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00252-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00252-4).
- (121) Zhybak, M.; Beni, V.; Vagin, M. Y.; Dempsey, E.; Turner, A. P. F.; Korpan, Y. Creatinine and Urea Biosensors Based on a Novel Ammonium Ion-Selective Copper-Polyaniline Nano-Composite. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *77*, 505–511.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.009>.

- (122) Ozansoy Kasap, B.; Marchenko, S. V.; Soldatkin, O. O.; Dzyadevych, S. V.; Akata Kurc, B. Biosensors Based on Nano-Gold/Zelite-Modified Ion Selective Field-Effect Transistors for Creatinine Detection. *Nanoscale Res. Lett.* **2017**, 12 (1), 162. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-1943-x>.
- (123) Soldatkin, A. ; Montoriol, J.; Sant, W.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N. Development of Potentiometric Creatinine-Sensitive Biosensor Based on ISFET and Creatinine Deiminase Immobilised in PVA/SbQ Photopolymeric Membrane. *Mater. Sci. Eng. C* **2002**, 21 (1–2), 75–79. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00062-0).
- (124) Liu, Y.; Cánovas, R.; Crespo, G. A.; Cuartero, M. Thin-Layer Potentiometry for Creatinine Detection in Undiluted Human Urine Using Ion-Exchange Membranes as Barriers for Charged Interferences. *Anal. Chem.* **2020**, 92 (4), 3315–3323. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05231>.
- (125) Gaddes, D.; Reeves, W. B.; Tadigadapa, S. Calorimetric Biosensing System for Quantification of Urinary Creatinine. *ACS Sensors* **2017**, 2 (6), 796–802. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00161>.
- (126) Sarigul, N.; Korkmaz, F.; Kurultak, İ. A New Artificial Urine Protocol to Better Imitate Human Urine. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 20159. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56693-4>.
- (127) Kokkinos, C.; Prodromidis, M.; Economou, A.; Petrou, P.; Kakabakos, S. Quantum Dot-Based Electrochemical DNA Biosensor Using a Screen-Printed Graphite Surface with Embedded Bismuth Precursor. *Electrochem. commun.* **2015**, 60, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2015.08.006>.
- (128) *Eudragit L 100/ S 100, Specification Sheet.* <https://studylib.net/doc/25298564/evonik-eudragit-l-100-and-eudragit-s-100-specification-sheet> (accessed 2021-08-06).
- (129) *Creatinine Deiminase from Microorganism, Specification Sheet.* <http://www.toyobousa.com/enzyme-CNI-311.html> (accessed 2021-09-05).
- (130) Kaplan, L. A.; Pesce, A. J. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation, 3rd Ed.*; 1997. <https://doi.org/10.1093/clinchem/43.4.700>.
- (131) Boobphahom, S.; Siripongpreda, T.; Zhang, D.; Qin, J.; Rattanawaleedirojn, P.; Rodthongkum, N. TiO₂/MXene-PVA/GO Hydrogel-Based Electrochemical Sensor for Neurological Disorder Screening via Urinary Norepinephrine Detection. *Microchim. Acta* **2021**, 188 (11), 387. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04945-4>.
- (132) Ardeshiri, M.; Jalali, F. Highly Selective Electrode for Potentiometric Analysis of Methadone in Biological Fluids and Pharmaceutical Formulations. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, 63, 30–36. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.02.050>.
- (133) Malfertheiner, P.; Megraud, F.; O’Morain, C. A.; Gisbert, J. P.; Kuipers, E. J.; Axon, A. T.; Bazzoli, F.; Gasbarrini, A.; Atherton, J.; Graham, D. Y.; Hunt, R.; Moayyedi, P.; Rokkas, T.; Rugge, M.; Selgrad, M.; Suerbaum, S.; Sugano, K.; El-Omar, E. M. Management of Helicobacter Pylori Infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* **2017**, 66 (1), 6–30. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>.
- (134) McGowan, C.; Cover, T.; Blaser, M. Helicobacter Pylori and Gastric Acid: Biological and Therapeutic Implications. *Gastroenterology* **1996**, 110 (3), 926–938. <https://doi.org/10.1053/gast.1996.v110.pm8608904>.
- (135) Fischbach, W.; Malfertheiner, P. Helicobacter Pylori Infection. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2018**, 115 (25), 429–436. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0429>.
- (136) GADDIS, G.; GADDIS, M. Introduction to Biostatistics: Part 3, Sensitivity, Specificity, Predictive Value, and Hypothesis Testing. *Ann. Emerg. Med.* **1990**, 19 (5), 591–597. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(05\)82198-5](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(05)82198-5).

Περίληψη

Η ανάπτυξη ιατροδιαγνωστικών συσκευών για εφαρμογές στο σημείο περίθαλψης (Point-of-Care, PoC) αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη δημιουργία αποκεντρωμένων συστημάτων υγειονομικής περίθαλψης. Ωστόσο, το αυξημένο κόστος και οι πολύπλοκες διεργασίες που απαιτούνται για τη μετατροπή των ήδη υπαρχόντων τεχνολογιών σε συσκευές κατάλληλες για αναλύσεις πεδίου δυσχεραίνουν τη διαδικασία αυτή. Στην πρώτη ενότητα της διατριβής, περιγράφεται η ανάπτυξη μιας φορητής ιατροδιαγνωστικής συσκευής, την οποία ονομάζουμε BioPoC (από τα αρχικά των λέξεων Biosensor και Point-of-Care) που βασίζεται σε βιοαισθητήρες αποκρινόμενων πολυμερικών μεμβρανών και χαμηλού κόστους μεταλλάκτες μέτρησης χρόνου και ηλεκτρικής αντίστασης. Οι βιοαισθητήρες κατασκευάστηκαν με ενζυμικά τροποποιημένες μεμβράνες συμπολυμερούς με απόκριση στο pH. Η λειτουργία τους βασίζεται στη μέτρηση του χρόνου που απαιτείται ώστε η αρχικά άπειρη ηλεκτρική αντίσταση μεταξύ δύο αγωγίμων ταινιών που διαχωρίζονται από τη μεμβράνη, να λάβει μια πεπερασμένη τιμή, ως αποτέλεσμα της εκλεκτικής αποδόμησης της μεμβράνης από τον αναλύτη στόχο και την επαγόμενη πλήρωση ενός κάθετου καναλιού από το υγρό δείγμα, με την οποία επιτυγχάνεται η ηλεκτρική επικοινωνία μεταξύ των δύο αγωγίμων ταινιών. Ο χρόνος αυτός είναι ανάλογος της συγκέντρωσης του αναλύτη. Η συσκευή BioPoC χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ουρίας σε μη αραιωμένα ούρα χωρίς να προηγηθεί κάποιο στάδιο προκατεργασίας των δειγμάτων. Με την κατάλληλη επιλογή του πάχους της μεμβράνης και της συγκέντρωσης του πολυμερούς από το οποίο κατασκευάστηκε η μεμβράνη, η λειτουργία της συσκευής προσαρμόστηκε στο εύρος συγκεντρώσεων του αναλύτη στα ούρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν εξαιρετική εκλεκτικότητα στα διάφορα συστατικά της μήτρας του δείγματος και πολύ καλή συσχέτιση με τα αποτελέσματα της πρότυπης μεθόδου αναφοράς.

Στη δεύτερη ενότητα προτείνεται μία νέα συσκευή και ένας νέου τύπου βιοαισθητήρας, σε μορφή κάρτας SIM, που βασίζεται σε ένα κάθετο κανάλι ροής σε χαρτί τροποποιημένο με συμπολυμερή αποκρινόμενα στο pH. Ο βιοαισθητήρας ενσωματώθηκε σε μία συσκευή που έχει τη δυνατότητα απομακρυσμένης σύνδεσης με έξυπνα κινητά, και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης στα

ούρα. Αρχικά, ένα κάθετο μικρορευστομηχανικό κανάλι δημιουργήθηκε με την τεχνική εκτύπωσης κεριού σε ένα χρωματογραφικό χαρτί. Η υδρόφιλη επιφάνεια καλύφθηκε με το τυχαίο συμπολυμερές πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας)/πολυ(μεθακρυλικό οξύ) (PMMA-co-PMAA), ένα συμπολυμερές αποκρινόμενο στο pH. Για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης, στην επιφάνεια του συμπολυμερούς ακινητοποιήθηκε το ένζυμο δεϊμινάση της κρεατινίνης (creatinine deiminase, CD). Τα αποτελέσματα έδειξαν, αφενός, μηδενική ροή του δείγματος ούρων στο τροποποιημένο με το PMMA-co-PMAA κάθετο κανάλι ροής, απουσία του ενζύμου CD (αυτό αποδεικνύει τη μεγάλη εκλεκτικότητα της μεθόδου έναντι των συστατικών της μήτρας του δείγματος), και αφετέρου, τη ροή του δείγματος στο κανάλι μετά την αποδόμηση του συμπολυμερούς που προκαλείται από την ενζυμικά παραγόμενη αμμωνία κατά την εκλεκτική υδρόλυση της κρεατινίνης παρουσία του ενζύμου. Για την κατασκευή του βιοαισθητήρα το τροποποιημένο με CD/PMMA-co-PMAA χαρτί συνδυάστηκε με τρεις αγωγίμες ταινίες σε μία συστοιχία που επιτρέπει την αυτόματη έναρξη και παύση της λειτουργίας του χρονομέτρου, κατά την προσθήκη του δείγματος και στο τέλος της μέτρησης, αντίστοιχα. Ο χρόνος αυτός αντιστοιχεί στο χρόνο αποδόμησης του συμπολυμερούς και είναι ανάλογος της συγκέντρωσης της κρεατινίνης. Το κύκλωμα αυτόματης έναρξης και παύσης της λειτουργίας του χρονομέτρου βασίζεται σε μετρήσεις της ηλεκτρικής αντίστασης μεταξύ των τριών αγωγίμων ταινιών. Ο βιοαισθητήρας περιλαμβάνει ένα εσωτερικό μικροφρεάτιο για το δείγμα και ασύρματη επικοινωνία μέσω ενός μικροεπεξεργαστή, με Bluetooth®, που ελέγχει δυο κυκλώματα μέτρησης χρόνου και αντίστασης. Χρησιμοποιώντας νέα συμπολυμερή PMMA-co-PMAA σε διάφορα μέσα μοριακά βάρη κατά αριθμό ($\bar{M}_n$) και κλάσματα όγκου (f) μεταξύ των δυο μονομερών, τα οποία αποκρίνονται στο pH, επιτυγχάνονται ρυθμιζόμενες ιδιότητες αποδόμησης. Με την επιλογή του κατάλληλου συμπολυμερούς (f , $\bar{M}_n$ και συγκέντρωση του συμπολυμερούς) το εύρος ανίχνευσης ρυθμίστηκε στα 3-30 mM κρεατινίνης, το οποίο καλύπτει το φυσιολογικό εύρος της κρεατινίνης στα ούρα. Η συσκευή χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης στα ούρα.

Στην τελευταία ενότητα περιγράφεται η ανάπτυξη ενός αισθητήρα για την ανίχνευση του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού σε βιοπτικά δείγματα στομάχου, εφαρμόζοντας την τεχνολογία BioP^oC. Αξιοποιώντας το ένζυμο ουρεάση που

παράγεται από το βακτήριο, αναπτύχθηκε ένας αισθητήρας απόκρισης στις μεταβολές του pH, παρουσία διαλύματος ουρίας. Πραγματοποιήθηκε μελέτη διαφόρων συμπολυμερών απόκρισης στο pH, για την ανάπτυξη ενός ευαίσθητου αισθητήρα που θα ανιχνεύει το *H. Pylori*, ακόμη και σε πρώιμα στάδια της μόλυνσης. Η ανάλυση των βιοπτικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο σημείο εξέτασης του ασθενή, παρέχοντας τα αποτελέσματα σε χρόνο μικρότερο από 30 λεπτά. Τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα με αυτά που λήφθηκαν με τις μεθόδους αναφοράς και βρέθηκε ότι ο αισθητήρας BioPOC έχει ειδικότητα 92% και ευαισθησία 83%.

Summary

The development of medical diagnostic devices for point-of-care applications (PoC) is a key demand towards the establishment of decentralized health-care systems. The cost of miniaturized transducers, the need for elaborated modification of the sensing surface and the complexity of the assay workflow impede the widespread use of current biosensing technologies to PoC applications. In the first section, is described the development of a portable medical diagnostic device (we call it “BioPoC”), which employs free-standing enzyme-modified responsive polymer membrane-based biosensors and a newly devised low-cost transduction principle. The device includes a single vertical channel with an integrated sample dosing well. Its operation is based on the measurement of the time required the originally infinite electric resistance between two, separated by the enzyme-modified responsive polymer membrane, conductive strips to reach a finite value as a result of the target-triggered degradation of the polymer membrane and the ensuing vertical flow of the sample, which thus establishes an electrical communication between the conductive strips. The time is proportional to the concentration of the target. As part of the proof-of-concept, BioPoC device was employed for the determination of urea in undiluted human urine. By proper selection of the membrane thickness and concentration of copolymer, device operation was adjusted to the analyte concentration range in urine. Data demonstrate an outstanding selectivity against the components of the matrix, while the detection range can be tuned over the normal range of the analyte of interest.

In the second section, a SIM card-type pH responsive polymer-modified paper-based biosensing device, coupled to a smartphone, for the determination of urinary creatinine was developed. A vertical microfluidic channel was fabricated on a paper strip by wax printing. The hydrophilic area was coated by a poly(methylmethacrylate)/poly(methacrylic acid) random copolymer, PMMA-co-PMAA, and on top of it, creatinine deiminase (CD) was immobilized. Data demonstrated, on the one hand, zero vertical flow of urine through the enzyme-free PMMA-co-PMAA-modified paper strip, i.e., a high selectivity against the components of the matrix, and on the other hand, in the presence of CD, a creatinine -concentration dependent commence of sample’s downward flow due to the selective, creatinine-triggered degradation of the

copolymer by the enzymatically produced ammonia. This CD/ PMMA-co-PMAA paper-based biosensing smart assembly is coupled with three conductive strips, which enable the automatic on/off (sample addition/measurement end) measurement of the copolymer degradation time, through electric resistance measurements. It also features an in-built sample well and wireless communication support through the integration of a Bluetooth® microprocessor incorporated with time and resistance measuring circuits. Using newly synthesized pH responsive PMMA-co-PMAA at different molecular weights and volume fraction ratios offering tunable dissolution properties, the detection range was adjusted over 3–30 mM creatinine to overspread the normal range of creatinine in urine. The device was successfully applied to the determination of urinary creatinine.

In the last section, the development of a sensor for the detection of *Helicobacter pylori*, by applying the BioPoC technology, is described. Utilizing the enzyme urease produced by this bacterium, a sensor that responds to pH changes, in the presence of urea solution was developed. Various pH-responsive copolymers were examined to develop a sensitive sensor that would enable the detection H. Pylori, even at the early stages of infection. The examination of bioptic samples was performed at the patient's point of examination, providing results in less than 30 minutes. The results were comparable to those obtained by a commercial test (CLO) and the histologic examination. The specificity and the sensitivity of the BioPoC sensor were found to be 92% and 83%, respectively.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ–ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου: **Τ1ΕΔΚ-03341**)



ΕΡΕΥΝΩ
ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ



Δημοσιεύσεις

- **Eleni I. Tzianni**, Jan Hrbac, Dimitrios K. Christodoulou, Mamas I. Prodromidis, *A portable medical diagnostic device utilizing free-standing responsive polymer film-based biosensors and low-cost transducer for point-of-care applications*, Sensors and Actuators B: Chemical 304 (2020) 127356
- **Eleni I. Tzianni**, Ioannis Moutsios, Dimitrios Moschovas, Apostolos Avgeropoulos, Konstantinos Govaris, Lazaros Panagiotidis, Mamas I. Prodromidis, *Smartphone paired SIM card-type integrated creatinine biosensor*, Biosensors and Bioelectronics 207 (2022) 114204

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

- **Eleni Tzianni**, Mamas Prodromidis, *Portable Diagnostic Medical Devices Utilizing Free-standing Responsive Polymer Film-based Biosensors and Low-cost Transducers for Point-of-care Applications (BioPoC)* 11th International Conference on Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications (IMA 2019), 22-25 September 2019, Ioannina, Greece (oral presentation)
- **E. Tzianni**, M. Trachioti, A. Lazanas, A. Florou, Moutsios, D. Moschovas, A. Avgeropoulos, K. Govaris, L. Panagiotidis, S. Panagiotidou, M. Prodromidis, *A SIM Card-Type Biosensor for the Point-of-Care Determination of Creatinine in Urine*, Trends in Nanotechnology International Conference (TNT2021), 4-8 October 2021, Tirana, Albania (poster presentation)