ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών Τμήματος Χημείας Αναλυτική Χημεία, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος και Τροφίμων

Ηλεκτροχημική κυψελίδα όγκου μικρολίτρων αποτελούμενη από δυο αντικριστά εκτυπωμένα ηλεκτρόδια αργύρου για τον προσδιορισμό χλωριούχων στον ιδρώτα



Σταμάτης Αργυρούδης Χημικός

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

I Ω ANNINA, 2023

UNIVERSITY OF IOANNINA

School of Natural Science, Department of Chemistry Laboratory of Analytical Chemistry



Master program in Department of Chemistry Analytical Chemistry, Environmental and Food Chemistry and Technology

Two face-to-face silver screen-printed electrode-based cell integrating a microliter volume dosing well for the determination of chloride in sweat



Stamatis Argyroudis Chemist

Master Thesis submitted to the Department of Chemistry of the University of Ioannina

IOANNINA, GREECE, 2023

Αφιερώνεται στην οικογένειά μου, εξ αίματος και μη.

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική πειραματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος του τμήματος Χημείας κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβρης 2020 – Ιούλιος 2023.

Η εργασία αποτελείται από δύο μέρη: Στο θεωρητικό μέρος δίνονται εισαγωγικές έννοιες σχετικά με την ασθένεια της κυστικής ίνωσης, με ιδιαίτερη έμφαση στη διάγνωση αυτής, και περιγράφεται η εξέλιξη στο ερευνητικό πεδίο των φορετών αισθητήρων, από την ανάπτυξη και τον σχεδιασμό, μέχρι και τις εφαρμογές τους. Παράλληλα, δίνονται πληροφορίες για τη σημασία και τις προοπτικές του ιδρώτα ως βιοϋγρό για τη διάγνωση διάφορων ασθενειών.

Στο πειραματικό μέρος παρουσιάζεται η ανάπτυξη μίας ενσωματωμένης ηλεκτροχημικής κυψελίδας όγκου ενός μικρολίτρου αποτελούμενης από δυο εκτυπωμένα ηλεκτρόδια αργύρου για τον προσδιορισμό χλωριούχων στον ιδρώτα που αποτελούν βιοδείκτη της κυστικής ίνωσης.

Ωστόσο, όλα τα παραπάνω δεν πραγματοποιήθηκαν με ατομική εργασία, αλλά ομαδικά και συνεργατικά.

Πρώτον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Μάμαντο Προδρομίδη, για την ανελλιπή του καθοδήγηση, μέριμνα και επίβλεψη κατά την όλη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Πέραν όμως των γνώσεων που μοιράστηκε με εμένα, ο κύριος Προδρομίδης μου ενέπνευσε και εργασιακές δεξιότητες, όπως είναι η επιμονή, η σχολαστικότητα, η ευρηματικότητα και η φιλοπονία. Και πάνω από όλα, δε θα ξεχάσω την στήριξή του σε προσωπικό επίπεδο σε μία από τις δυσκολότερες περιόδους της ζωής μου.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διδάκτορες του εργαστηρίου, Λαζανά Αλέξανδρο, Τζιάννη Ελένη και Τραχιώτη Μαρία για την συνεργασία μας. Θαυμάζω τον ζήλο, την επιμονή και την φιλοπονία τους, και νιώθω τυχερός που με καθοδήγησαν με τόση υπομονή από την αρχή έως το τέλος τα μεταπτυχιακού μου, όπως και για τις γνώσεις που προσέφεραν. Πέρα από εξαιρετικοί συνεργάτες όμως, μου συμπαραστάθηκαν και εκτός των πλαισίων του μεταπτυχιακού. Με στήριξαν σε επίπεδο προσωπικό και φιλικό, κατά την διάρκεια περιόδων πολύ δύσκολων για εμένα, πράγμα για το οποίο νιώθω ειλικρινά ευγνώμων.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Άννα Χάλλα και τον κύριο Βασίλειο Χολέβα από την Παιδιατρική Κλινική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την εξαιρετική συνεργασία μας κατά τις δοκιμασίες ιδρώτα, για τη λήψη πραγματικών δειγμάτων ιδρώτα μέσω ιοντοφόρησης, για τις σημαντικές πληροφορίες και γνώσεις που μοιράστηκαν μαζί μου και την καλή τους διάθεση.

Έπειτα, θα ήθελα πολύ να ευχαριστήσω από καρδιάς τους φίλους μου, εντός και εκτός του εργαστηρίου, για όλα όσα έκαναν για εμένα γενικότερα, αλλά και ειδικότερα τον τελευταίο χρόνο. Ενώ γνωρίζουν όλοι πολύ καλά τον αγώνα που έκανα φέτος, πιθανά να μη γνωρίζουν πόσο με βοήθησαν να ανακάμψω. Είτε με στήριζαν με την παρουσία τους, είτε εξ αποστάσεως, είτε με μεγαλύτερη συχνότητα, είτε με μικρότερη, είμαι βέβαιος πως όλοι ανεξαιρέτως ενδιαφέρθηκαν πολύ για εμένα, και μοιράστηκαν τον πόνο μου, είτε φανερά είτε σιωπηλά. Μακάρι να μπορέσω κάποτε να ανταποδώσω την αγάπη και την στήριξή τους. Ακόμη και αν στο μέλλον, το οποίο πλησιάζει γρηγορότερα από ποτέ, χωρίσουν αναπόφευκτα οι δρόμοι μας και χαθούμε, εγώ θα τους θυμάμαι και θα τους ευχαριστώ όλους.

Ξεκινώντας από τον χώρο του εργαστηρίου, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις φίλες μου, Δήμητρα, Ελευθερία, Ήρα, Ιωάννα, Καλλιρρόη, Μαρία, Μαρία, Μυρτώ. Χάρη σε αυτές, η καθημερινότητά μου στο εργαστήριο απέκτησε διαφορετική χροιά, και χάρη σε αυτές ανακάλυψα πως ακόμη και σε μικρό χρονικό διάστημα, μπορεί τελικά κανείς να αναπτύξει πραγματικές σχέσεις φιλίας και εμπιστοσύνης, σαν να γνωριζόμασταν χρόνια.

Την ίδια στιγμή, είμαι πολύ ευγνώμων και για τους φίλους μου πέραν του εργαστηρίου, με τις σχέσεις μας να κρατάνε σταθερά από τα παιδικά και φοιτητικά χρόνια. Έτσι, σας ευχαριστώ πολύ Αγγελική, Αθηνά, Αλέξανδρε, Ανδρέα, Βασίλη, Γεωργία-Αύρα, Γιάννη, Δημήτρη, Δημήτρη, Δημήτρη, Ηρώ, Θανάση, Θοδωρή, Κυριάκο, Κωνσταντίνε, Μαρία-Μπέττυ, Μάξιμε, Νίκο, Τάσο, Φαίη, Χάρη, Χρήστο. Μακάρι να συνεχίσουμε για πολύ ακόμη.

Τέλος, και κυριότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου. Τον πατέρα μου, Γιώργο, που εδώ και δεκαετίες στέκεται «βράχος» σε κάθε δυσκολία, πάντα με προσωπικό τίμημα την ενέργειά του, και παρά τις δυσκολίες, βάζει ανελλιπώς σε προτεραιότητα την οικογένειά του. Την μητέρα μου, Ελένη, που δεσμεύεται να φροντίζει τους πάντες ανιδιοτελώς, και καταφέρνει ακόμη και σε καιρούς κρίσης να παραμένει ψύχραιμη, λογική και δίκαιη (συνήθως). Τέλος, ευχαριστώ πολύ τον αδερφό μου Θανάση για τα πολύ όμορφα παιδικά χρόνια που περάσαμε, και τα ακόμη πιο όμορφα χρόνια που θα περάσουμε. Η στήριξή σου είναι ειλικρινής και ανεκτίμητη. Σας ευχαριστώ πολύ και τους τρεις· χωρίς την φροντίδα και την αγάπη σας, ο τελευταίος χρόνος θα ήταν δύσκολος.

Σταμάτης Αργυρούδης Ιωάννινα, Ιούλιος 2023

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος		
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	5	
1. Κυστική ίνωση	7	
1.1 Παθολογική φυσιολογία της κυστικής ίνωσης	9	
1.2 Διάγνωση της κυστικής ίνωσης	11	
1.2.1 Κατευθυντήριες γραμμές στη διάγνωση της κυστικής ίνωσης	12	
1.2.2 Το τεστ ιδρώτα	14	
1.2.2.1 Τα ιόντα χλωρίου συγκριτικά με άλλους βιοδείκτες της CF στον ιδρώτα	16	
2. Φορετοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες	18	
2.1 Τεχνικές ανάλυσης στους φορετούς αισθητήρες και βιοαισθητήρες	20	
2.2 Παραδείγματα φορετών ηλεκτροχημικών αισθητήρων	21	
2.3 Φορετοί επιδερμικοί βιοαισθητήρες	24	
2.3.1 Ο ιδρώτας ως βιοϋγρό	25	
2.3.2 Υλικά κατασκευής	26	
2.3.3 Μικρορευστονικές διατάξεις (microfluidics)	27	
2.3.4 Τροφοδοσία και μεταφορά δεδομένων	28	
2.4 Φορετοί βιοαισθητήρες για το τεστ ιδρώτα	29	
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31	
1. Σκοπός της εργασίας	33	
2. Εισαγωγή	35	
3. Πειραματική πορεία	36	
3.1 Υλικά και αντιδραστήρια	36	
3.2 Οργανολογία	36	
3.3 Εκτύπωση ηλεκτροδίων αργύρου	37	
3.4 Κατασκευή και συναρμολόγηση της ηλεκτροχημικής διάταξης	39	
3.5 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων ιόντων χλωρίου σε τεχνητό ιδρώτα	40	
3.6 Δειγματοληψία ιδρώτα	40	
3.7 Μέθοδος αναφοράς	41	
3.8 Βαθμονόμηση του αισθητήρα και ανάλυση ιδρώτα	43	
4. Αποτελέσματα και συζήτηση	45	
4.1 Βολταμμετρική συμπεριφορά των εκτυπωμένων ηλεκτροδίων σε συμβατική κυψελίδα 2-ηλεκτροδίω	v 45	
4.2 Βολταμμετρική συμπεριφορά των εκτυπωμένων ηλεκτροδίων στην ενσωματωμένη κυψελίδα 2-ηλεκ	τροδίων 47	
4.3 Βολταμμετοική συμπεριφορά της ενσωματωμένης κυψελίδας 2-ηλεκτροδίων χρησιμοποιώντας εκτυπ	ωμένα	
ηλεκτρόδια Ag/AgCl ως ηλεκτρόδιο εργασίας ή/και ως αντισταθμιστικό	53	
4.4. Ηλεκτροχημική συμπεριφορά της κυψελίδας Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE	58	

4.5. Κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης και ανάλυση τεχνητών δειγμάτων 4.6 Παρεμποδίζοντα και ανάλυση βιολογικών δειγμάτων ιδρώτα	59 60
5. Συμπεράσματα	62
Βιβλιογραφία	65
Περίληψη	77
Abstract	79
Παρουσίαση σε διεθνή συνέδρια	81

Θεωρητικό Μέρος

1. Κυστική ίνωση

Η κυστική ίνωση, ή κυστική ινώδης νόσος, ή ινοκυστική νόσος (Cystic Fibrosis, CF) αποτελεί τη συχνότερη, θανατηφόρα αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσο, όπως και τη συχνότερη συγγενή πνευμονική νόσο, τόσο στην Αμερική, προσβάλλοντας περίπου 1 στα 4000 νεογνά, όσο και στην Ευρώπη, προσβάλλοντας 1 στα 2000 έως 3000 νεογνά, με το 4% του πληθυσμού του Ηνωμένου Βασιλείου να φέρει το γονίδιο [1]–[7]. Από το 1989, είναι γνωστό πως η CF αποτελεί μια πάθηση του διαύλου ιόντων, καθώς οφείλεται στη μετάλλαξη του γονιδίου του διαμεμβρανικού ρυθμιστή αγωγιμότητας της Κυστικής Ίνωσης (CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) [8]. Πλέον, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 2000 μεταλλάξεις, με το 10-15 % των οποίων να έχουν επιβεβαιωθεί ως αλληλόμορφα που προκαλούν CF [9].

Αν και δεν υπάρχει κάποια θεραπεία για την CF[10], το προσδόκιμο ζωής των ατόμων με CF έχει βελτιωθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες. Συγκεκριμένα, τα τελευταία 50 χρόνια, η μέση διάρκεια ζωής των ασθενών με CF έχει αυξηθεί από τα ~14 έτη στα 40 έτη (τα στοιχεία αφορούν την προηγούμενη δεκαετία) στις χώρες που έχουν καλά ανεπτυγμένο σύστημα υγείας, κάτι που αποδόθηκε στην πρώιμη διάγνωση, στην εξειδικευμένη περίθαλψη των ασθενών σε εξειδικευμένα κέντρα CF, όπως και στην πρόοδο της συμπτωματικής θεραπείας [11], [12]. Πλέον, σύμφωνα με την ετήσια αναφορά που δημοσιοποίησε το Βρετανικό Μητρώο της Κυστικής Ίνωσης (UK Cystic Fibrosis Registry) τον Δεκέμβριο του 2021 [13], την πενταετία 2016-2020, η μέση εκτιμώμενη διάρκεια ζωής των ασθενών με CF υπολογίζεται στα 50.6 έτη (47.0 για τις γυναίκες και 53.1 για τους άνδρες), γεγονός που αποτελεί σημαντικό κατόρθωμα της ιατρικής επιστήμης. Μάλιστα, το 60% του πληθυσμού που μελετήθηκε έχει ενηλικιωθεί, ενώ το 13.4% αυτού έχει ξεπεράσει τα 40 έτη ζωής, με την μέση ηλικία θανάτου να είναι τα 36 χρόνια. Δυστυχώς όμως, η πραγματικότητα στην Ελλάδα είναι διαφορετική. Σύμφωνα με την Ελληνική Εταιρεία για την Ινώδη Κυστική Νόσο, αν και δεν υπάρχει ολοκληρωμένη καταγραφή των ασθενών, το προσδόκιμο επιβίωσης εκτιμάται γύρω στα 20 με 25 έτη, με τον κυριότερο λόγο να είναι η έλλειψη υποδομών και εξειδικευμένων κέντρων, εξειδικευμένων γιατρών αλλά και η γενικότερη άγνοια για την αντιμετώπιση της νόσου[14].

Η Κυστική Ίνωση παρατηρείται ως επί το πλείστων στην καυκάσια φυλή [15], [16], καθιστώντας την ως την πλέον κοινή κληρονομική ασθένεια της φυλής. Εάν ανατρέξουμε στα δεδομένα της ετήσιας αναφοράς του Βρετανικού Μητρώου της Κυστικής Ίνωσης, το 2020, από

τα 9922 περιστατικά ασθενών με CF που καταγράφηκαν, το 92.6% άνηκε στην καυκάσια φυλή [13]. Αρκετές θεωρίες έγουν αναπτυχθεί για να εξηγήσουν αυτό το γεγονός. Μια ενδιαφέρουσα θεωρία αναφέρεται στην επιδημία της χολέρας που έπληξε την Ευρώπη από τον 19° και έπειτα. Η τοξίνη του μικροβίου της χολέρας, το οποίο προσδένεται στον γαστρεντερικό σωλήνα [17], οδηγεί στην παραγωγή αφύσικα υψηλών επιπέδων ενδοκυττάριου cAMP, το οποίο στην συνέχεια διατηρεί ενεργοποιημένο τον CFTR που βρίσκεται στα επιφανειακά εκκριτικά κύτταρα στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου. Αυτό έχει ως συνέπεια την διαρκή μεταφορά ηλεκτρολυτών μέσω του CFTR στο εσωτερικό του λεπτού εντέρου, παράλληλα με την μεταφορά νερού λόγω ωσμωτικών φαινομένων. Ως εκ τούτου και η χαρακτηριστική ωσμωτική διάρροια που προκαλεί η χολέρα [18], [19]. Στην συνέχεια της θεωρίας, οι ετεροζυγώτες φορείς του μεταλλαγμένου γονιδίου που προκαλεί την CF έγουν ~50% λειτουργικούς CFTR συγκριτικά με υγιή άτομα, με αποτέλεσμα να έχουν εξελικτικό πλεονέκτημα στη φυσική αντίσταση κατά της χολέρας, καθιστώντας πιθανότερη την επιβίωσή τους, όπως και τη δημιουργία απογόνων συνδυαστικά με την μεταβίβαση του γονιδίου της CF. Αν και η εν λόγω θεωρία φαντάζει λογική, οι πολέμιοι αυτής παρουσιάζουν ως αντεπιγείρημα την σχετικά πρόσφατη εμφάνιση της επιδημίας της χολέρας (μόλις πριν δύο αιώνες), συνδυαστικά με μια έρευνα[20] που απέδειξε πως ποντίκια με CF δεν παρουσίασαν γενετικό πλεονέκτημα έναντι της εκκριτικής διάρροιας[19]. Αν και πράγματι η χολέρα αποτελεί ιστορικά πρόσφατο γεγονός, ας ληφθεί υπόψη πως η Ευρώπη αντιμετώπιζε διαρροϊκές ασθένειες για πολλούς αιώνες, πολύ πριν την επέλαση της χολέρας, οι οποίες οφείλονταν και σε κοινά βακτήρια, όπως το Escherichia coli [21].

Ιστορικά, η καταγραφή της CF είχε ήδη ξεκινήσει τον 17° αιώνα, αναφέροντας πως η αλμυρότητα του δέρματος των βρεφών και μικρών παιδιών συσχετίζεται με τον πρόωρο θάνατο [21]. Μάλιστα, έχουν εντοπιστεί μεσαιωνικά γραπτά λαογραφικού περιεχομένου[22] που αναφέρονται στα παιδιά με αλμυρή γεύση δέρματος ως μαγεμένα. Γνωμικό της εποχής αντίστοιχου περιεχομένου είχε ως εξής: «Αλίμονο στο παιδί που το φιλί στο μέτωπό του έχει γεύση αλμυρή. Είναι μαγεμένο και σύντομα θα πεθάνει».

1.1 Παθολογική φυσιολογία της κυστικής ίνωσης

Ο CFTR απαντάται στα επιφανειακά κύτταρα διαφόρων ιστών, όπως αυτών των πνευμόνων, του εντέρου και του παγκρέατος, όπου λειτουργεί ως προσδετοελεγχόμενος δίαυλος ιόντων χλωρίου (με κύριο προσδέτη το cAMP). Η CF είναι πολυσυστηματική νόσος, καθώς η ελαττωματική, ή μη έκφραση του γονιδίου του CFTR έχει ως αποτέλεσμα παχύρευστες εκκρίσεις, με συνέπεια την ασθένεια και την προδιάθεση, μεταξύ άλλων, για πνευμονικές, παγκρεατικές και αναπαραγωγικές διαταραχές [7], [23]–[26].

Το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα επηρεάζεται συχνά από την κυστική ίνωση. Οι ρινικοί πολύποδες παρατηρούνται σε όλες τις ηλικίες, με την συχνότητά τους στα παιδιά να κυμαίνεται από 6.7% έως 20%[27], και καθώς οι ρινικοί πολύποδες είναι πολύ σπάνιοι σε φυσιολογικά παιδιά, η παρουσία τους θα μπορούσε να αποτελέσει ένα διαγνωστικό κριτήριο της νόσου σε αυτές τις ηλικιακές ομάδες[26]. Στους ενήλικες με CF, το 40% αναπτύσσει ρινικούς πολύποδες, και συχνά προκαλεί ρινική απόφραξη και διεύρυνση της ρινικής γέφυρας[26].

Η πλειοψηφία των ασθενών με CF πεθαίνει από πνευμονοπάθεια. Η μη φυσιολογική μεταφορά του χλωρίου μέσω των επιθηλιακών μεμβρανών συνεπάγεται τη δημιουργία ενός αφύσικα ιξώδους στρώματος βλέννας στους αεραγωγούς, με συνέπεια τη βακτηριακή μόλυνση, ιδιαίτερα με *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* και *Pseudomonas aeruginosa*[26], [28]. Παράλληλα, το 50–60% των ασθενών με CF παρουσιάζει μυκητίαση στους πνεύμονες εξαιτίας της εκτεταμένης βλάβης αυτών, όπως και λόγω της μακροπρόθεσμης θεραπείας με αντιβιοτικά [29], [30]. Έτσι, οι αεραγωγοί συνήθως πλήττονται χρονίως από βακτήρια που δεν μπορούν να εξαλειφθούν, οδηγώντας βαθμιαία σε επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, βρογχίτιδα, βρογχεκτασία και, τέλος, πνευμονική ίνωση με αναπνευστική ανεπάρκεια[28].

Τα περισσότερα προβλήματα υγείας που αφορούν την CF προκύπτουν ως αποτέλεσμα της αναπνευστικής ανεπάρκειας και της πνευμονικής υπέρτασης. Όσο αυξάνεται η διάρκεια ζωής των ασθενών, η πνευμονική καρδία συνήθως εμφανίζεται αργά κατά την πορεία της νόσου και με δυσκολία στην πρόγνωση[31]. Η νέκρωση και η ίνωση του μυοκαρδίου μπορεί να προκαλέσουν αιφνίδιο και απροσδόκητο θάνατο στη βρεφική ηλικία λόγω καρδιακής ανακοπής[26].

Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο παθολόγος μπορεί να κάνει διάγνωση της κυστικής ίνωσης στα έμβρυα κατά την αυτοψία, με τα προφανέστερα διαγνωστικά στοιχεία να εντοπίζονται στον

γαστρεντερικό σωλήνα ως παχιά βύσματα μηκωνίου που μπορεί να υπάρχουν ήδη από την 17η εβδομάδα κύησης [32]. Η απόφραξη από μηκώνιο μπορεί να εξελιχθεί σε ειλεό εκ μηκωνίου στον οποίο υπάρχει μηχανική απόφραξη του περιφερικού ειλεού, η οποία επηρεάζει το 17% των ασθενών με κυστική ίνωση κατά τη γέννηση [33]. Μεταγεννητικά, παθολογικές βλάβες μπορούν να εντοπιστούν σε όλο τον γαστρεντερικό σωλήνα. Στα προβλήματα του ανώτερου γαστρεντερικού περιλαμβάνονται η παλινδρόμηση και οισοφαγίτιδα με πεπτικό έλκος, ενώ οι ασθενείς με κυστική ίνωση διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν γαστρεντερικό αδενοκαρκίνωμα [26], [34], [35]. Τέλος, το 22% των ασθενών εμφανίζει πρόπτωση ορθού [36].

Οι ασθενείς με ΚΙ επίσης διατρέχουν τον κίνδυνο εμφάνισης παγκρεατίτιδας, καθώς παχύρρευστες εκκρίσεις φράζουν τους πόρους, με συνέπεια την αυτό-πέψη από παγκρεατικά ένζυμα[37]. Παράλληλα, η απόφραξη του παγκρεατικού πόρου έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη της εξωκρινούς παγκρεατικής ανεπάρκειας, μάλιστα από την βρεφική ή νεαρή ηλικία, και εκδηλώνεται κλινικά ως στεατόρροια, με το ~85% των ασθενών να παρουσιάζει σοβαρή απώλεια παγκρεατικού ιστού. Στα τελευταία στάδια της νόσου, η ενδοκρινική δυσλειτουργία του παγκρέατος προκαλεί σακγαρώδη διαβήτη. Επιπροσθέτως, σγεδόν όλοι οι άνδρες με κυστική ίνωση (>98%) πάσχουν από αποφρακτική αζωοσπερμία, λόγω της συγγενούς αμφοτερόπλευρης απουσίας των σπερματικών πόρων (Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens, CBAVD), με συνέπεια την στειρότητα, αν και στην πραγματικότητα οι εν λόγω άνδρες παράγουν φυσιολογικό σπέρμα[7], [25], [26], [38]-[40]. Στην περίπτωση των γυναικών με κυστική ίνωση, παρατηρείται υποθαλαμική αμηνόρροια λόγω διατροφικών ελλείψεων, η οποία συνδυαστικά με άλλους παράγοντες που προκαλούν στρες, μπορεί να προκαλέσει έως και ανωορρηξία[41], [42]. Ο ελαττωματικός CFTR στο επιθήλιο του τραχήλου οδηγεί στην παραγωγή παγύρευστης και αφυδατωμένης τραγηλικής βλέννας, η οποία φράσσει το τραγηλικό στόμιο, παρεμποδίζοντας την διέλευση του σπέρματος[43]-[46]. Στατιστικά, το 35% των γυναικών με κυστική ίνωση παρουσιάζει υπογονιμότητα ή στειρότητα[47].

Συνολικά, οι ασθενείς με CF πάσχουν από υποσιτισμό, ως συνέπεια της παθολογίας του γαστρεντερικού. Ως εκ τούτου, αντιμετωπίζουν προβλήματα μειωμένου βάρους και απώλειας μυών, είναι μετρίου αναστήματος, και ενδέχεται να αναπτύξουν έως και οστεοαρθρίτιδα, οστεοπόρωση, αβιταμίνωση, ακροδερματίτιδα και οπτική νευροπάθεια [26], [48]–[50].

1.2 Διάγνωση της κυστικής ίνωσης

Ο προσυμπτωματικός έλεγχος των νεογνών, ή προληπτικός έλεγχος των νεογνών, ή νεογνικός προσυμπτωματικός έλεγχος (Newborn Screening, NBS) εφαρμόζεται στα νοσοκομεία των ανεπτυγμένων χωρών εδώ και περίπου 60 έτη, έχοντας πλέον αναπτυχθεί σε ένα σύνθετο σύστημα δοκιμασιών που μπορεί να εντοπίσει περισσότερες από 50 διαφορετικές ασθένειες στα νεογνά και πραγματοποιείται μερικές ώρες ή μέρες έπειτα από την γέννηση [51], [52]. Παρόλα αυτά, η διάγνωση της CF στα νεογνά λαμβάνει χώρα στα νοσοκομεία μόλις από τις αρχές του 21^{ου} αιώνα [53].

Ο προληπτικός έλεγχος για τη διάγνωση ασθενειών σε νεογνά, διαφέρει για την εκάστοτε ασθένεια από χώρα σε χώρα, ακόμη και από νοσοκομείο σε νοσοκομείο. Στην περίπτωση της CF, η κοινή δοκιμή που εφαρμόζεται πάντα ως πρώτο στάδιο είναι ο προσδιορισμός του ανοσοαντιδραστικού τρυψινογόνου (Immunoreactive Trypsin, IRT) στο αίμα του νεογνού [54], ουσία που σχετίζεται με την παγκρεατική ανεπάρκεια, η οποία στα νεογνά συχνά απαντάται λόγω του ελλαττωματικού CFTR της CF[55]. Σε περίπτωση που τα επίπεδα IRT θεωρηθούν υψηλά (τα 60 ng/mL θεωρούνται οριακή τιμή στα περισσότερα συστήματα NBS) [54], [56], τότε ο προσυμπτωματικός έλεγχος της CF συνεχίζεται, και σε περίπτωση που το νεογνό σε κάθε στάδιο του εκάστοτε NBS παρουσιάζει μη φυσιολογικά αποτελέσματα, τότε ο NBS θεωρείται θετικός, και συνεχίζεται η διερεύνηση ύπαρξης της ασθένειας (ο θετικός NBS δεν ισοδυναμεί με θετική διάγνωση της CF).

Η σημαντικότητα του NBS γίνεται εύκολα κατανοητή εάν λάβουμε υπόψη τα δεδομένα του Μητρώου Ασθενών του Ιδρύματος Κυστικής Ίνωσης των Ηνωμένων Πολιτειών (US Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry), στο οποίο είναι καταγεγραμμένοι περισσότεροι από 27000 ασθενείς, και προκύπτει πως τα παιδιά που προσυμπτωματικά διαγνώστηκαν με CF τον πρώτο μήνα της ζωής τους, και συνεπώς την διαχειρίστηκαν πολύ νωρίς, επιβίωσαν περισσότερο από τους συμπτωματικούς διαγνωσθέντες [57]–[60].

1.2.1 Κατευθυντήριες γραμμές στη διάγνωση της κυστικής ίνωσης

Για πολλά χρόνια, η διάγνωση της CF βασιζόταν σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ασθενούς, συνδυαστικά με το συναφές κλινικό προφίλ και τη συμπτωματολογία[61], [62]. Την τελευταία δεκαετία όμως, λόγω της βελτίωσης των συστημάτων NBS, ο προσυμπτωματικός έλεγχος έχει αλλάξει σημαντικά τα δεδομένα της διάγνωσης της CF όπως αποδεικνύεται α) εάν λάβουμε υπόψη πως το 2021 στις ΗΠΑ, σχεδόν το 65% των νέων διαγνώσεων έγινε σε ασυμπτωματικά νεογνά [63] και β) από την αύξηση του αριθμού των διαγνώσεων της CF κάθε χρόνο και τη μείωση της ηλικίας διάγνωσης (Πίνακας 1).

Demographics ^A	2006	2011	2016	2020	2021
People with CF (n)		27,029	29,577	31,534	32,100
Newly diagnosed individuals (n) ⁸		991	994	820	779
Detected by newborn screening (NBS, %)		56.9	60.0	60.9	64.4
Median age at diagnosis for all people with CF (months)		5	4	3	3

Πίνακας 1. Σύνοψη του Μητρώου Ασθενών από το Ιδρυμα Κυστικής Ινωσης, 2006-2021 [63]

Παρόλα αυτά, η διάγνωση της CF παραμένει πρόκληση για την ιατρική κοινότητα, καθότι ακόμη και τώρα, η διάγνωση είναι αμφίβολη σε πολλές περιπτώσεις, με την ψευδώς αρνητική διάγνωση να εγκυμονεί κινδύνους για την υγεία των νεογνών[64]–[66].

Για την περαιτέρω διερεύνηση των δεδομένων σχετικά με τη διάγνωση της CF, το 2015, στην Αμερική, συγκροτήθηκε μία επιτροπή 32 γιατρών που αναγνωρίζονται ως «ειδικοί» στην CF, με σκοπό την αναθεώρηση και ανανέωση των έως τότε Συναινετικών Κατευθυντήριων Γραμμών (Consensus Guidelines) που πρότεινε το Ίδρυμα Κυστικής Ίνωσης[67]. Η εν λόγω επιτροπή εξέδωσε μια σειρά 27 συστάσεων σύμφωνα με τις οποίες, εάν ο ασθενής πληροί τα κριτήρια οποιασδήποτε από αυτές, ο γιατρός μπορεί με ασφάλεια να αποφανθεί για τη διάγνωση της CF. Συγκεκριμένα, οι συστάσεις της επιτροπής αφορούσαν τη διαδικασία διερεύνησης ύπαρξης της CF αφότου επιβεβαιωθεί ο θετικός NBS.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι τρεις βασικοί άξονες στη διάγνωση της CF μετά το θετικό νεογνικό προσυμπτωματικό έλεγχο, είναι <u>α) η συγκέντρωση του ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα, β)</u> <u>ο γενετικός έλεγχος του CFTR, και γ) η φυσιολογία του ασθενούς</u>. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν μερικές εκ των συστάσεων, οι οποίες αναφέρονται παρακάτω: «Σε άτομα που παρουσιάζουν θετικό NBS, συμπτώματα CF, ή θετικό οικογενειακό ιστορικό, η ταυτοποίηση 2 μεταλλάξεων που προκαλούν CF (περίπτωση που ορίζεται ως CFTR2) συνεπάγεται τη διάγνωση της CF. «Παρόλα αυτά, το τεστ χλωρίου στον ιδρώτα είναι απαραίτητο για την επιβεβαίωση της διάγνωσης», «Η μη ταυτοποίηση 2 μεταλλάξεων του CFTR που προκαλούν CF δεν εξαιρεί την διάγνωση της CF», και «Σε άτομα με θετικό νεογνικό προσυμπτωματικό έλεγχο αλλά με διάφορες ή μη καθορισμένες μεταλλάξεις του CFTR (<2 μεταλλάξεις που προκαλούν CF), η διάγνωση της CF μπορεί να πραγματοποιηθεί αποδεικνύοντας τη δυσλειτουργία του CFTR [δηλαδή εάν το χλώριο στον ιδρώτα είναι ≥60 mmol/L ή εάν οι μετρήσεις NPD (Nasal Potential Difference, ρινική διαφορά δυναμικού) ή ICM (Intestinal Current Measurement, μέτρηση του ρεύματος στο έντερο) είναι συνεπείς στην CF]» [67]. Από τις παραπάνω συστάσεις, μπορούμε να συμπεράνουμε πως η ύπαρξη των δύο αλληλόμορφων της μετάλλαξης του CFTR που προκαλεί CF δεν επαρκεί για τη διάγνωση της ασθένειας χωρίς συναφή φυσιολογικά ευρήματα, ενώ η μη ταυτοποίηση οποιασδήποτε μετάλλαξης που προκαλεί CF δεν αποκλείει την ύπαρξή της. Το μοναδικό εύρημα που αποδεικνύει τον προβληματικό CFTR και αναμφίβολα διαγιγνώσκει την CF είναι η ≥60 mM συγκέντρωση του ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα.

Από τότε που ξεκίνησε η μελέτη της κυστικής ίνωσης στα μέσα του 20^{ου} αιώνα, μόνο σε σπάνιες περιπτώσεις (1-2% των διαγνωσθέντων) έχει καταγραφεί συγκέντρωση ιόντων χλωρίου <60 mM στον ιδρώτα ασθενών με κυστική ίνωση[68], [69]. Ως εκ τούτου και η επιτροπή των «ειδικών» ισχυρίζεται πως η συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα <60 mM δεν αποκλείει την διάγνωση της κυστικής ίνωσης. Συνήθως όμως, για συγκεντρώσεις <30 mM δεν υπάρχει υποψία για CF, για συγκεντρώσεις 30-59 mM απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση[65], ενώ για συγκεντρώσεις ≥60 mM ο ασθενής πάσχει από CF[68], [69].

Οι επίσημα αποδεκτές τεχνικές προσδιορισμού των ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα είναι η κουλομετρία, η χρωματομετρία, και η ποτενσιομετρία με εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων[70], [71].

1.2.2 Το τεστ ιδρώτα

Το τεστ ιδρώτα είναι ένας γενικευμένος όρος που αναφέρεται στην ποσοτική ή ποιοτική ανάλυση του ιδρώτα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών και της αγωγιμότητας, με σκοπό πάντα τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης[72].

Το τεστ ιδρώτα αποτελείται από τρία στάδια: διέγερση της έκκρισης ιδρώτα, συλλογή και ανάλυση[72]. Όσον αφορά την έκκριση του ιδρώτα, σημαντική πρόοδος έγινε το 1959 όταν οι Gibson και Cooke πρότειναν την φαρμακευτικά προκαλούμενη εφίδρωση, η οποία περιλάμβανε την ιοντοφορητική μεταφορά της πιλοκαρπίνης διαδερμικά, διεγείροντας του ιδρωτοποιούς αδένες[73], μέθοδος που παραμένει μέχρι και σήμερα το πρότυπο στη νεογνική διάγνωση της CF[74].

Το κάθε κέντρο που διεξάγει το τεστ ιδρώτα επιλέγει μια από τις παραπάνω μεθόδους για τον προσδιορισμό των χλωριούχων. Στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, για παράδειγμα, ο προσδιορισμός των χλωριούχων γίνεται με τιτλοδότηση με νιτρικό υδράργυρο Hg(NO₃)₂ [75], [76]. Παράλληλα, υπάρχουν διάφοροι εμπορικά διαθέσιμοι αναλυτές. Συγκεκριμένα, η εταιρεία ELITechGroup διαθέτει στην αγορά τέσσερεις αναλυτές[77], οι οποίοι, συνοπτικά, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 και στο Σχήμα 1.

Πίνακας 2. Περιγραφή των αναλυτών της ELITechGroup, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ευρέως στα κέντρα διάγνωσης της κυστικής ίνωσης. Οι πληροφορίες ανακτήθηκαν από τα τεχνικά φυλλάδια των αναλυτών στην ιστοσελίδα της εταιρείας [77].

Προϊόν	Λειτουργία	Αρχή λειτουργίας
Macroduct Advanced® Sweat Collection System	Σύστημα έκκρισης και συλλογής ιδρώτα	Ηλεκτρονική συσκευή που παρέχει ρεύμα για την ιοντοφορητική μεταφορά της πιλοκαρπίνης. Στη συνέχεια, ο ιδρώτας που εκκρίνεται στην περιοχή της ιοντοφόρησης συλλέγεται σε ένα σπειροειδές τριχοειδές που εφάπτεται στο δέρμα.
Chlorochek® Chloridometer®	Ανάλυση του ιδρώτα	Συσκευή αυτοματοποιημένης κουλομετρικής ογκομέτρησης για δείγματα ιδρώτα 10 μL, με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης Cl ⁻ .
Nanoduct® Neonatal Sweat Analysis System	Σύστημα έκκρισης, συλλογής και ανάλυσης του ιδρώτα με έμφαση στη χρήση σε νεογνά	Πρόκειται για μία μικρού μεγέθους συσκευή που πραγματοποιεί την ιοντοφορητική μεταφορά της πιλοκαρπίνης, τη συλλογή του ιδρώτα, και την μεταφορά αυτού στη συσκευή, όπου λαμβάνει χώρα ο αγωγιμομετρικός προσδιορισμός των ηλεκτρολυτών του δείγματος σε συνεχή ροή (απαιτούνται τουλάχιστον 3 μL δείγματος).
Sweat-Chek TM Analyzer	Ανάλυση του ιδρώτα	Συσκευή προσδιορισμού της αγωγιμότητας του ιδρώτα. Σχεδιασμένη για να συνδέεται με το τριχοειδές του Macroduct®.



Σχήμα 1. A: Macroduct Advanced[®] Sweat Collection System (αναπαράσταση της ιοντοφόρησης), B: Συλλογή του ιδρώτα στο σπειροειδές τριχοειδές, C: Sweat-ChekTM Analyzer (μεταφορά του δείγματος από το τριχοειδές στη συσκευή), D: Chlorochek[®] Chloridometer[®], E: Nanoduct[®] Neonatal Sweat Analysis System[77].

1.2.2.1 Τα ιόντα χλωρίου συγκριτικά με άλλους βιοδείκτες της CF στον ιδρώτα

Όπως γίνεται εμφανές από την αρχή λειτουργίας των αναλυτών Nanoduct® και Sweat-ChekTM, η ανάλυση του ιδρώτα γίνεται με μετρήσεις αγωγιμότητας, οι οποίες δεν είναι εκλεκτικές στα ιόντα χλωρίου. Ωστόσο, καμία δημοσιευμένη κατευθυντήρια γραμμή δεν υποστηρίζει την αγωγιμότητα του ιδρώτα ως διαγνωστικό μέσο της κυστικής ίνωσης [70], [71], [78] και ως εκ τούτου οι παραπάνω αγωγιμομετρικές συσκευές ανάλυσης έχουν εγκριθεί μόνο για προληπτικό έλεγχο και όχι για τη διάγνωση της CF [79]. Σύμφωνα με το Ίδρυμα Κυστικής Ίνωσης των Ηνωμένων Πολιτειών, ασθενείς με αγωγιμότητα στον ιδρώτα που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ανιόντων ≥50 mM πρέπει να απευθυνθούν σε κάποιο πιστοποιημένο κέντρο CF για ποσοτικό προσδιορισμό των ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα [72], [79], [80].

Στον αντίποδα, έρευνες υποδεικνύουν πως η μέτρηση της αγωγιμότητας θα μπορούσε να αποτελεί αυτόνομο τεστ [81], [82]. Πρακτικά, αυτό ήδη συμβαίνει, καθώς το Nanoduct® (το οποίο βασίζεται στην αγωγιμομετρία) χρησιμοποιείται σε διαγνωστικά κέντρα εδώ και σχεδόν δύο δεκαετίες[83]. Παρόλα αυτά, πενταετής στατιστική μελέτη που έλαβε χώρα το 2018 στην Ελβετία[84], σύγκρινε τον κουλομετρικό προσδιορισμό των ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα (χρησιμοποιώντας το Macroduct® για έκκριση και συλλογή) με τον αγωγιμομετρικό προσδιορισμό που εκτελεί το Nanoduct®. Το δείγμα του πληθυσμού ήταν 445 νεογνά, και τα αποτελέσματα είχαν ως εξής. Και οι δύο μέθοδοι είχαν εξίσου καλή ευαισθησία (sensitivity) (κουλομετρικός προσδιορισμός 99%, Nanoduct® 98%), αλλά ο κουλομετρικός προσδιορισμός (μετά τη συλλογή με το Macroduct®) υπερτερούσε όσον αφορά την ειδικότητα (specificity) (κουλομετρικός προσδιορισμός 93%, Nanoduct® 79%).

Παράλληλα, τα ιόντα νατρίου στον ιδρώτα θα μπορούσε πιθανά να αποτελεί βιοδείκτη της CF, καθώς επίσης παρατηρείται σε αυξημένες συγκεντρώσεις, αλλά συγκριτικά με τα ιόντα χλωρίου δεν παρουσιάζουν ικανοποιητική διακριτική ικανότητα στη διάγνωση της CF και ως εκ τούτου δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως αυτόνομο τεστ [71], [72].

Εν κατακλείδι, οι υπάρχουσες κατευθυντήριες γραμμές κάνουν ξεκάθαρο το εξής. Για τη διάγνωση της CF μέσω του ιδρώτα, η συλλογή πρέπει να γίνεται είτε σε γάζα ή διηθητικό χαρτί, είτε σε τριχοειδές Macroduct® [85] έπειτα από εφίδρωση με ιοντοφόρηση με πιλοκαρπίνης, ενώ στον ιδρώτα πρέπει να πραγματοποιείται ποσοτική ανάλυση αποκλειστικά για το προσδιορισμό των ιόντων χλωρίου [86] με τις εξής μεθόδους: (α) κουλομετρική τιτλοδότηση με τη χρήση χλωριδόμετρου, (β) άμεση τιτλοδότηση με νιτρικό υδράργυρο Hg(NO₃)₂ (μέθοδος των Schales και Schales [76]), και (γ) χρήση αυτόματων αναλυτών οι οποίοι χρησιμοποιούν εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων και έχουν συστηματικά επικυρωθεί με τις μεθόδους αναφοράς (α) και (β).

2. Φορετοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες

Οι φορετοί (wearable) αισθητήρες αποτελούν έναν αναδυόμενο τεχνολογικό κλάδο που παρέχει μια μοναδική εναλλακτική στη συνεχή, μη επεμβατική παρακολούθηση διάφορων φυσικοχημικών παραμέτρων, σε διάφορα πεδία, όπως είναι η εξατομικευμένη ιατρική, ο αθλητισμός, η στρατιωτική ετοιμότητα, το περιβάλλον, τα τρόφιμα και η εγκληματολογία [87]–[96].

Στην περίπτωση της εξατομικευμένης ιατρικής και προσωπικής κλινικής παρακολούθησης, η οποία λαμβάνει χώρα εκτός νοσοκομείων και πολλές φορές διεξάγεται από τον ίδιο τον ασθενή, η χρήση των βιοαισθητήρων έχει επιτρέψει την έγκαιρη διάγνωση ασθενειών, επιταχύνοντας την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, επιτρέποντας παράλληλα την παρακολούθηση της πορείας της[95], [96]. Τυπικό παράδειγμα συσκευής εξατομικευμένης ιατρικής είναι ο αισθητήρας γλυκόζης, ο οποίος έχει συμβάλλει αδιαμφισβήτητα στη βελτίωση της κατ'οίκον φροντίδας των διαβητικών, μειώνοντας παράλληλα το κόστος για την παρακολούθηση της υγείας, και αυξάνοντας το προσδόκιμο ζωής [95].

Για να κατανοήσουμε καλύτερα τη σημαντικότητα των φορετών αισθητήρων στην εξατομικευμένη ιατρική, μπορούμε να τους ορίσουμε ως συσκευές που μπορούν να φορεθούν από οποιονδήποτε και έχουν την ικανότητα για in situ μικροανάλυση χρησιμοποιώντας χημικές ή φυσικές τεχνικές, δίχως να υπάρχει ανάγκη οποιασδήποτε εξωτερικής κατεργασίας του προς ανάλυση δείγματος. Με άλλα λόγια, η συνολική προετοιμασία που πρέπει να γίνει στο δείγμα πραγματοποιείται στην ίδια την συσκευή, χωρίς να επέμβει ο χρήστης[95]. Έτσι, γίνεται αντιληπτό πως η lab-on-the-skin τεχνολογία των φορετών αισθητήρων θα μπορούσε μελλοντικά να αποδειχθεί ζωτικής σημασίας σε περιπτώσεις ατόμων που είτε είναι ηλικιωμένα, είτε έχουν κάποια μορφή αναπηρίας, είτε ζούνε σε απομακρυσμένες περιοχές όπου οι υποδομές υγείας είναι περιορισμένες. Κατανοούμε λοιπόν πως η συνεισφορά της εν λόγω τεχνολογίας στην ανθρώπινη υγεία είναι αδιαμφισβήτητη, ως εκ τούτου και η επιστημονική κοινότητα έχει δείξει σημαντικό ενδιαφέρον για τους φορετούς αισθητήρες από την προηγούμενη δεκαετία, όπως φαίνεται στα Σχήματα 2 και 3. Σύμφωνα με την έρευνα της εταιρείας Grand View Research Inc., η αγορά των φορετών αισθητήρων υπολογίζεται να φτάσει τα 2.86 δισεκατομμύρια δολάρια το 2025, ενώ εταιρείες όπως η Apple® και η Google® δραστηριοποιούνται ενεργά στην έρευνα και ανάπτυξη φορετών αναλυτικών συσκευών [97].



Σχήμα 2. Δημοσιεύσεις σχετικές με φορετούς αισθητήρες ανά έτος, από το 2000 έως το 2022. Τα αποτελέσματα ανακτήθηκαν από την αναζήτηση του όρου «wearable sensors» στο Scopus[®].



Σχήμα 3. Ποσοστό δημοσιεύσεων ανά επιστημονικό πεδίο σχετικά με φορετούς αισθητήρες, από το 2000 έως το 2022. Τα αποτελέσματα ανακτήθηκαν από την αναζήτηση του όρου «wearable sensors» στο Scopus[®].

Μέσα στα χρόνια, έχουν προταθεί πολυάριθμες ιδέες για τη μορφή που μπορεί να έχει ένας φορετός αισθητήρας. Έτσι, γάντια, προσωρινά τατουάζ, προστατευτικές οδοντοστοιχίες, φακοί επαφής, περικάρπια, έξυπνοι επίδεσμοι και υφάσματα είναι μόλις μερικά παραδείγματα φορετών αισθητήρων, με το καθένα να εξειδικεύεται σε διαφορετικές εφαρμογές και να προκύπτει με διαφορετικές μεθόδους κατασκευής [95], όπως εκτύπωση βάσει περιγράμματος (template based methods), μεταξοτυπία (screen printing) [98], εκτύπωση βαθυτυπίας με ρολά (roll-to-roll gravure printing)[99], μεταφορά σφραγίδας (stamp transfer)[100], εκτύπωση με εκτόξευση μελάνης (inkjet printing)[101], 3D εκτύπωση[102], και λιθογραφία[103].

2.1 Τεχνικές ανάλυσης στους φορετούς αισθητήρες και βιοαισθητήρες

Σημαντική προϋπόθεση κατά τη λειτουργία ενός φορετού (βιο)αισθητήρα, και μάλιστα ενός που έρχεται σε άμεση επαφή με το δέρμα, είναι η γρήγορη ανταπόκριση, η υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, η σταθερότητα υπό διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, και η εξοικονόμηση ενέργειας [96]. Αρκετές τεχνολογίες που βασίζονται σε ηλεκτροχημικές και οπτικές τεχνικές ικανοποιούν αυτά τα κριτήρια[96].

Ηλεκτροχημικές τεχνικές, όπως η αμπερομετρία, η ποτενσιομετρία, η βολταμμετρία και η αγωγιμομετρία χρησιμοποιούνται ευρέως [96], ενώ παράλληλα, η πρόοδος στον τομέα της νανοτεχνολογίας[104]–[107] επιτρέπει την κατασκευή αναλυτικών συσκευών μικρού μεγέθους και με μεγάλη ευαισθησία στους βιοδείκτες του ιδρώτα, οι οποίοι τυπικά απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις [108], [109].

Η αμπερομετρία είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό διαφόρων βιοδεικτών, καθώς πολλοί εκ των οποίων είναι οξειδοαναγωγικές ουσίες οι οποίες ανάγονται ή οξειδώνονται σε δυναμικά χαμηλότερα από αυτά της ηλεκτρόλυσης του νερού υπό την παρουσία ανόργανων ή/και βιοχημικών καταλυτών[96]. Η ποτενσιομετρία χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό ουσιών οι οποίες είτε δεν έχουν οξεοδοαναγωγικές ιδιότητες ή τα δυναμικά οξειδοαναγωγής τους υπερβαίνουν αυτό της ηλεκτρόλυσης του νερού. Τέλος, η βολταμμετρία παρέχει μετρήσεις με υψηλή ευαισθησία και επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ουσιών[93], [110]–[115] Ένα σημαντικό πρόβλημα στην ανάπτυξη φορετών αισθητήρων αποτελεί, πρώτον, η δυσκολία ενσωμάτωσης των ηλεκτρονικών κυκλωμάτων που απαιτούνται για τη λειτουργία τους ώστε η συνολική συσκευή να είναι μικρή, ασφαλής και άνετη, δεύτερον, η ενεργειακή αυτονομία της συσκευής, και τρίτον, στην περίπτωση των φορετών συσκευών που έρχονται σε άμεση επαφή με το δέρμα ή το σώμα, η ακριβής και επαναλήψιμη συλλογή του δείγματος (π.χ. ιδρώτα, σάλιου, δάκρυ) [96].

Οι οπτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή των φορετών αισθητήρων, είναι η χρωματομετρία και φθορισμομετρία. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται επίσης διάφοροι οπτικοί φορετοί αισθητήρες οι οποίοι προσδιορίζουν τη γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ, τα ιόντα χλωρίου, τον ψευδάργυρο κ.λπ σε διάφορα βιολογικά δείγματα [116], [117].

2.2 Παραδείγματα φορετών ηλεκτροχημικών αισθητήρων

To 2018, o J. Wang και οι συνεργάτες του[118] ανέπτυξαν έναν φορετό επίδεσμο, επικαλυμμένο εσωτερικά με ηλεκτροχημικό αισθητήρα της μορφής συστοιχίας μικροβελόνων (Microneedle Array, MNA), με σκοπό την παρακολούθηση μελανωμάτων.

Στην περίπτωση αυτή αναφερόμαστε σε ένα διαδερμικό βιοαισθητήρα (transdermal biosensor), ο οποίος πραγματοποιεί *in vivo* ηλεκτροχημικές αναλύσεις σε δείγμα μεσοκυττάριου υγρού. Συγκεκριμένα, είναι μία άμεση ανάλυση μεσοκυττάριου υγρού, καθώς προσδιορίζεται ποσοτικά, *in situ*, ένας αναλύτης με ελάχιστα επεμβατικό τρόπο (Σχήμα 4). Ο βιοδείκτης-στόχος στην προκειμένη περίπτωση ήταν η ενεργότητα του ενζύμου τυροσινάση (TYR), η οποία συμβάλλει στη σύνθεση της μελανίνης, και σε περίπτωση υπερέκφρασης και συσσώρευσής της στο δέρμα, πιθανά συνεπάγεται το δερματικό μελάνωμα [119], [120].

Η λειτουργία του φορετού αισθητήρα βασίστηκε στην οξείδωση της κατεχόλης (υπόστρωμα της τυροσινάσης) που ήταν παγιδευμένη σε επίστρωση από άγαρ που κάλυπτε τις μικροβελόνες, προς βενζοκινόνη, η οποία στη συνεχεία ανάγονταν σε δυναμικού -0.25 V, και το παραγόμενο ρεύμα μετρούνταν αμπερομετρικά.



Σχήμα 4. Απεικόνιση του διαδερμικού αισθητήρα μικροβελόνων ανίχνευσης του βιοδείκτη μελανωμάτων TYR [118].

To 2017, η J.R. Semptionatto και οι συνεργάτες της [121], ανέπτυξαν έναν ασύρματο φορετό χημικό αισθητήρα πολλαπλών εφαρμογών, υπό την μορφή δαχτυλιδιού, για την ταχεία ηλεκτροχημική παρακολούθηση εκρηκτικών υλών και βλαβερών για το νευρικό σύστημα ουσιών, σε αέρια και υγρή φάση (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Φορετός αισθητήρας-δαχτυλίδι με εκτυπωμένα ηλεκτρόδια και ενσωματωμένο ηλεκτρονικό κύκλωμα για τον προσδιορισμό εκρηκτικών ουσιών στην αέρια ή υγρή φάση [121]

To 2019, ο A. Barfidokht και οι συνεργάτες του[122] πρότειναν έναν ηλεκτροχημικό φορετό αισθητήρα-γάντι για τον προσδιορισμό της φαιντανύλης (fentanyl), ενός ισχυρού συνθετικού οπιοειδούς (Σχήμα 6). Τα ηλεκτρόδια εκτυπώθηκαν με μεταξοτυπία πάνω σε γάντι νιτριλίου, στο δείκτη, ενώ πάνω στον αντίχειρα είχε ακινητοποιηθεί το ιοντικό υγρό που λειτουργούσε ως ηλεκτρολύτης. Έτσι, με τον δείκτη λαμβάνεται ποσότητα δείγματος από την ύποπτη σκόνη ή υγρό, και στη συνέχεια, ενώνοντας το δείκτη με τον αντίχειρα, σχηματίζεται η ηλεκτροχημική κυψελίδα στην οποία πραγματοποιούνται βολταμμετρικές μετρήσεις τετραγωνικού παλμού για την οξείδωση της φαιντανύλης με όριο ανίχνευσης 10 μmol L⁻¹.



Σχήμα 6. Σχηματική απεικόνιση της ανάλυσης δειγμάτων ύποπτης πούδρας μέσω του φορετού αισθητήραγάντι από νιτρίλιο. (a) Στην επιφάνεια του δείκτη έχει η ηλεκτροχημική κυψελίδα, ενώ στον αντίχειρα έχει ακινητοποιηθεί αγώγιμη γέλη, (b) συλλογή δείγματος πούδρας με την κίνηση του δείκτη απευθείας πάνω στο ηλεκτρόδιο, (c) σχηματισμός της ηλεκτροχημικής κυψελίδας με την επαφή δείκτη (που περιέχει τα ηλεκτρόδια) – αντίχειρα (που είναι επικαλυμμένος με τον ηλεκτρολύτη) [122]

Το 2018 ο Υ. Lee και οι συνεργάτες του[123] σχεδίασαν έναν φορετό ποτενσιομετρικό αισθητήρα, εφαρμοζόμενο στη στοματική κοιλότητα υπό την μορφή οδοντοστοιχίας για τον προσδιορισμό ιόντων νατρίου στον σίελο και τον έλεγχο της υπέρτασης (Σχήμα 7). Ο αισθητήρα δοκιμάστηκε σε εθελοντές για τον έλεγχο της πρόσληψης νατρίου από την τροφή, σε πραγματικό χρόνο.



Σχήμα 7. Ασύρματος αισθητήρας εφαρμοζόμενος στην στοματική κοιλότητα για ποσοτικοποίηση του προσλαμβανόμενου νατρίου σε πραγματικό χρόνο [123]

2.3 Φορετοί επιδερμικοί βιοαισθητήρες

Το ανθρώπινο δέρμα, όντας το μεγαλύτερο και πλέον προσβάσιμο όργανο του ανθρώπινου σώματος, περιέχει βιολογικά υγρά πλούσια σε βιοδείκτες, οι οποίοι αποδεικνύονται χρήσιμοι όχι μόνο στη διάγνωση και παρακολούθηση συγκεκριμένων ασθενειών, αλλά και στην παρακολούθηση της γενικότερης κατάστασης της υγείας ενός ατόμου [124].

Οι εν λόγω βιοδείκτες μπορούν να εντοπισθούν σε διάφορα σωματικά υγρά, η δειγματοληψία ορισμένων όμως, όπως το αίμα, δεν είναι πάντοτε συμβατή με τους φορετούς βιοαισθητήρες, καθώς απαιτείται η διάτρηση της επιδερμίδας [125].

Ως εκ τούτου, η ανάγκη για μη επεμβατικές (non invasive), ή ελάχιστα επεμβατικές (minimally invasive) μεθόδους δειγματοληψίας έχει στρέψει το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια στην ανάλυση βιοϋγρών που εκκρίνονται υπό φυσιολογικές συνθήκες στο δέρμα, όπως είναι ο ιδρώτας και τα δάκρια (μη επεμβατική ανάλυση), όπως σε άλλα εύκολα προσβάσιμα βιοϋγρά, όπως είναι το μεσοκυττάριο υγρό (ελάχιστα επεμβατική ανάλυση) [96] (Σχήμα 8).

Παρόλα αυτά, κατά την κατασκευή ενός αξιόπιστου επιδερμικού αισθητήρα ο οποίος θα μπορεί να αναλύει ποσοτικά τα ανωτέρω δείγματα, συναντάει κανείς σημαντικές προκλήσεις. Σε αυτές συγκαταλέγεται ο τρόπος με τον οποίο θα έχουμε πρόσβαση στο βιοϋγρό, η μέθοδος συλλογής του και η μεταφορά στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα. Βεβαίως, πρέπει να ληφθούν υπόψη και επιπλέον παράγοντες, όπως η καλή εφαρμογή του αισθητήρα στις κυρτές επιφάνειες (π.χ. του δέρματος) και η στόμωση της επιφάνειας του αισθητήρα από τα συστατικά των αντίστοιχων βιολογικών δειγμάτων (κυρίως μεγαλομόρια, όπως οι πρωτεΐνες).



Σχήμα 8. Γραφική απεικόνιση των στιβάδων της επιδερμίδας. Φορετοί αισθητήρες μπορούν να εφαρμόζονται επιδερμικά (πχ μορφής προσωρινού τατουάζ), επιτελώντας μη επεμβατικές αναλύσεις στον ιδρώτα, ή διαδερμικά (πχ μορφής συστοιχίας μικροβελόνων) επιτελώντας ελαχίστως επεμβατικές αναλύσεις στο μεσοκυττάριο υγρό [124]

2.3.1 Ο ιδρώτας ως βιοϋγρό

Η πλούσια σύστασή του σε ηλεκτρολύτες, μεταβολίτες, βιταμίνες, αμινοξέα, μέταλλα κ.α[109], συνδυαστικά με την ευκολία της μη επεμβατικής συλλογής του κατά την έκκριση από τους πόρους του δέρματος, έχουν καταστήσει τον ιδρώτα ως ένα βιολογικό υγρό με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην έρευνα των επιδερμικών αισθητήρων τα τελευταία χρόνια [126].

Ο ιδρώτας είναι ένα δυναμικό βιοϋγρό με τιμές pH από 4.5 έως 8.0[88], ενώ η σύσταση του εξαρτάται τόσο από το μέρος του σώματος όπου εκκρίνεται όσο και από τον τρόπο παραγωγής του (άσκηση, θέρμανση, ή χημική διέγερση των αδένων). Επιπλέον, η σύσταση του ιδρώτα επηρεάζεται από την διατροφή και την πρόσληψη φαρμακευτικών ουσιών [125].

Το ανθρώπινο εκκριτικό σύστημα αποτελείται από ένα σύνολο αδένων που εκκρίνουν ιδρώτα στην επιφάνεια του δέρματος υπό τον έλεγχο του συμπαθητικού νευρικού συστήματος[116]. Η ανθρώπινη επιδερμίδα περιέχει περίπου 200 εκκρινείς αδένες ανά cm² σε μεγάλη έκταση του σώματος[127], με πυκνότητες που διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με την ανατομική περιοχή[128]. Έτσι, μπορούμε εύκολα, και μη επεμβατικά, να έχουμε παραγωγή ιδρώτα είτε μέσω φυσικής εφίδρωσης, η οποία προκύπτει με την σωματική άσκηση ή τη θέρμανση, είτε μέσω εξαναγκασμένης εφίδρωσης, με ιοντοφόρηση. Η ιοντοφόρηση είναι μια διεργασία που επιτρέπει τη διαδερμική μεταφορά μίας ουσίας χρησιμοποιώντας ηλεκτρικό ρεύμα. Έτσι, μπορεί να αξιοποιηθεί για τη μεταφορά κάποιου χολινεργικού αγωνιστή (π.χ. η πιλοκαρπίνη) με αποτέλεσμα την τοπική παραγωγή ιδρώτα[125] (Σχήμα 9). Ιδρωτοποιοί αδένες που διεγείρονται από χολινεργικούς αγωνιστές απαντώνται σε διάφορες περιοχές της επιδερμίδας, με αποτέλεσμα να υπάρχει ευκολία στην επιλογή της περιοχής που θα τοποθετήσουμε τον επιδερμικό βιοαισθητήρα [88].



Σχήμα 9. Σχηματική απεικόνιση εκκρίσεως ιδρώτα με ιοντοφόρηση [125]

2.3.2 Υλικά κατασκευής

Η ανθρώπινη επιδερμίδα είναι μαλακή, κυρτή και παραμορφώσιμη[129], με αποτέλεσμα στην περίπτωση των επιδερμικών αισθητήρων να υπάρχει ανάγκη από συσκευές αποτελούμενες από υλικά συμβατά με το δέρμα, δηλαδή υλικά που να μην προκαλούν δυσφορία και ερεθισμούς, ενώ από μηχανική άποψη να είναι εύκαμπτα, προσαρμόσιμα και με υψηλή μηχανική αντοχή[96], όπως τα εύκαμπτα πλαστικά, τα υφάσματα και τα ελαστομερή[130] (Σχήμα 10).

Στα εύκαμπτα πλαστικά ανήκουν τα PET, PI, PE και τα χαρτιά προσωρινών τατουάζ, που είναι λεπτές, εύκαμπτες πλαστικές μεμβράνες πάνω σε χάρτινο υπόστρωμα το οποίο απομακρύνεται μετά την εφαρμογή [96]. Τα υφάσματα είναι πολύ περισσότερο συμβατά από τα εύκαμπτα πλαστικά και προσφέρουν καλύτερη διαπνοή, ενώ μπορούν να ενσωματωθούν σε είδη ένδυσης. Η πρώτη ύλη των υφασμάτων αποτελείται από φυσικά (π.χ βαμβάκι, μετάξι, μαλλί ζώων) και συνθετικά υλικά (π.χ νάιλον, πολυεστέρας, σπαντέξ)[96]. Τα λεπτά, μαλακά, βιοσυμβατά ελαστομερή αντιπροσωπεύουν μία σχεδόν ιδανική κατηγορία υλικών κατασκευής επιδερμικών φορετών βιοαισθητήρων. Παραδείγματα ελαστομερών είναι οι σιλικόνες [131], πολυουρεθάνες, και διάφορα συμπολυμερή [96].



Σχήμα 10. Παραδείγματα φορετών αισθητήρων σε (a) εύκαμπτα υλικά, (b) υφάσματα και (c) ελαστομερή.

2.3.3 Μικρορευστονικές διατάξεις (microfluidics)

Πρόσφατες μελέτες παρουσιάζουν μικρορευστονικές διατάξεις, ενσωματωμένες σε λεπτές, μαλακές, συμβατές με το δέρμα μορφές που επιτυγχάνουν τη συλλογή του ιδρώτα και τη μεταφορά του στο σημείο της ανάλυσης μέσω βαλβίδων, διαχωριστών και δεξαμενών[96]. Οι μικρορευστονικές διατάξεις απομονώνουν τον ιδρώτα από το δέρμα τη στιγμή που εμφανίζεται

στην επιδερμίδα, ενώ με τη μεταφορά του στο σημείο μέτρησης, προστατεύεται, έως κάποιο βαθμό, η στόμωση της επιφάνειας του αισθητήρα[96].

Ο σχεδιασμός και οι διαστάσεις των σημείων εισόδου/εξόδου, η γεωμετρία των καναλιών, και η κατάλληλη επιλογή των υλικών αποτελούν σημαντικές παραμέτρους που διασφαλίζουν τη σωστή παροχή του ιδρώτα μέσα στη συσκευή αξιοποιώντας τη φυσιολογική πίεση με την οποία εκκρίνεται από τους αδένες στο δέρμα[127] χωρίς να απαιτείται η χρήση εξωτερικών μηχανικών διατάξεων, π.χ. αντλίας. Ο απλούστερος σχεδιασμός μικρορευστονικών διατάξεων περιλαμβάνει ένα μόνο κανάλι, άμεσα συνδεόμενο με την είσοδο, που οδηγεί στη μοναδική δεξαμενή αντίδρασης όπου λαμβάνει χώρα ο ηλεκτροχημικός ή χρωματομετρικός προσδιορισμός του αναλύτη[127], [132]. Σύνθετες κατασκευές μικρορευστονικών διατάξεων επιτρέπουν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφόρων αναλυτών[96].

Στο Σχήμα 11 απεικονίζεται μια σύνθετη μικρορευστονική διάταξη για τον ταυτόχρονο αμπερομετρικό προσδιορισμό γλυκόζη και γαλακτικού οξέος μέσω ενζυμικά τροποποιημένων μικροηλεκτροδίων, και τον ποτενσιομετρικό προσδιορισμό ιόντων Cl⁻, Na⁺, K⁺ με εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων.



Σχήμα 11. Φορετή αναλυτική συσκευή με τις απαιτούμενες μικρορευστονικές διατάξεις για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφόρων βιοδεικτών στον ιδρώτα [103]

2.3.4 Τροφοδοσία και μεταφορά δεδομένων

Η τροφοδοσία των περισσότερων ηλεκτροχημικών φορετών αισθητήρων που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία βασίζεται σε μπαταρίες τύπου νομίσματος (coin) [103], [133], [134], οι οποίες αν και παρέχουν αξιόπιστη και αδιάκοπη τροφοδοσία και μεταφορά δεδομένων, αυξάνουν τον όγκο και το βάρος της συσκευής. Η τεχνολογία Bluetooth χαμηλής ενέργειας (Bluetooth Low Energy, BLE)[134] προσφέρει συνεχή μεταφορά δεδομένων από τη συσκευή στο δέκτη, ασύρματα, και για αποστάσεις έως και 30 μέτρων. Το γεγονός αυτό κάνει τις συσκευές που βασίζονται στην τεχνολογία BLE αρκετά ελκυστικές για εφαρμογές που απαιτούν μεταφορά δεδομένων σε μεγάλη εμβέλεια. Παρόλα αυτά, οι εν λόγω συσκευές καταναλώνουν υψηλά ποσά ενέργειας [96].

Στον αντίποδα, συσκευές που λειτουργούν με βάση την επικοινωνία κοντινού πεδίου (near-field communication, NFC) μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με αναγνώστες κοντινής απόστασης, επιτρέποντας κατά συνέπεια το σχεδιασμό συσκευών που λειτουργούν χωρίς μπαταρία[135], μειώνοντας έτσι τον όγκο και το βάρος των συσκευών.

2.4 Φορετοί βιοαισθητήρες για το τεστ ιδρώτα

Ο Choi D. Η. και οι συνεργάτες του κατασκεύασαν έναν φορετό ποτενσιομετρικό αισθητήρα για τον προσδιορισμό των ιόντων χλωρίου στον ιδρώτα σε πραγματικό χρόνο [136], [137] (Σχήμα 12A), ο οποίος στη συνέχεια δοκιμάστηκε σε είκοσι εθελοντές, δέκα εκ των οποίων έπασχαν από κυστική ίνωση [138] (Σχήμα 12B). Η μέθοδος που πρότεινε η ομάδα του Choi. D. H. περιλάμβανε, πέραν του ποτενσιομετρικού αισθητήρα, και διάταξη ιοντοφόρησης. Παράλληλα, ο αισθητήρας μετέφερε τα δεδομένα της ανάλυσης με Bluetooth σε ένα κινητό τηλέφωνο, όπου μια κατάλληλη εφαρμογή (app) μετέτρεπε τη μετρούμενη διαφορά δυναμικού σε συγκέντρωση ιόντων χλωρίου σε πραγματικό χρόνο.

Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά που ελήφθησαν με κουλομετρική ογκομέτρηση μετά από τη συλλογή ιδρώτα με τη συσκευή Macroduct® και ηλεκτροφόρηση πιλοκαρπίνης. Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν εξαιρετικός (*p* = 0.97).



Σχήμα 12. (Πάνω εικόνα) (Α) σχηματική απεικόνιση του φορετού αισθητήρα (Β) εφαρμογή του αισθητήρα στο χέρι και η ασύρματη επικοινωνία του με το κινητό τηλέφωνο και (C) λειτουργία της εφαρμογής κατά τη διάρκεια ενός τεστ ιδρώτα[138]. (Κάτω εικόνα) Ανάλυση του ιδρώτα με τον φορετό αισθητήρα και τη συμβατική κλινική μέθοδο. (B-D) Πρωτόκολλο για την συμβατική μέθοδο ανάλυσης του ιδρώτα: (B) ιοντοφόρηση με πιλοκαρπίνη, (C) συλλογή του ιδρώτα χρησιμοποιώντας τη συσκευή Macroduct, και (D) εργαστηριακή ανάλυση του ιδρώτα για προσδιορισμό του χλωρίου. (E-F) Πρωτόκολλο ανάλυσης του ιδρώτα με τον φορετό αισθητήρα: (E) ιοντοφόρηση με πιλοκαρπίνη, (F) φορετός αισθητήρας και ασύρματος πομποδέκτης Bluetooth, και (G) παρακολούθηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης του αισθητήρα σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας μία εφαμοργή σε κινητό τηλέφωνο [138].
Πειραματικό Μέρος

1. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας χαμηλού κόστους και μεγέθους ολοκληρωμένης ηλεκτροχημικής διάταξης αποτελούμενης από εκτυπωμένα ηλεκτρόδια αργύρου με ενσωματωμένη κυψελίδα για μετρήσεις σε όγκους μικρολίτρων (<2 μL) για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης χλωριούχων στον ιδρώτα και τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης.

2. Εισαγωγή

Όπως εκτενώς περιγράψαμε στην πρώτη ενότητα του θεωρητικού μέρους της εργασίας, η κυστική ίνωση είναι η πλέον κληρονομούμενη θανατηφόρα νόσος της καυκάσιας φυλής, η πρώιμη διάγνωση της οποίας είναι ζωτικής σημασίας και καθοριστική για τη μελλοντική υγεία των νεογνών. Μολονότι ο νεογνικός προσυμπτωματικός έλεγχος για τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης εφαρμόζεται πλέον παγκοσμίως και έχει εξελιχθεί σε σημαντικό βαθμό, η συλλογή του ελάγιστου όγκου ιδρώτα που απαιτείται για την ανάλυση αποτελεί, ιδιαίτερα στην περίπτωση των νεογνών, σημαντικό πρόβλημα με αποτέλεσμα την επανάληψη της διαδικασίας συλλογής του ιδρώτα με ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης και την καθυστέρηση της εξέτασης. Ο όγκος που απαιτείται για το συμβατικό εργαστηριακό τεστ είναι περίπου 15 μL, ενώ η συσκευή Nanoduct® Neonatal απαιτεί τουλάχιστον 3 μL. Στην παρούσα εργασία, προτείνουμε μια χαμηλού κόστους και μεγέθους ολοκληρωμένη ηλεκτροχημική διάταξη που περιλαμβάνει τα απαραίτητα ηλεκτρόδια για τις ηλεκτροχημικές μετρήσεις και ενσωματωμένη κυψελίδα όγκου <2 μL ιδρώτα. Η κατασκευή της κυψελίδας είναι απλή και αποτελείται από δυο χαμηλού κόστους εκτυπωμένα ηλεκτρόδια αργύρου. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στον ηλεκτροχημικό σχηματισμό χλωριούχου αργύρου (AgCl) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου αργύρου (Ag) κατά την ηλεκτροχημική οξείδωση του τελευταίου σε υδατικό διάλυμα γλωριούχων αλάτων, σύμφωνα με την χημική εξίσωση[139]

$$Ag^0 + Cl^- \rightleftharpoons AgCl + e^-$$

Οι πειραματικές μεταβλητές επιλέχθηκαν προκειμένου η ηλεκτροχημική διάταξη να ανταποκρίνεται γραμμικά στο εύρος συγκεντρώσεων από 20-100 mM χλωριούχων ώστε να είναι δυνατή η χρήση της απευθείας στον ιδρώτα χωρίς να απαιτείται κάποια προκατεργασία του δείγματος.

3. Πειραματική πορεία

3.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Για την παρασκευή τεχνητού ιδρώτα και του πρότυπου διαλύματος 2 M NaCl χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια νιτρικό νάτριο (NaNO₃), νιτρικό κάλιο (KNO₃), θειικό αμμώνιο ((NH₄)₂SO₄), επταένυδρο θειικό μαγνήσιο MgSO₄·7H₂O, όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃), διένυδρο διβασικό φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄·2H₂O), και χλωριούχο νάτριο (NaCl) της εταιρείας Merck. Η ουρία και το μετά νατρίου άλας του L-γαλακτικού οξέος ήταν προϊόντα της Sigma-Aldrich. Η παρασκευή των διαλυμάτων έγινε με δισαπεσταγμένο νερό (DDW).

3.2 Οργανολογία

Οι ηλεκτροχημικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τον ηλεκτροχημικό αναλυτή PGSTAT12 της εταιρείας Metrohm Autolab (Ολλανδία) με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή και του λογισμικού GPES 4.6. Οι μετρήσεις σε συμβατική κυψελίδα όγκου 10 mL πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως ηλεκτρόδιο εργασίας το εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο αργύρου (Ag-SPE) και ως αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο ένα άλλο εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο, Ag-SPE ή γραφίτη (G-SPE). Η ολοκληρωμένη ηλεκτροχημική διάταξη που αναπτύξαμε αφορά μια κυψελίδα δυο εκτυπωμένων ηλεκτροδίων όπου το ένα ηλεκτρόδιο (Ag-SPE ή Ag/AgCl-SPE) χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρόδιο εργασίας (WE), ενώ το άλλο ηλεκτρόδιο (Ag-SPE ή Ag/AgCl-SPE) βρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρόδιο εργασίας (WE), ενώ το άλλο ηλεκτρόδιο (Ag-SPE ή Ag/AgCl-SPE) ως αντισταθμιστικό (RE/CE). Οι μετρήσεις βολταμμετρίας τετραγωνικού παλμού (square wave voltammetry, SWV) έγιναν στο παράθυρο δυναμικού από –0.4 έως 0.3 V ως προς το εκάστοτε αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο. Το ύψος του παλμού ήταν 0.06 V και η συχνότητα 100 Hz, εκτός εάν ορίζεται διαφορετικά.

3.3 Εκτύπωση ηλεκτροδίων αργύρου

Η εκτύπωση των ηλεκτροδίων (διάμετρος ενεργού επιφάνειας 5 mm) έγινε με τον εκτυπωτή Screen and Stencil Printer E2 (EKRA). Για τη δημιουργία των πλεγμάτων εκτύπωσης χρησιμοποιήθηκε γάζα μεταξοτυπίας από πολυεστέρα (195/48, SEFAR® PET 1500) και μεταλλικά πλαίσια. Τα ηλεκτρόδια σχεδιάστηκαν στο CorelDRAW X8 και μεταφέρθηκαν σε διαφάνεια εικονοθεσίας (image setting) η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μάσκα για το φωτοευαίσθητο υλικό. Για την κατασκευή του πλέγματος εκτύπωσης, η τανυσμένη γάζα (25-28 N/m²) καλύφθηκε με το φωτοευαίσθητο υλικό (Polycol S, KIWO) και στις δύο πλευρές (2-3 wet-on-wet, πλευρά σαρώθρου-πλευρά εκτύπωσης, με μία επιπλέον επίστρωση, στην ξηρή πλευρά εκτύπωσης) και αφέθηκε να στεγνώσει για 3 ώρες στους 40 °C.



Σχήμα 13: Πλέγμα εκτύπωσης.

Στη συνέχεια, η πλευρά εκτύπωσης καλύφθηκε με τη διαφάνεια εικονοθεσίας και το πλέγμα τοποθετήθηκε, υπό κενό, σε φωτοτράπεζα UV ακτινοβολίας (Combinetuve etabli 608/1, Tiflex) για 800 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε η διαφάνεια εικονοθεσίας και το πλέγμα πλύθηκε με ροή νερού υψηλής πίεσης μέχρι να απομακρυνθεί το μη φωτοπολυμερισμένο τμήμα του φωτοευαίσθητου υλικού. Η τελική μορφή του πλέγματος που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκτύπωση φαίνεται στο Σχήμα 13.

Η εκτύπωση των ηλεκτροδίων έγινε με το μελάνι αργύρου (Loctite EDAG 418SS E&C, Henkel) και σάρωθρο πολυουρεθάνης 75 dm σε εύκαμπτα υποστρώματα PVC πάχους 200 μm, τα οποία στεγνώσαμε στους 100 °C σε φούρνο ιμάντα υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR Little Red X2-30, Vastex). Η διαδρομή των ηλεκτροδίων μέσα στον φούρνο είχε διάρκεια 335 s, και συνολικά έγιναν 5 διαδρομές. Τα ηλεκτρόδια φυλάσσονταν σε πλαστικό σακουλάκι zip και σε σκοτεινό μέρος, ώστε να μην έρχονται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα λόγω της ευαισθησίας του αργύρου, για περίπου 3 μήνες. Στο **Σχήμα 14** φαίνεται, πάνω σε μια μαύρη επιφάνεια για αντίθεση, ένα υπόστρωμα PVC με 44 εκτυπωμένα ηλεκτρόδια αργύρου.



Σχήμα 14: Συστοιχία 44 εκτυπωμένων ηλεκτροδίων αργύρου σε εύκαμπτο φύλλο PVC.

3.4 Κατασκευή και συναρμολόγηση της ηλεκτροχημικής διάταξης

Η ηλεκτροχημική διάταξη με ενσωματωμένη κυψελίδα όγκου αποτελείται από δύο εκτυπωμένα ηλεκτρόδια αργύρου (ή Ag/AgCl, δες παρακάτω), ένα εκ των οποίων (αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο, CE) φέρει κυκλική τομή διαμέτρου 1.6 mm στη μέσο της ενεργού επιφάνειας, τα οποία τοποθετούνται αντικριστά και διαχωρίζονται από μια ταινία διπλής κολλητικής όψης πάχους 200 μm, η οποία φέρει επίσης κυκλική τομή διαμέτρου 3 mm. Οι οπές έγιναν με εμπορικό διακορευτή. Στο **Σχήμα 15** φαίνονται η συναρμολόγηση της ηλεκτροχημικής διάταξης, η εγκάρσια τομή της κυψελίδας, και φωτογραφίες των ηλεκτροδίων και της τελικής κατασκευής. Η τομή και το πάχος της ταινίας καθορίζουν τον όγκο της κυψελίδας, ενώ η οπή στο αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο εξυπηρετεί την εισαγωγή του δείγματος. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, ο όγκος της ενσωματωμένης ηλεκτροχημικής κυψελίδας είναι 1.4 μL.



Σχήμα 15. (Α) Συναρμολόγηση της ηλεκτροχημικής διάταζης και εγκάρσια τομή της ενσωματωμένης κυψελίδας, (B) Φωτογραφίες των εκτυπωμένων ηλεκτροδίων και της ηλεκτροχημικής διάταζης. WE, ηλεκτρόδιο εργασίας, CE, αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο

3.5 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων ιόντων χλωρίου σε τεχνητό ιδρώτα

Η σύσταση του τεχνητού ιδρώτα περιγράφεται στον Πίνακα 3 σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται στην αναφορά [140], όπου τα χλωριούχα άλατα έχουν αντικατασταθεί με τα αντίστοιχα άλατα νιτρικών και θειικών ιόντων. Το διάλυμα παρακαταθήκης του τεχνητού ιδρώτα αποθηκεύτηκε στο ψυγείο για περίπου τρεις εβδομάδες. Το pH του τεχνητού ιδρώτα ρυθμίστηκε στην τιμή 7. Χρησιμοποιώντας το παραπάνω διάλυμα και κατάλληλες ποσότητες διαλύματος 2 M NaCl παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα ιόντων χλωρίου συγκέντρωσης 20, 40, 60, 80, 100 mM.

Άλας	Συγκέντρωση (mM)	Ποσότητα (g / 500 mL)
NaNO ₃	50	2.1252
KNO ₃	6	0.3033
$(NH_4)_2SO_4$	5	0.3303
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.08	0.0098
NaHCO ₃	2.6	0.1092
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.04	0.0035

Πίνακας 3. Σύσταση διαλύματος τεχνητού ιδρώτα

3.6 Δειγματοληψία ιδρώτα

Η δειγματοληψία ιδρώτα έγινε από 2 υγιείς εθελοντές με τη γραπτή συγκατάθεσή τους με ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης [76], σε συνεργασία με το τμήμα κυστικής ίνωσης του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ΠΓΝΙ), με τη μέθοδο QPIT (Quantitative Pilocarpine Iontophoresis Test) [75]. Η ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης έγινε με τη διαβίβαση σταθερού ρεύματος έντασης 4 mA μεταξύ δύο ηλεκτροδίων. Το ένα ηλεκτρόδιο [κόκκινο (+), κάθοδος] καλύπτεται με γάζα εμποτισμένη σε διάλυμα 0.64% w/v πιλοκαρπίνης σε απεσταγμένο νερό και στηρίζεται στον καρπό και το άλλο ηλεκτρόδιο [μαύρο (-), άνοδος] καλύπτεται με γάζα εμποτισμένη σε διάλυμα 0.02 N H₂SO₄ και στηρίζεται πάνω από τον αγκώνα, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 16**. Η χρήση της γάζας και η διαβροχή της με τα διαλύματα είναι απαραίτητη για να μην έρθουν τα ηλεκτρόδια σε άμεση επαφή με το δέρμα και προκληθεί κάποιο έγκαυμα. Μετά από 10 λεπτά ιοντοφόρησης, τα ηλεκτρόδια απομακρύνθηκαν, η περιοχή κάτω από το κόκκινο ηλεκτρόδιο καθαρίστηκε με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκε στεγνή γάζα η οποία συγκρατήθηκε με επίδεσμο. Στη συνέχεια, οι εθελοντές περπάτησαν για περίπου 30-45 λεπτά και η ποσότητα ιδρώτα που συγκρατήθηκε στη γάζα συλλέχθηκε τοποθετώντας την σε σύριγγα και πιέζοντάς την με το έμβολο. Τα δείγματα ιδρώτα αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια eppendorf, σφραγίστηκαν με parafilm για να αποφευχθεί η εξάτμισή τους και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο για περίπου 2 εβδομάδες.



Σχήμα 16: Λήψη δείγματος ιδρώτα με ιοντοφόρηση πιλοκαρπίνης.

3.7 Μέθοδος αναφοράς

Η μέθοδος αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στην αντίδραση του Hg(SCN)₂ με τα ιόντα Cl⁻, στην απελευθέρωση ιόντων SCN⁻ και την αντίδραση τους με ιόντα τρισθενούς σιδήρου προς σχηματισμό αιματέρυθρου συμπλόκου Fe(SCN)²⁺ [141]–[143] σύμφωνα με τις παρακάτω χημικές εξισώσεις.

$$2\mathrm{Cl}^{-} + \mathrm{Hg}(\mathrm{SCN})_{2} \to \mathrm{Hg}\mathrm{Cl}_{2} + 2\mathrm{SCN}^{-}$$
(1)

$$2SCN^{-} + 2Fe^{3+} \rightarrow 2FeSCN^{2+}$$
 (2)

Η απορρόφηση του συμπλόκου $Fe(SCN)^{2+}$ (Σχήμα 17) μετρήθηκε στα 460 nm με το φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-1800 και το λογισμικό UV Solutions 1.2.



Σχήμα 17. Μείγμα Hg(SCN)₂ και Fe(NO₃)₃·9H₂O χωρίς χλωριούχα (αριστερά) και παρουσία χλωριούχων (δεξιά).

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και την ανάλυση των δειγμάτων παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα 3 mM NaCl, κορεσμένο διάλυμα 0.3 g Hg(SCN)₂ σε 100 mL αιθανόλης και διάλυμα 15.1 g Fe(NO₃)₃·9H₂O σε μείγμα 47 mL πυκνού υπερχλωρικού οξέος (HClO₄) και 53 mL H₂O. Η απορρόφηση των προτύπων και των αγνώστων διαλυμάτων (όγκου 5 mL) μετρήθηκε στα 460 nm, 20 λεπτά μετά την ανάμειξη των επιμέρους αντιδραστηρίων, σύμφωνα με τα δεδομένα που φαίνονται στον Πίνακα 4. Μια τυπική καμπύλη αναφοράς της φασματοφωτομετρικής μεθόδου φαίνεται στο Σχήμα 18.

Πίνακας 4: Σύσταση προτύπων και αγνώστων διαλυμάτων για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό χλωριούχων σε ιδρώτα. * 1:10 του δείγματος

Διάλυμα	Λευκό	Π1	П2	П3	П4	П5	Δείγμα
3 mM NaCl (µL)	0	20	40	100	200	300	100*
$Hg(SCN)_2 (\mu L)$	400	400	400	400	400	400	400
$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O(\mu L)$	400	400	400	400	400	400	400
H ₂ O (μL)	4200	4180	4160	4100	4000	3900	4100
[Cl-] µM	0	12	24	60	120	180	$C_{\delta} = C_x \times 500$

* 1:10 του δείγματος



Σχήμα 18. Καμπύλη αναφοράς για τα πρότυπα Π1, Π2, Π3, Π4, Π5 (σύμφωνα με τον Πίνακα 4).

3.8 Βαθμονόμηση του αισθητήρα και ανάλυση ιδρώτα

Η ηλεκτροχημική κυψελίδα χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση προτύπων διαλυμάτων χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα, με σκοπό την κατασκευή καμπύλης αναφοράς, και για την ανάλυση δειγμάτων τεχνητού και βιολογικού ιδρώτα. Όλες οι μετρήσεις έγιναν με την προσθήκη 2 μL δείγματος. Πριν τις μετρήσεις, έγινε ο εγκλιματισμός της κυψελίδας με το διάλυμα τεχνητού ιδρώτα απουσία χλωριούχων (τυφλό δείγμα) και τη λήψη 10 σαρώσεων με βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού από –0.4 έως 0.3 V ως προς το εκάστοτε αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο. Με τον ίδιο τρόπο έγινε και η μέτρηση των προτύπων διαλυμάτων χλωριούχων (20, 40, 60, 80 και 100 mM) σε τεχνητό ιδρώτα. Μεταξύ των μετρήσεων με διαφορετικά πρότυπα διαλύματα, η κυψελίδα καθαρίζονταν με είκοσι διαδοχικές προσθήκες 3 μL DDW τα οποία αποστραγγίζονταν με βαμβακερή μπατονέτα. Ακολουθούσε η προσθήκη/αποστράγγιση του νέου πρότυπου διαλύματος για τρεις φορές και μετά την τέταρτη προσθήκη, ομοίως με παραπάνω, η λήψη 10 σαρώσεων με βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού. Όλες οι μετρήσεις για την καμπύλη αναφοράς (περίπου 50-70 μετρήσεις ανάλογα με τον αριθμό των προτύπων διαλυμάτων) έγιναν με την ίδια κυψελίδα. Οι μετρήσεις σε δείγματα τεχνητού ή βιολογικού ιδρώτα έγιναν σε νέα κυψελίδα. Στην τελευταία περίπτωση (ανάλυση βιολογικού ιδρώτα), μετά τον εγκλιματισμό της κυψελίδας με το τυφλό δείγμα και τον καθαρισμό της με DDW, τοποθετήθηκαν στην κυψελίδα 2 μL τυφλού δείγματος, τα οποία αφέθηκαν να στεγνώσουν. Ακολούθησε η προσθήκη του δείγματος και η μέτρηση του (10 σαρώσεις με βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού στα 100 Hz από –0.4 έως 0.3 V).

4. Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Βολταμμετρική συμπεριφορά των εκτυπωμένων ηλεκτροδίων σε συμβατική κυψελίδα 2-ηλεκτροδίων

Αρχικά, έγιναν προκαταρκτικές δοκιμές σε συμβατική κυψελίδα 2-ηλεκτροδίων όγκου 10 mL, όπου απλές λειτουργίες, όπως ο καθαρισμός της κυψελίδας, η ανανέωση των διαλυμάτων μέτρησης, η δυνατότητα ανάδευσης του διαλύματος πριν τη μέτρηση, και η επαρκής απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων προς αποφυγή τυχόν ανάπτυξης ηλεκτρικού πεδίου ισχυρής έντασης μεταξύ αυτών που θα επηρέαζε τις μετρήσεις, δεν αποτελούν πρόβλημα. Σε αυτά τα πειράματα, το εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο Ag-SPE χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρόδιο εργασίας ενώ ως αντισταθμικό ηλεκτρόδιο χρησιμοποιήθηκε είτε ένα ίδιο ηλεκτρόδιο (Ag-SPE) προσομοιάζοντας ακριβώς την ενσωματωμένη ηλεκτροχημική κυψελίδα που θέλαμε να εξετάσουμε, είτε ένα εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο γραφίτη (G-SPE). Η συμπεριφορά της κυψελίδας, σε κάθε περίπτωση, Ag-SPE/Ag-SPE ή Ag-SPE/G-SPE, με μετρήσεις βολταμμετρίας τετραγωνικού παλμού στα 100 Ηz στο εύρος δυναμικού από –0.4 έως 0.3 V, στο διάλυμα του τυφλού δείγματος και σε πρότυπα διαλύματα χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα, φαίνεται στα **Σχήματα 19** και **20**, αντίστοιχα.



Σχήμα 19. Βολταμμογραφήματα τετραγωνικού παλμού σε συμβατική κυψελίδα 2-ηλεκτροδίων (Ag-SPE/ Ag-SPE) σε διαλύματα τεχνητού ιδρώτα που περιέχουν 0, 20, 40, 60 και 80 mM χλωριούχων. Τα βολταμμογραφήματα αφορούν τη 10^η διαδοχική σάρωση σε κάθε διάλυμα μέτρησης ενώ στο ένθετο σχήμα φαίνονται και οι 10 σαρώσεις για τη συγκέντρωση 40 mM.



Σχήμα 20. Βολταμμογραφήματα τετραγωνικού παλμού σε συμβατική κυψελίδα 2-ηλεκτροδίων (Ag-SPE/G-SPE) σε διαλύματα τεχνητού ιδρώτα που περιέχουν 0, 20, 40, 60 και 80 mM χλωριούχων. Τα βολταμμογραφήματα αφορούν τη 10^η διαδοχική σάρωση σε κάθε διάλυμα μέτρησης.

Στη συμβατική κυψελίδα Ag-SPE/Ag-SPE (Σχήμα 19) το τυφλό δείγμα δεν παρουσίασε κάποια κορυφή ενώ παρουσία χλωριούχων εμφανίστηκαν μια μικρή κορυφή στα -0.125 V, το ύψος της οποίας δε συσχετίζεται με τη συγκέντρωση των χλωριούχων στο διάλυμα μέτρησης και μια έντονη (διπλή) κορυφή στα περίπου 0.075 και 0.1 V το ύψος της οποίας στα 0.075 V συσχετίζεται με τη συγκέντρωση των χλωριούχων στο διάλυμα μέτρησης. Επιπλέον, όπως φαίνεται στο ένθετο γράφημα στο Σχήμα 19, το ύψος της διπλής κορυφής αυξάνεται για τουλάχιστον δέκα διαδοχικές σαρώσεις. Αντίθετα, στη συμβατική κυψελίδα Ag-SPE/G-SPE (Σχήμα 20), σε σχέση με το σήμα του τυφλού δείγματος, παρατηρήθηκε μια ευρεία κορυφή περίπου στα 0.1 V, το ύψος της οποίας όμως δε συσχετίζονταν με τη συγκέντρωση των χλωριούχων στο διάλυμα μέτρησης.

4.2 Βολταμμετρική συμπεριφορά των εκτυπωμένων ηλεκτροδίων στην ενσωματωμένη κυψελίδα 2-ηλεκτροδίων

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 21, κατά τις μετρήσεις προτύπων διαλυμάτων χλωριούχων συγκέντρωσης 0, 40 και 60 mM σε διάλυμα τεχνητού ιδρώτα, όμοια με τη συμπεριφορά που παρατηρήσαμε στη συμβατική κυψελίδα, το τυφλό δείγμα δε δίνει κάποια κορυφή ενώ παρουσία χλωριούχων παρατηρείται μια μικρή κορυφή σε δυναμικό -0.125 V, το ύψος της οποίας δε συσχετίζεται με τη συγκέντρωση των χλωριούχων και μια διπλή κορυφή στο εύρος δυναμικού από -0.03 έως +0.15 V, το ύψος της οποίας συσχετίζεται με τις διαδοχικές σαρώσεις.

Η κορυφή στα περίπου -0.125 V ως προς το ηλεκτρόδιο Ag-SPE (στη συμβατική ή την ενσωματωμένη κυψελίδα) μπορεί να αποδοθεί στο σχηματισμό μιας μονοστιβάδας AgCl [139], [144], σύμφωνα με την εξίσωση 1, η οποία αποδίδεται στην υποτασική απόθεση AgCl σε τιμές δυναμικού μικρότερες της θεμοδυναμικά αναμενόμενης τιμής.

$$Ag^0 + Cl^- \rightleftharpoons AgCl_{(monolayer)} + e^-$$
 E§. 1



Σχήμα 21. Βολταμμογράφηματα τετραγωνικού παλμού από -0.4 έως +0.3 V σε συχνότητα σάρωσης 100 Hz, προτύπων διαλυμάτων χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα συγκεντρώσεων 40 και 60 mM Cl⁻ με την ηλεκτροχημική διάταξη Ag-SPE/Ag-SPE. Παρατίθενται οι 1ⁿ, 5ⁿ και 10ⁿ μετρήσεις σε κάθε συγκέντρωση. Στο ένθετο σχήμα φαίνονται οι 10 διαδοχικές σαρώσεις για τη συγκέντρωση 40 mM.

Αν και σε προηγούμενες μελέτες το ύψος της συγκεκριμένης κορυφής χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό αλογόνων [145], στην συγκεκριμένη περίπτωση και όμοια με άλλες μελέτες [146] δεν παρέχει πληροφορίες για τη συγκέντρωση των χλωριούχων στο διάλυμα μέτρησης. Αυτή η φαινομενικά διαφορετική συμπεριφορά της κορυφής που προκύπτει από την υποτασική απόθεση του AgCl, μπορεί να εξηγηθεί θεωρώντας ότι η δισδιάστατη στιβάδα AgCl σχηματίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, που ανάλογα με τη μορφολογία της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, που ανάλογα με τη μορφολογία της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, που ανάλογα με τη μορφολογία της επιφάνειας του αργύρου και τον προσανατολισμό των κρυσταλλικών επιπέδων, που διαφέρουν ανάλογα με το ηλεκτρόδιο αργύρου, ευνοούν ενεργειακά το σχηματισμό υποτασικής απόθεσης. Η υπόλοιπη επιφάνεια του ηλεκτροδίου χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη της κύριας μάζας (τρισδιάστατο πλέγμα) του AgCl [144] που αποδίδεται στις μερικά επικαλυπτόμενες κορυφές στα περίπου 0.040 και 0.120 V ως προς το ηλεκτρόδιο Αg-SPE, το ύψος των οποίων παρέχει αναλυτικές πληροφορίες για τη συγκέντρωση των χλωριούχων στο διάλυμα. Το ύψος και κατά συνέπεια ο βαθμός επικάλυψης των κορυφών αυτών εξαρτάται από τη συγκέντρωση των χλωριούχων στο διάλυμα και των αριθμό των βολταμμετρικών σαρώσεων, ενώ σύμφωνα με τα

πειραματικά δεδομένα (Σχήμα 21) και συγκεκριμένα από την πρώτη σάρωση στα 40 mM χλωριούχων και τη σύγκριση μεταξύ των δυο διαδοχικών μετρήσεων, τη δέκατη σάρωση στα 40 mM και την πρώτη σάρωση στα 60 mM, πιστεύουμε ότι η κορυφή στα περίπου 40 mV, σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση των χλωριούχων στο διάλυμα, ενώ το ύψους της δεύτερης κορυφής περίπου στα 120 mV, φαίνεται να σχετίζεται με το ύψος της πρώτης κορυφής και να αυξάνεται με τον αριθμό των σαρώσεων. Στην πρώτη σάρωση του προτύπου 40 mM χλωριούχων, το ύψος της δεύτερης κορυφής στα 120 mV είναι αμελητέο. Όμοια, η πρώτη σάρωση στο πρότυπο διάλυμα 60 mM χλωριούχων προκάλεσε την αύξηση του ύψους της πρώτης κορυφής στα 40 mV, ενώ το ύψος της δεύτερης κορυφή παρέμεινε σταθερό και αυξήθηκε με τον αριθμό των βολταμμετρικών σαρώσεων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε αυτό το παράθυρο δυναμικού μπορούν να αποδοθούν στο σχηματισμό (πυρήνωση) και τη μερική ηλεκτροχημική διαλυτοποίηση της κύριας μάζας του AgCl, σύμφωνα με τις εξισώσεις 2 [144] και 3 [139], [144], και στην περαιτέρω ανάπτυξή του σε ένα τρισδιάστατο πλέγμα μέσω της μεταφοράς των διαλυτών μορφών AgCl_n⁻⁽ⁿ⁻¹⁾ [147] από την εξωτερική επιφάνεια του σχηματιζόμενου AgCl στο διάλυμα και την καταβύθιση AgCl(s) σύμφωνα με τις εξισώσεις 4 και 5 [139].

$$Ag^{0} + Cl^{-} \rightleftharpoons AgCl_{(nucleation)} + e^{-} \qquad E\xi. 2$$

$$AgCl_{(nucleation)} + (n-1) Cl^{-} \rightleftharpoons AgCl_{n}^{-(n-1)}_{(surface)} \qquad E\xi. 3$$

$$AgCl_n^{-(n-1)}(surface) \rightleftharpoons AgCl_n^{-(n-1)}(solution) \qquad E\xi. 4$$

$$AgCl_n^{-(n-1)}(solution) \rightleftharpoons AgCl_{(s)} + nCl^-$$
 E§. 5

Αν και σε ενδιάμεσες μετρήσεις με το τυφλό δείγμα δεν παρατηρείται, όπως και στις αρχικές μετρήσεις με το τυφλό, καμία κορυφή, η συνεχής αύξηση της διπλής κορυφής στα 40 και 120 mV με τον αριθμό των σαρώσεων δυσχεραίνει τη χρήση της για αναλυτικούς σκοπούς. Πέραν της δυσκολίας να καταγράψουμε το ρεύμα σταθερής κατάστασης (steady-state) που αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση χλωριούχων στο διάλυμα, η σταδιακά αυξανόμενη επικάλυψη των κορυφών δυσχεραίνει επίσης τον υπολογισμό του ύψους τους.

Ως εκ τούτου, διερευνήσαμε τη βολταμμετρική συμπεριφορά της ενσωματωμένης κυψελίδας Ag-SPE/Ag-SPE σε ένα ανοδικά μικρότερο παράθυρο δυναμικού (-0.4 έως +0.09 V) προς αποφυγή της εμφάνισης της δεύτερης κορυφής, καθώς, όπως αναφέρθηκε, το ύψος της

αυξάνεται με τον αριθμό των σαρώσεων και πιθανά να παρεμποδίζει την σταθεροποίησή του σήματος.

Παρόλα αυτά, όπως παρατηρούμε στο Σχήμα 22, η πλέον μονή κορυφή στα 40 mV συνεχίζει να αυξάνεται με διαδοχικές σαρώσεις. Αξίζει βέβαια να σημειώσουμε ότι η αύξηση είναι σαφώς περιορισμένη με τη μέγιστη τιμή ρεύματος στα 40 και 60 mM να φτάνει περίπου στα 90 και 140 μΑ αντίστοιχα, σε σχέση με τις τιμές στην αντίστοιχη τιμή δυναμικού, περίπου στα 262 και 400 μΑ, αντίστοιχα που παρατηρούμε στο σχήμα 21.



Σχήμα 22. Βολταμμογραφήματα τετραγωνικού παλμού στα 100 Hz, σε πρότυπα διαλύματα 0, 20, 40, 60, 80 mM χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα (10ⁿ μέτρηση σε κάθε συγκέντρωση), στο παράθυρο δυναμικού από -0.4 V έως +0.09 με την ηλεκτροχημική διάταζη Ag-SPE/Ag-SPE. Στο ένθετο σχήμα φαίνεται η βολταμμετρική απόκριση για 10 διαδοχικές σαρώσεις του προτύπου διαλύματος 40 mM χλωριούχων.

Δοκιμές να σταθεροποιήσουμε το σήμα ή να διαχωρίσουμε τις δύο επικαλυπτόμενες κορυφές έγιναν με μετρήσεις βολταμμετρίας τετραγωνικού παλμού σε μικρότερη συχνότητα (50 Hz), με μετρήσεις παλμικής διαφορικής βολταμμετρίας και με αντικατάσταση του αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου Ag-SPE με εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο γραφίτη. Οι μετρήσεις φαίνονται στα Σχήματα 23, 24 και 25 αντίστοιχα και όπως προέκυψε (τα δεδομένα δεν φαίνονται) δε βελτίωσαν τη σταθερότητα των μετρήσεων. Μάλιστα, η αναλυτική συμπεριφορά της ενσωματωμένης κυψελίδας με το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο γραφίτη (Σχήμα 25), όμοια με τα αποτελέσματα στο Σχήμα 20, ήταν χαμηλής ποιότητας.



Σχήμα 23. Βολταμμογραφήματα τετραγωνικού παλμού (10^{η} μέτρηση) σε εύρος τιμών δυναμικού από -0.4έως +0.09 V με συχνότητα σάρωσης 50 Hz κατά τη μέτρηση προτύπων διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων Cl⁻ σε τεχνητό ιδρώτα με την ηλεκτροχημική διάταζη Ag-SPE/Ag-SPE.



Σχήμα 24. Βολταμμογραφήματα παλμικής διαφορικής βολταμμετρίας (10^{η} μέτρηση) σε εύρος τιμών δυναμικού από -0.4 έως +0.09 V κατά τη μέτρηση προτύπων διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων Cl^{-} σε τεχνητό ιδρώτα με την ηλεκτροχημική διάταζη Ag-SPE/Ag-SPE.



Σχήμα 25. Βολταμμογραφήματα τετραγωνικού παλμού (1ⁿ, 5ⁿ και 10ⁿ μέτρηση) σε εύρος τιμών δυναμικού από -0.4 έως +0.3 V με συχνότητα σάρωσης 100 Hz κατά τη μέτρηση προτύπων διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων Cl⁻σε τεχνητό ιδρώτα με την ηλεκτροχημική διάταξη Ag-SPE/G-SPE.

4.3 Βολταμμετρική συμπεριφορά της ενσωματωμένης κυψελίδας 2-ηλεκτροδίων χρησιμοποιώντας εκτυπωμένα ηλεκτρόδια Ag/AgCl ως ηλεκτρόδιο εργασίας ή/και ως αντισταθμιστικό

Η παραγωγή των ηλεκτροδίων Ag/AgCl-SPE πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροχημική απόθεση AgCl στα ηλεκτρόδια Ag-SPE. Η ηλεκτροχημική απόθεση έγινε ποτενσιοστατικά σε τάση 1.0 V ως προς σύρμα λευκόχρυσου για 20 min σε 1 M KCl [148]. (Σχήμα 26).

Χρησιμοποιώντας τα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια Ag/AgCl-SPE ως ηλεκτρόδιο εργασίας ή/και ως αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο, μαζί με την περίπτωση της κυψελίδας Ag-SPE/Ag-SPE που μελετήσαμε παραπάνω προκύπτουν τέσσερεις συνδυασμοί (Πίνακας 5) ενώ, συγκριτικά, η βολταμμετρική συμπεριφορά των αντίστοιχων ηλεκτροχημικών κυψελίδων σε μετρήσεις βολταμμετρίας τετραγωνικού παλμού στα 100 Hz σε πρότυπα διαλύματα 0, 20, 40, 60 και 80 mM χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα φαίνονται στο Σχήμα 27.



Σχήμα 26. Καμπύλες ρεύματος-δυναμικού κατά την ποτενσιοστατική ηλεκτροεπιμετάλλωση των Ag-SPE με τάση 1.0 V σε χρόνο 20 min. Στις ένθετες φωτογραφίες φαίνεται η αλλαγή στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου αργύρου λόγω του σχηματισμού AgCl.

	WE (SPE)	CE (SPE)
Κυψελίδα 1	Ag/AgCl	Ag/AgCl
Κυψελίδα 2	Ag	Ag
Κυψελίδα 3	Ag/AgCl	Ag
Κυψελίδα 4	Ag	Ag/AgCl

Πίνακας 5. Οι προκύπτουσες κυψελίδες 2-ηλεκτροδίων, με ηλεκτρόδια Ag-SPE και Ag/AgCl-SPE.

Αρχικά, αξίζει να σημειωθεί πως σε κάθε περίπτωση όπου τουλάχιστον το ένα εκ των δύο ηλεκτροδίων είναι το Ag/AgCl-SPE και κυρίως όταν το Ag/AgCl-SPE χρησιμοποιείται ως ηλεκτρόδιο εργασίας, γίνεται εμφανής μια επιπλέον κορυφή στα -0.12 έως -0.17 V, η οποία στην περίπτωση της κυψελίδας Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE, είναι συμμετρική, καλά διαχωρισμένη με τις οξειδωτικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε πιο ανοδικές τιμές δυναμικού και το πιο σημαντικό, το ύψος της συσχετίζεται με τη συγκέντρωση των χλωριούχων στο διάλυμα.

Σύμφωνα με την παραπάνω συζήτηση, πιστεύουμε ότι στην περίπτωση της ηλεκτροχημικής κυψελίδας Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE επιτυγχάνεται σαφής διαχωρισμός μεταξύ των βασικών σταδίων κατά τον ανοδικό σχηματισμό AgCl (πυρήνωση/ηλεκτροδιάλυση AgCl και σχηματισμός τρισδιάστατου πλέγματος AgCl) πιθανόν λόγω της (εκτεταμένης) προσρόφησης «ενεργών» ατόμων (adatoms) αργύρου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, τα οποία δημιουργούνται κατά των αναγωγή του ηλεκτροαποτιθέμενου AgCl κατά την έναρξη της βολταμμετρικής σάρωσης στα -0.4 V, πάνω στα οποία διευκολύνεται ο σχηματισμός νέων πυρήνων AgCl [144], οι οποίοι σύμφωνα με το μηχανισμό ηλεκτροδιάλυσης (εξίσωση 3) και ανάπτυξης ενός περαιτέρω τρισδιάστατου πλέγματος (εξισώσεις 4 και 5) που αναφέρθηκε παραπάνω, οδηγεί στην εμφάνιση των κορυφών που ακολουθούν κατά τη σάρωση του δυναμικού σε πιο ανοδικές τιμές.



Σχήμα 27. Βολταμμογραφήματα παλμικής διαφορικής βολταμμετρίας σε εύρος τιμών δυναμικού από -0.4έως +0.3 V κατά τη μέτρηση προτύπων διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων CΓ σε τεχνητό ιδρώτα (10^{η} μέτρηση) με τις τέσσερις διαφορετικές ηλεκτροχημικές κυψελίδες που αναφέρονται στον Πίνακα 5.

Σχηματικά, η βολταμμετρική συμπεριφορά των ηλεκτροχημικών κυψελίδων Ag-SPE/Ag-SPE και Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE και οι χημικές εξισώσεις που περιγράφουν τα επιμέρους στάδια απεικονίζονται στο Σχήμα 28.



Σχήμα 28. Σχηματική απεικόνιση της βολταμμετρικής συμπεριφοράς των ηλεκτροχημικών κυψελίδων Ag-SPE/Ag-SPE και Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE και των επιμέρους σταδίων του ηλεκτροχημικού σχηματισμού AgCl.

Αν και η κορυφή αυτή δεν είναι εμφανής με μετρήσεις κυκλικής βολταμμετρίας (Σχήμα 29), προφανώς λόγω της μικρότερης ευαισθησίας της μεθόδου σε σχέση με τη βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού, η κυκλική βολταμμετρική συμπεριφορά του ηλεκτροδίου εργασίας Ag/AgCl-SPE ως προς το ηλεκτρόδιο Ag-SPE, σε σχέση με αυτήν του ηλεκτροδίου εργασίας Ag-SPE ως προς το ηλεκτρόδιο Ag-SPE, διαφέρει α) στην οξύτητα των κορυφών οξείδωσης και αναγωγής και β) στην παρατηρούμενη τιμή διαχωρισμού των δυναμικών κορυφής ($\Delta E_p = E_p - E_c$), σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [149].



Σχήμα 29. Κυκλικά βολταμμογραφήματα (10^{η} μέτρηση) των κυψελίδων Ag-SPE/Ag-SPE και Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE παρουσία 40 mM χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα σε εύρος τιμών δυναμικού από -0.4 έως +0.4 V.



Σχήμα 30. Κυκλικά βολταμμογραφήματα της κυψελίδας Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE παρουσία 40 mM χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα σε διάφορες ταχύτητες σάρωσης του δυναμικού (3^η σάρωση). Στην ένθετη εικόνα φαίνεται η συσχέτιση του ύψους των κορυφών οξείδωσης και αναγωγής με τη τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης.

Επιπλέον, από τα κυκλικά βολταμμογραφήματα σε διάφορες ταχύτητες σάρωσης του δυναμικού (Σχήμα 30) και τη γραμμική συσχέτιση του ύψους των κορυφών οξείδωσης και αναγωγής με τη τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης, τουλάχιστον για τιμές έως και 300 mV s⁻¹ (συμπεριλαμβανομένης της τιμής 0 mV s⁻¹) (Σχήμα 30, ένθετο) προκύπτει ότι το ρεύμα ελέγχεται από τη διάχυση των ιόντων χλωρίου στο διάλυμα.

4.4. Ηλεκτροχημική συμπεριφορά της κυψελίδας Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 31, η ηλεκτροχημική συμπεριφορά της κυψελίδας Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE σε διάφορες συγκεντρώσεις χλωριούχων που καλύπτουν το εύρος με διαγνωστική σημασία για τον έλεγχο της κυστικής ίνωσης είναι ικανοποιητική και σε όλες τις συγκεντρώσεις το ρεύμα των κορυφών λαμβάνει μια σταθερή τιμή μετά από 7-8 σαρώσεις. Η αναπαραγωγιμότητα τριών διαδοχικών μετρήσεων (σαρώσεις 8, 9 και 10, n=3) στα 60 και 80 mM χλωριούχων ήταν 2.47 και 0.94%, αντίστοιχα ενώ η επαναληψιμότητα μεταξύ τριών διαφορετικών κυψελίδων στα ίδια επίπεδα συγκεντρώσεων βρέθηκε 14.69% και 6.31% αντίστοιχα.



Σχήμα 31. Ηλεκτροχημική συμπεριφορά κυψελίδας Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE σε διαδοχικές μετρήσεις βολταμμετρίας τετραγωνικού παλμού σε διάφορες συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα (8-10^η μέτρηση). Στο ένθετο φαίνονται δέκα διαδοχικές σαρώσεις παρουσία 80 mM χλωριούχων.

4.5. Κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης και ανάλυση τεχνητών δειγμάτων

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς μετρήθηκε η απόκριση των κυψελίδων Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE παρουσία 20, 40, 60, 80 και 100 mM χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα. Και οι 60 μετρήσεις έγιναν με την ίδια κυψελίδα και το ύψος της κορυφής υπολογίστηκε από τη δέκατη σάρωση σε κάθε συγκέντρωση (**Σχήμα 32**). Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν με τρεις διαφορετικές κυψελίδες. Βάσει των μέσων τιμών και με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων σχεδιάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης I_p/μA = f ([Cl⁻]/mM) η οποία φαίνεται στο **Σχήμα 32 (ένθετο)**. Με βάση την εξίσωση της ευθείας συμμεταβολής, y=2.349[Cl⁻]–18.594 (R²=0.9949), προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των χλωριούχων σε δείγματα τεχνητού ιδρώτα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που φαίνονται στον **Πίνακα 6**, το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα κυμαίνεται από -0.78 μέχρι 4.17%.



Σχήμα 32. Ηλεκτροχημική συμπεριφορά της ηλεκτροχημικής κυψελίδας Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE σε διαδοχικές μετρήσεις βολταμμετρίας τετραγωνικού παλμού (δέκατη σάρωση) σε διάφορες συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα (20-100 mM) και η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς (ένθετο).

Πίνακας 6. Προσδιορισμός χλωριούχων σε δείγματα τεχνητού ιδρώτα, συγκεντρώσεων 30.00, 40.00 και 60.00 mM, με την κυψελίδα Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE. R.E(%), επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα. Οι τιμές αναφέρονται στη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση τεσσάρων μετρήσεων (mean±SD, n=4)

Δείγμα	Αναγραφόμενη	Προσδιοριζόμενη	R.E, %
	συγκέντρωση	συγκέντρωση	
	[Cl [−]], mM	[Cl ⁻], mM	
1	30.00	31.17 ±3.61	3.89
2	40.00	39.68 ±7.20	-0.78
3	60.00	62.50 ±3.78	4.17

4.6 Παρεμποδίζοντα και ανάλυση βιολογικών δειγμάτων ιδρώτα

Η παρεμποδιστική δράση των δυο βασικών οργανικών συστατικών του ιδρώτα, ουρίας και γαλακτικού οξέος σε συγκεντρώσεις 10 και 14 mM αντίστοιχα, οι οποίες αντιστοιχούν στη μέση τιμή συγκέντρωσης αντίστοιχα [109], μελετήθηκε σε πρότυπα διαλύματα αυτών σε τεχνητό ιδρώτα και με τη μέθοδο των μεικτών διαλυμάτων παρουσία 40 mM χλωριούχων. Αν και οι δυο ενώσεις δεν παράγουν κάποια βολταμμετρική απόκριση, η παρουσία τους στα μεικτά διαλύματα μείωσε στο σήμα κατά 4.1 και 16.1%, αντίστοιχα πιθανόν λόγω της στόμωσης της ενεργούς επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας.

Στη συνέχεια εξετάσαμε τη δυνατότητα ανάλυσης βιολογικού ιδρώτα, ο οποίος συλλέχτηκε σύμφωνα με όσα αναφέρονται στην παράγραφο 3.6 σε συνεργασία με το τμήμα κυστικής ίνωσης του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ΠΓΝΙ), με τη μέθοδο QPIT (Quantitative Pilocarpine Iontophoresis Test) [75]. Στις πρώτες εφαρμογές διαπιστώσαμε ότι κατά την ανάλυση βιολογικού ιδρώτα η βολταμμετρική κορυφή με την οποία γινόταν η ποσοτικοποίηση των χλωριούχων ήταν εμφανώς μετατοπισμένη σε πιο ανοδικές τιμές δυναμικού, όπως φαίνεται στο Σχήμα 33.



Σχήμα 33. Απόκριση της ενσωματωμένης κυψελίδας Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE σε πρότυπα διαλύματα 30, 40, 60 mM Cl⁻ σε τεχνητό ιδρώτα και σε βιολογικό ιδρώτα.

Η συμπεριφορά αυτή αποδόθηκε στη διαφορετική αγωγιμότητα του ηλεκτρολύτη αφού το δείγμα του βιολογικού ιδρώτα χρησιμοποιήθηκε χωρίς καμία προκατεργασία ή αραίωση. Ως εκ τούτου οι επόμενες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μετά την προσθήκη και εξάτμιση 2 μL τεχνητού ιδρώτα στην κυψελίδα. Ο όγκος αυτός τεχνητού ιδρώτα παρέμεινε στην κυψελίδα για λίγα λεπτά, και μετά την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 34, μετά τον εγκλιματισμό της κυψελίδας που περιγράφεται παραπάνω, η βολταμμετρική απόκριση σε βιολογικά δείγματα ήταν όμοια με αυτή σε πρότυπα διαλύματα χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα. Σύμφωνα με τις μετρήσεις που φαίνονται στο Σχήμα 34 και τον ένθετο πίνακα, η σχετική τυπική απόκλιση της μεθόδου για τρεις μετρήσεις ήταν 7% και 5% αντίστοιχα ενώ το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα ως προς τις τιμές που λήφθηκαν με τη μέθοδο αναφοράς ήταν 16.7% και -20.2% αντίστοιχα.



Σχήμα 34. Απόκριση της ενσωματωμένης κυψελίδας Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE σε πρότυπα διαλύματα 30, 40, 60 mM Cl⁻ σε τεχνητό ιδρώτα και σε βιολογικό ιδρώτα. Στο πλαίσιο δεζιά δίνονται οι τιμές της συγκέντρωση των χλωριούχων όπως υπολογίστηκαν με την κυψελίδα και τη μέθοδο αναφοράς.

5. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την επιτυχή κατασκευή μιας χαμηλού κόστους ηλεκτροχημικής διάταξης δυο ηλεκτροδίων με ενσωματωμένη κυψελίδα όγκου μικρολίτρων, η οποία βασίζεται σε δυο εκτυπωμένα ηλεκτρόδια, ένα εκ των οποίων φέρει μια κυκλική οπή, και μια διαχωριστική ταινία διπλής κολλητικής όψης. Η συναρμολόγηση της κυψελίδας είναι απλή και η χρήση της απαιτεί όγκο δείγματος <2 μL.

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν την προτεινόμενη αναλυτική συσκευή κατάλληλη για την ανάλυση βιολογικών υγρών με περιορισμένη διαθεσιμότητα, όπως ο ιδρώτας, το δάκρυ κ.λπ και τη χρήση της σε εφαρμογές στο σημείο περίθαλψης (point-of-care).

Η επαναληψιμότητα στην κατασκευή των κυψελίδων είναι εξαιρετική, ενώ ανάλογα με το υλικό του ηλεκτροδίου εργασίας ή την κατάλληλη τροποποίηση της επιφάνειάς του, η συγκεκριμένη κατασκευή μπορεί να βρει ευρεία εφαρμογή για τον προσδιορισμό διαφόρων βιοδεικτών και τη διάγνωση ασθενειών.

Τα ηλεκτρόδια που αποτελούν την ηλεκτροχημική διάταξη είναι επίπεδα και έχουν εκτυπωθεί σε εύκαμπτο υπόστρωμα επιτρέποντας σε μια μελλοντική αναβάθμιση, να μπορεί να ενσωματωθεί σε μία φορετή διάταξη (π.χ. περικάρπιο)

Η ηλεκτροχημική διάταξη *Ag/AgCl-SPE/Ag-SPE* παρέχει αξιόπιστες μετρήσεις για τον προσδιορισμό χλωριούχων σε τεχνητό ιδρώτα στο εύρος συγκεντρώσεων 20-100 mM χλωριούχων και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης αν και η χρήση της σε δείγματα βιολογικού ιδρώτα απαιτεί περαιτέρω μελέτες βελτιστοποίησης.

Βιβλιογραφία

- G. E. Palomaki, S. C. Fitzsimmons, and J. E. Haddow, "Clinical sensitivity of prenatal screening for cystic fibrosis via CFTR carrier testing in a United States panethnic population," *Genetics in Medicine*, vol. 6, no. 5, pp. 405–414, Sep. 2004, doi: 10.1097/01.GIM.0000139505.06194.39.
- [2] M. R. Kosorok, W.-H. We1, and P. M. Farrell, "THE INCIDENCE OF CYSTIC FIBROSIS," *Stat Med*, vol. 15, pp. 449–462, Mar. 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-0258(19960315)15:5<449::AID-SIM173>3.0.CO;2-X.
- [3] A. Hamosh, S. C. FitzSimmons, M. Macek, M. R. Knowles, B. Jr. Rosenstein, and G. R. Cutting, "Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients," *J Pediatr*, vol. 132, no. 2, pp. 255–259, Feb. 1998, doi: 10.1016/S0022-3476(98)70441-X.
- [4] J. A. Dodge *et al.*, "Incidence, population, and survival of cystic fibrosis in the UK, 1968- 95," *Arch Dis Child*, vol. 77, no. 6, pp. 493–496, 1997, doi: 10.1136/adc.77.6.493.
- [5] M. Claustres *et al.*, "Spectrum of CFTR Mutations in Cystic Fibrosis and in Congenital Absence of the Vas Deferens in France," 2000.
- [6] P. M. Farrell, "The prevalence of cystic fibrosis in the European Union," *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 7, no. 5, pp. 450–453, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.007.
- [7] C. S. Herrington, *Muir's Παθολογική Ανατομική*. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Broken Hill Publishers LTD, 2019.
- [8] K. Bat-Sheva *et al.*, "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis," *Science (1979)*, vol. 245, no. 4922, pp. 1073–1080, Sep. 1989, doi: 10.1126/science.2570460.
- [9] "Clinical and Functional Translation of CFTR." https://cftr2.org/ (accessed Apr. 04, 2022).
- [10] B. Bosch and K. De Boeck, "Searching for a cure for cystic fibrosis. A 25-year quest in a nutshell," *Eur J Pediatr*, vol. 175, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2016, doi: 10.1007/s00431-015-2664-8.
- P. B. Davis, "Cystic Fibrosis Since 1938," Am J Respir Crit Care Med, vol. 173, no. 5, pp. 475–482, Mar. 2006, doi: 10.1164/rccm.200505-8400E.
- [12] J. A. Dodge, P. A. Lewis, M. Stanton, and J. Wilsher, "Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003," *European Respiratory Journal*, vol. 29, no. 3, pp. 522–526, Mar. 2007, doi: 10.1183/09031936.00099506.
- [13] UK Cystic Fibrosis Registry, "2020 Annual Data Report," 2021. Accessed: Apr. 05, 2022.
 [Online]. Available: https://www.cysticfibrosis.org.uk/the-work-we-do/uk-cf-registry/reportingand-resources
- [14] Ελληνική Εταιρεία για την Ινώδη Κυστική Νόσο, "Η κατάσταση στην Ελλάδα." http://www.cysticfibrosis.gr/el/%CE%B7-

% CE% BD% CF% 8C% CF% 83% CE% BF% CF% 82/% CF% 84% CE% B9-% CE% B5% CE% AF% CE% BD% CE% B1% CE% B9-% CE% B7-% CE% BA% CF% 85% CF% 83% CF% 84% CE% B9% CE% BA% CE% AE-% CE% AF% CE% BD% CF% 89% CF% 83% CE% B7/% CE% B7-% CE% BA% CE% B1% CF% 84% CE% AC% CF% 83% CF% 84% CE% B1% CF% 83% CE% B7-% CF% 83% CF% 84% CE% B7% CE% BD-% CE% B5% CE% BB% CE% BB% CE% AC% CE% B4% CE% B1 (accessed Apr. 06, 2022).

- [15] D. Salvatore *et al.*, "An overview of international literature from cystic fibrosis registries. Part 3. Disease incidence, genotype/phenotype correlation, microbiology, pregnancy, clinical complications, lung transplantation, and miscellanea," *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 10, no. 2, pp. 71–85, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.jcf.2010.12.005.
- [16] K. W. Southern *et al.*, "A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe," *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 6, no. 1, pp. 57–65, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.jcf.2006.05.008.
- [17] World Health Organization, "Cholera fact sheet," 2017. https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cholera (accessed Apr. 06, 2022).
- [18] F. H. Epstein, M. Field, M. C. Rao, and E. B. Chang, "Intestinal Electrolyte Transport and Diarrheal Disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 321, no. 13, pp. 879–883, Sep. 1989, doi: 10.1056/NEJM198909283211307.
- [19] B. E. Goodman and W. H. Percy, "CFTR in cystic fibrosis and cholera: from membrane transport to clinical practice," *Adv Physiol Educ*, vol. 29, no. 2, pp. 75–82, Jun. 2005, doi: 10.1152/advan.00035.2004.
- [20] A. W. Cuthbert, J. Halstead, R. Ratcliff, W. H. Colledge, and M. J. Evans, "The genetic advantage hypothesis in cystic fibrosis heterozygotes: a murine study.," *J Physiol*, vol. 482, no. 2, pp. 449– 454, Jan. 1995, doi: 10.1113/jphysiol.1995.sp020531.
- [21] P. M. QUINTON, "Physiological Basis of Cystic Fibrosis: A Historical Perspective," *Physiol Rev*, vol. 79, no. 1, pp. S3–S22, Jan. 1999, doi: 10.1152/physrev.1999.79.1.S3.
- [22] M. Hodson, A. Bush, and D. Geddes, *Cystic Fibrosis*, Third. CRC Press, 2007.
- [23] M. R. Knowles and P. R. Durie, "What is Cystic Fibrosis?," N Engl J Med, vol. 347, no. 6, pp. 439–442, Aug. 2002, doi: 10.1056/NEJMe020070.
- [24] S. Kumar, A. Tana, and A. Shankar, "Cystic fibrosis What are the prospects for a cure?," *European Journal of Internal Medicine*, vol. 25, no. 9. Elsevier B.V., pp. 803–807, Nov. 01, 2014. doi: 10.1016/j.ejim.2014.09.018.
- [25] D. S. Holsclaw, A. D. Perlmutter, H. Jockin, and H. Shwachman, "Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis.," *J Urol*, vol. 106, no. 4, pp. 568–574, 1971, doi: 10.1016/S0022-5347(17)61343-0.
- [26] M. N. Sheppard and A. G. Nicholson, "The pathology of cystic fibrosis," *Current Diagnostic Pathology*, vol. 8, no. 1. Churchill Livingstone, pp. 50–59, 2002. doi: 10.1054/cdip.2001.0088.
- [27] B. Taylor, J. N. Evans, and G. A. Hope, "Upper respiratory tract in cystic fibrosis. Ear-nose-throat survey of 50 children.," *Arch Dis Child*, vol. 49, no. 2, pp. 133–6, Feb. 1974, doi: 10.1136/adc.49.2.133.
- [28] R. Dinwiddie, "Pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis.," *Respiration*, vol. 67, no. 1, pp. 3– 8, 2000, doi: 10.1159/000029453.
- [29] P. Laufer *et al.*, "Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis.," J Allergy Clin Immunol, vol. 73, no. 1 Pt 1, pp. 44–8, Jan. 1984, doi: 10.1016/0091-6749(84)90482-2.
- [30] C. P. Maguire, J. P. Hayes, M. Hayes, J. Masterson, and M. X. FitzGerald, "Three cases of pulmonary aspergilloma in adult patients with cystic fibrosis.," *Thorax*, vol. 50, no. 7, pp. 805–6, Jul. 1995, doi: 10.1136/thx.50.7.805.
- [31] R. C. Stern *et al.*, "Heart failure in cystic fibrosis. Treatment and prognosis of cor pulmonale with failure of the right side of the heart.," *Am J Dis Child*, vol. 134, no. 3, pp. 267–72, Mar. 1980, doi: 10.1001/archpedi.1980.02130150025007.
- [32] G. T. Szeifert, M. Szabó, and Z. Papp, "Morphology of cystic fibrosis at 17 weeks of gestation.," *Clin Genet*, vol. 28, no. 6, pp. 561–5, Dec. 1985, doi: 10.1111/j.1399-0004.1985.tb00427.x.
- [33] R. Murshed, L. Spitz, E. Kiely, and D. Drake, "Meconium ileus: a ten-year review of thirty-six patients.," *Eur J Pediatr Surg*, vol. 7, no. 5, pp. 275–7, Oct. 1997, doi: 10.1055/s-2008-1071170.
- [34] L. R. Sweney, M. C. Hedrick, L. H. Meskin, and W. J. Warwick, "The involvement of the labial mucous salivary gland in patients with cystic fibrosis. II. The heterozygote state.," *Pediatrics*, vol. 40, no. 3, pp. 421–4, Sep. 1967.
- [35] J. P. Neglia *et al.*, "The risk of cancer among patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis and Cancer Study Group.," *N Engl J Med*, vol. 332, no. 8, pp. 494–9, Feb. 1995, doi: 10.1056/NEJM199502233320803.
- [36] L. L. KULCZYCKI and H. SHWACHMAN, "Studies in cystic fibrosis of the pancreas; occurrence of rectal prolapse.," *N Engl J Med*, vol. 259, no. 9, pp. 409–12, Aug. 1958, doi: 10.1056/NEJM195808282590901.
- [37] H. Shwachman, E. Lebenthal, and K. T. Khaw, "Recurrent acute pancreatitis in patients with cystic fibrosis with normal pancreatic enzymes.," *Pediatrics*, vol. 55, no. 1, pp. 86–95, Jan. 1975.
- [38] J. C. Yoon, J. L. Casella, M. Litvin, and A. S. Dobs, "Male reproductive health in cystic fibrosis," *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 18, pp. S105–S110, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.jcf.2019.08.007.
- [39] A. Ahmad, A. Ahmed, and P. Patrizio, "Cystic fibrosis and fertility.," *Curr Opin Obstet Gynecol*, vol. 25, no. 3, pp. 167–72, Jun. 2013, doi: 10.1097/GCO.0b013e32835f1745.

- [40] J. M. Boyd, A. Mehta, and D. J. Murphy, "Fertility and pregnancy outcomes in men and women with cystic fibrosis in the United Kingdom," *Human Reproduction*, vol. 19, no. 10, pp. 2238– 2243, Oct. 2004, doi: 10.1093/humrep/deh405.
- [41] M. Johannesson, N. Bogdanovic, A.-C. S. Nordqvist, L. Hjelte, and M. Schalling, "Cystic fibrosis mRNA expression in rat brain," *Neuroreport*, vol. 8, no. 2, pp. 535–539, Jan. 1997, doi: 10.1097/00001756-199701200-00031.
- [42] V. A. Stallings *et al.*, "Adolescent development and energy expenditure in females with cystic fibrosis," *Clinical Nutrition*, vol. 24, no. 5, pp. 737–745, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.clnu.2005.02.005.
- [43] L. E. Kopito, H. J. Kosasky, and H. Shwachman, "Water and Electrolytes in Cervical Mucus from Patients with Cystic Fibrosis**Supported in part by a grant-in-aid from the Syntex Corporation, Palo Alto, California, The National Cystic Fibrosis Research Foundation, and Grant AM 13385 from the National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, United States Public Health Service.," *Fertil Steril*, vol. 24, no. 7, pp. 512–516, Jul. 1973, doi: 10.1016/S0015-0282(16)39790-4.
- [44] E. F. Tizzano, M. M. Silver, D. Chitayat, J. C. Benichou, and M. Buchwald, "Differential cellular expression of cystic fibrosis transmembrane regulator in human reproductive tissues. Clues for the infertility in patients with cystic fibrosis.," *Am J Pathol*, vol. 144, no. 5, pp. 906–14, May 1994.
- [45] E. O. Reiter, "The Reproductive Endocrine System in Cystic Fibrosis," American Journal of Diseases of Children, vol. 135, no. 5, p. 422, May 1981, doi: 10.1001/archpedi.1981.02130290020009.
- [46] L. N. Chan *et al.*, "Distribution and Regulation of ENaC Subunit and CFTR mRNA Expression in Murine Female Reproductive Tract," *Journal of Membrane Biology*, vol. 185, no. 2, pp. 165–176, Jan. 2002, doi: 10.1007/s00232-001-0117-y.
- [47] M. Shteinberg *et al.*, "Failure to conceive in women with CF is associated with pancreatic insufficiency and advancing age," *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 18, no. 4, pp. 525–529, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.jcf.2018.10.009.
- [48] M. A. Matthay, R. A. Matthay, D. M. Mills, S. Lakshminarayan, and E. Cotton, "Hypertrophic osteoarthropathy in adults with cystic fibrosis.," *Thorax*, vol. 31, no. 5, pp. 572–5, Oct. 1976, doi: 10.1136/thx.31.5.572.
- [49] D. S. Donovan *et al.*, "Bone mass and vitamin D deficiency in adults with advanced cystic fibrosis lung disease.," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 157, no. 6 Pt 1, pp. 1892–9, Jun. 1998, doi: 10.1164/ajrccm.157.6.9712089.
- [50] J. H. Sung, S. H. Park, A. R. Mastri, and W. J. Warwick, "Axonal dystrophy in the gracile nucleus in congenital biliary atresia and cystic fibrosis (mucoviscidosis): beneficial effect of vitamin E therapy.," *J Neuropathol Exp Neurol*, vol. 39, no. 5, pp. 584–97, Sep. 1980, doi: 10.1097/00005072-198009000-00007.

- [51] B. L. Therrell *et al.*, "Current status of newborn screening worldwide: 2015," *Semin Perinatol*, vol. 39, no. 3, pp. 171–187, Apr. 2015, doi: 10.1053/J.SEMPERI.2015.03.002.
- [52] B. L. Therrell and W. H. Hannon, "Newborn dried blood spot screening: residual specimen storage issues.," *Pediatrics*, vol. 129, no. 2, pp. 365–6, Feb. 2012, doi: 10.1542/peds.2011-3416.
- [53] G. Travert, M. Heeley, and A. Heeley, "History of Newborn Screening for Cystic Fibrosis—The Early Years," *Int J Neonatal Screen*, vol. 6, no. 1, p. 8, Jan. 2020, doi: 10.3390/ijns6010008.
- [54] A. Munck *et al.*, "European survey of newborn bloodspot screening for CF: opportunity to address challenges and improve performance," *Journal of Cystic Fibrosis*, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.jcf.2022.09.012.
- [55] M. W. Baker, M. Groose, G. Hoffman, M. Rock, H. Levy, and P. M. Farrell, "Optimal DNA tier for the IRT/DNA algorithm determined by CFTR mutation results over 14years of newborn screening," *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 10, no. 4, pp. 278–281, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.jcf.2011.02.001.
- [56] M. Arrudi-Moreno, R. García-Romero, P. Samper-Villagrasa, M. J. Sánchez-Malo, and C. Martinde-Vicente, "Neonatal cystic fibrosis screening: Analysis and differences in immunoreactive trypsin levels in newborns with a positive screen," *Anales de Pediatría (English Edition)*, vol. 95, no. 1, pp. 11–17, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.anpede.2020.04.022.
- [57] S. D. Grosse, M. Rosenfeld, O. J. Devine, H. J. Lai, and P. M. Farrell, "Potential impact of newborn screening for cystic fibrosis on child survival: a systematic review and analysis.," J Pediatr, vol. 149, no. 3, pp. 362–6, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.jpeds.2006.04.059.
- [58] F. N. Dijk, K. McKay, F. Barzi, K. J. Gaskin, and D. A. Fitzgerald, "Improved survival in cystic fibrosis patients diagnosed by newborn screening compared to a historical cohort from the same centre.," *Arch Dis Child*, vol. 96, no. 12, pp. 1118–23, Dec. 2011, doi: 10.1136/archdischild-2011-300449.
- [59] G. Tridello, C. Castellani, I. Meneghelli, A. Tamanini, and B. M. Assael, "Early diagnosis from newborn screening maximises survival in severe cystic fibrosis.," *ERJ Open Res*, vol. 4, no. 2, Apr. 2018, doi: 10.1183/23120541.00109-2017.
- [60] H. J. Lai, Y. Cheng, and P. M. Farrell, "The survival advantage of patients with cystic fibrosis diagnosed through neonatal screening: evidence from the United States Cystic Fibrosis Foundation registry data.," *J Pediatr*, vol. 147, no. 3 Suppl, pp. S57-63, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.jpeds.2005.08.014.
- [61] "Report of the committe for a study for evaluation of testing for cystic fibrosis.," *J Pediatr*, vol. 88, no. 4 Pt 2, pp. 711–50, Apr. 1976, doi: 10.1016/s0022-3476(76)81041-4.
- [62] P. R. Sosnay *et al.*, "Diagnosis of Cystic Fibrosis in Nonscreened Populations," *J Pediatr*, vol. 181, pp. S52-S57.e2, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.jpeds.2016.09.068.

- [63] "Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2021 annual data report. Bethesda (MD): Cystic Fibrosis Foundation; 2021".
- [64] C. L. Ren *et al.*, "Outcomes of Infants With Indeterminate Diagnosis Detected by Cystic Fibrosis Newborn Screening," *Pediatrics*, vol. 135, no. 6, pp. e1386–e1392, Jun. 2015, doi: 10.1542/peds.2014-3698.
- [65] R. B. Parad and A. M. Comeau, "Diagnostic dilemmas resulting from the immunoreactive trypsinogen/DNA cystic fibrosis newborn screening algorithm," *J Pediatr*, vol. 147, no. 3, pp. S78–S82, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.jpeds.2005.08.017.
- [66] H. Levy and P. M. Farrell, "New Challenges in the Diagnosis and Management of Cystic Fibrosis," *J Pediatr*, vol. 166, no. 6, pp. 1337–1341, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.jpeds.2015.03.042.
- [67] P. M. Farrell *et al.*, "Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation.," *J Pediatr*, vol. 181S, pp. S4-S15.e1, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.jpeds.2016.09.064.
- [68] P. E. A. DI SANT'AGNESE and D. H. ANDERSEN, "Cystic fibrosis of the pancreas.," *Prog Pediat Study*, vol. (1 Vol.), pp. 160–76, 1948, [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18105632
- [69] C. M. ANDERSON and M. FREEMAN, "Sweat test' results in normal persons of different ages compared with families with fibrocystic disease of the pancreas.," *Arch Dis Child*, vol. 35, no. 184, pp. 581–7, Dec. 1960, doi: 10.1136/adc.35.184.581.
- [70] "NCCLS. Sweat testing: Sample Collection and Quantitative Analysis; Approved Guideline -Second edition. Document C34-A2. Wayne: The Committee 2000,"
- [71] A. Green, J. Kirk, and Guidelines Development Group, "Guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis.," *Ann Clin Biochem*, vol. 44, no. Pt 1, pp. 25–34, Jan. 2007, doi: 10.1258/000456307779596011.
- [72] V. A. LeGrys, "Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations.," J Pediatr, vol. 129, no. 6, pp. 892–7, Dec. 1996, doi: 10.1016/s0022-3476(96)70034-3.
- [73] L. E. GIBSON and R. E. COOKE, "A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis.," *Pediatrics*, vol. 23, no. 3, pp. 545–9, Mar. 1959, [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13633369
- [74] R. B. Parad *et al.*, "Sweat testing infants detected by cystic fibrosis newborn screening.," J Pediatr, vol. 147, no. 3 Suppl, pp. S69-72, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.jpeds.2005.08.015.
- [75] K. B. Hammond, N. L. Turcios, and L. E. Gibson, "Clinical evaluation of the macroduct sweat collection system and conductivity analyzer in the diagnosis of cystic fibrosis," *J Pediatr*, vol. 124, no. 2, pp. 255–260, Feb. 1994, doi: 10.1016/S0022-3476(94)70314-0.
- [76] S. S. Schales, O., Schales, "A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids," *Journal of Biological Chemistry*, vol. Vol.140, pp. 879–884, 1941.

- [77] "https://macroductadvanced.com/." https://macroductadvanced.com/
- [78] AACB Sweat Testing Working Party *et al.*, "Australian guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis: report from the AACB Sweat Testing Working Party.," *Clin Biochem Rev*, vol. 27, no. 2, pp. S1-7, May 2006, [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077877
- [79] "CF Center Directors Update No. 1. Bethesda (MD): Cystic Fibrosis Foundation, 1990.".
- [80] V. A. LeGrys, "Assessment of sweat-testing practices for the diagnosis of cystic fibrosis.," Arch Pathol Lab Med, vol. 125, no. 11, pp. 1420–4, Nov. 2001, doi: 10.5858/2001-125-1420-AOSTPF.
- [81] M. E. Heeley, D. A. Woolf, and A. F. Heeley, "Indirect measurements of sweat electrolyte concentration in the laboratory diagnosis of cystic fibrosis.," *Arch Dis Child*, vol. 82, no. 5, pp. 420–4, May 2000, doi: 10.1136/adc.82.5.420.
- [82] G. Mastella, G. Di Cesare, A. Borruso, L. Menin, and L. Zanolla, "Reliability of sweat-testing by the Macroduct collection method combined with conductivity analysis in comparison with the classic Gibson and Cooke technique.," *Acta Paediatr*, vol. 89, no. 8, pp. 933–7, Aug. 2000, doi: 10.1080/080352500750043378.
- [83] J. Barben, R. A. Ammann, A. Metlagel, M. H. Schoeni, and Swiss Paediatric Respiratory Research Group, "Conductivity determined by a new sweat analyzer compared with chloride concentrations for the diagnosis of cystic fibrosis.," *J Pediatr*, vol. 146, no. 2, pp. 183–8, Feb. 2005, doi: 10.1016/j.jpeds.2004.08.085.
- [84] C. S. Rueegg *et al.*, "Comparison of two sweat test systems for the diagnosis of cystic fibrosis in newborns.," *Pediatr Pulmonol*, vol. 54, no. 3, pp. 264–272, Mar. 2019, doi: 10.1002/ppul.24227.
- [85] V. A. LeGrys, J. R. Yankaskas, L. M. Quittell, B. C. Marshall, and P. J. Mogayzel, "Diagnostic Sweat Testing: The Cystic Fibrosis Foundation Guidelines," *J Pediatr*, vol. 151, no. 1, pp. 85–89, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.jpeds.2007.03.002.
- [86] P. M. Farrell *et al.*, "Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report," *J Pediatr*, vol. 153, no. 2, pp. S4–S14, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.jpeds.2008.05.005.
- [87] J. A. Rogers, T. Someya, and Y. Huang, "Materials and mechanics for stretchable electronics.," *Science*, vol. 327, no. 5973, pp. 1603–7, Mar. 2010, doi: 10.1126/science.1182383.
- [88] J. Heikenfeld *et al.*, "Wearable sensors: modalities, challenges, and prospects.," *Lab Chip*, vol. 18, no. 2, pp. 217–248, Jan. 2018, doi: 10.1039/c7lc00914c.
- [89] A. J. Bandodkar and J. Wang, "Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review.," *Trends Biotechnol*, vol. 32, no. 7, pp. 363–71, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.tibtech.2014.04.005.

- [90] S. Choi, H. Lee, R. Ghaffari, T. Hyeon, and D.-H. Kim, "Recent Advances in Flexible and Stretchable Bio-Electronic Devices Integrated with Nanomaterials.," *Adv Mater*, vol. 28, no. 22, pp. 4203–18, Jun. 2016, doi: 10.1002/adma.201504150.
- [91] Z. Bao and X. Chen, "Flexible and Stretchable Devices.," *Adv Mater*, vol. 28, no. 22, pp. 4177–9, Jun. 2016, doi: 10.1002/adma.201601422.
- [92] T. Someya, Z. Bao, and G. G. Malliaras, "The rise of plastic bioelectronics.," *Nature*, vol. 540, no. 7633, pp. 379–385, Dec. 2016, doi: 10.1038/nature21004.
- [93] R. K. Mishra *et al.*, "Wearable Flexible and Stretchable Glove Biosensor for On-Site Detection of Organophosphorus Chemical Threats.," *ACS Sens*, vol. 2, no. 4, pp. 553–561, Apr. 2017, doi: 10.1021/acssensors.7b00051.
- [94] Y. M. Park *et al.*, "Flexible nanopillar-based electrochemical sensors for genetic detection of foodborne pathogens," *Nano Converg*, vol. 5, no. 1, p. 15, Dec. 2018, doi: 10.1186/s40580-018-0147-0.
- [95] P. C. Ferreira *et al.*, "Wearable electrochemical sensors for forensic and clinical applications," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 119, p. 115622, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.115622.
- [96] A. J. Bandodkar, W. J. Jeang, R. Ghaffari, and J. A. Rogers, "Wearable Sensors for Biochemical Sweat Analysis.," *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, vol. 12, no. 1, pp. 1–22, Jun. 2019, doi: 10.1146/annurev-anchem-061318-114910.
- [97] "Wearable Sensors Market Worth \$2.86 Billion By 2025 j CAGR: 38.8%, (n.d.). https://www.grandviewresearch.com/press-release/wearable-sensorsmarket."
- [98] J. R. Windmiller, A. J. Bandodkar, G. Valdés-Ramírez, S. Parkhomovsky, A. G. Martinez, and J. Wang, "Electrochemical sensing based on printable temporary transfer tattoos," *Chemical Communications*, vol. 48, no. 54, p. 6794, 2012, doi: 10.1039/c2cc32839a.
- [99] M. Bariya *et al.*, "Roll-to-Roll Gravure Printed Electrochemical Sensors for Wearable and Medical Devices," *ACS Nano*, vol. 12, no. 7, pp. 6978–6987, Jul. 2018, doi: 10.1021/acsnano.8b02505.
- [100] J. R. Windmiller, A. J. Bandodkar, S. Parkhomovsky, and J. Wang, "Stamp transfer electrodes for electrochemical sensing on non-planar and oversized surfaces," *Analyst*, vol. 137, no. 7, p. 1570, 2012, doi: 10.1039/c2an35041f.
- [101] Y. Qin, A. U. Alam, M. M. R. Howlader, N.-X. Hu, and M. J. Deen, "Inkjet Printing of a Highly Loaded Palladium Ink for Integrated, Low-Cost pH Sensors," *Adv Funct Mater*, vol. 26, no. 27, pp. 4923–4933, Jul. 2016, doi: 10.1002/adfm.201600657.
- [102] Y. Dong, X. Min, and W. S. Kim, "A 3-D-Printed Integrated PCB-Based Electrochemical Sensor System," *IEEE Sens J*, vol. 18, no. 7, pp. 2959–2966, Apr. 2018, doi: 10.1109/JSEN.2018.2801459.

- [103] W. Gao *et al.*, "Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed in situ perspiration analysis," *Nature*, vol. 529, no. 7587, pp. 509–514, Jan. 2016, doi: 10.1038/nature16521.
- [104] Z. Matharu, P. Daggumati, L. Wang, T. S. Dorofeeva, Z. Li, and E. Seker, "Nanoporous-Gold-Based Electrode Morphology Libraries for Investigating Structure-Property Relationships in Nucleic Acid Based Electrochemical Biosensors.," ACS Appl Mater Interfaces, vol. 9, no. 15, pp. 12959–12966, Apr. 2017, doi: 10.1021/acsami.6b15212.
- [105] Z. Matharu, A. J. Bandodkar, V. Gupta, and B. D. Malhotra, "Fundamentals and application of ordered molecular assemblies to affinity biosensing," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 3, pp. 1363– 1402, 2012, doi: 10.1039/C1CS15145B.
- [106] V. Biju, "Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy.," *Chem Soc Rev*, vol. 43, no. 3, pp. 744–64, Feb. 2014, doi: 10.1039/c3cs60273g.
- [107] J. Wang, "Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review," *Electroanalysis*, vol. 17, no. 1, pp. 7–14, Jan. 2005, doi: 10.1002/elan.200403113.
- [108] D. A. Kidwell, J. C. Holland, and S. Athanaselis, "Testing for drugs of abuse in saliva and sweat.," *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, vol. 713, no. 1, pp. 111–35, Aug. 1998, doi: 10.1016/s0378-4347(97)00572-0.
- [109] C. J. Harvey, R. F. LeBouf, and A. B. Stefaniak, "Formulation and stability of a novel artificial human sweat under conditions of storage and use.," *Toxicol In Vitro*, vol. 24, no. 6, pp. 1790–6, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.tiv.2010.06.016.
- [110] H. Li and R. B. Smart, "Determination of sub-nanomolar concentration of arsenic(III) in natural waters by square wave cathodic stripping voltammetry," *Anal Chim Acta*, vol. 325, no. 1–2, pp. 25–32, May 1996, doi: 10.1016/0003-2670(96)00011-6.
- [111] S. L. Z. Jiokeng, L. M. Dongmo, E. Ymélé, E. Ngameni, and I. K. Tonlé, "Sensitive stripping voltammetry detection of Pb(II) at a glassy carbon electrode modified with an aminofunctionalized attapulgite," *Sens Actuators B Chem*, vol. 242, pp. 1027–1034, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.snb.2016.09.150.
- [112] A. J. Bandodkar *et al.*, "Solid-state Forensic Finger sensor for integrated sampling and detection of gunshot residue and explosives: towards 'Lab-on-a-finger," *Analyst*, vol. 138, no. 18, p. 5288, 2013, doi: 10.1039/c3an01179h.
- [113] B. J. Sanghavi, O. S. Wolfbeis, T. Hirsch, and N. S. Swami, "Nanomaterial-based electrochemical sensing of neurological drugs and neurotransmitters," *Microchimica Acta*, vol. 182, no. 1–2, pp. 1–41, Jan. 2015, doi: 10.1007/s00604-014-1308-4.
- [114] A. Izadyar, D. R. Arachchige, H. Cornwell, and J. C. Hershberger, "Ion transfer stripping voltammetry for the detection of nanomolar levels of fluoxetine, citalopram, and sertraline in tap and river water samples," *Sens Actuators B Chem*, vol. 223, pp. 226–233, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.snb.2015.09.048.

- [115] M. de Jong *et al.*, "Electrochemical fingerprint of street samples for fast on-site screening of cocaine in seized drug powders," *Chem Sci*, vol. 7, no. 3, pp. 2364–2370, 2016, doi: 10.1039/C5SC04309C.
- [116] J. Choi, R. Ghaffari, L. B. Baker, and J. A. Rogers, "Skin-interfaced systems for sweat collection and analytics," *Sci Adv*, vol. 4, no. 2, Feb. 2018, doi: 10.1126/sciadv.aar3921.
- [117] Y. Sekine *et al.*, "A fluorometric skin-interfaced microfluidic device and smartphone imaging module for in situ quantitative analysis of sweat chemistry," *Lab Chip*, vol. 18, no. 15, pp. 2178– 2186, 2018, doi: 10.1039/C8LC00530C.
- [118] B. Ciui *et al.*, "Wearable Wireless Tyrosinase Bandage and Microneedle Sensors: Toward Melanoma Screening," *Adv Healthc Mater*, vol. 7, no. 7, p. 1701264, Apr. 2018, doi: 10.1002/adhm.201701264.
- [119] J. L. Boyle, H. M. Haupt, J. B. Stern, and H. A. B. Multhaupt, "Tyrosinase Expression in Malignant Melanoma, Desmoplastic Melanoma, and Peripheral Nerve Tumors," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 126, no. 7, pp. 816–822, Jul. 2002, doi: 10.5858/2002-126-0816-TEIMMD.
- [120] X. Yan, H. Li, W. Zheng, and X. Su, "Visual and Fluorescent Detection of Tyrosinase Activity by Using a Dual-Emission Ratiometric Fluorescence Probe," *Anal Chem*, vol. 87, no. 17, pp. 8904– 8909, Sep. 2015, doi: 10.1021/acs.analchem.5b02037.
- [121] J. R. Sempionatto *et al.*, "Wearable Ring-Based Sensing Platform for Detecting Chemical Threats," ACS Sens, vol. 2, no. 10, pp. 1531–1538, Oct. 2017, doi: 10.1021/acssensors.7b00603.
- [122] A. Barfidokht *et al.*, "Wearable electrochemical glove-based sensor for rapid and on-site detection of fentanyl," *Sens Actuators B Chem*, vol. 296, p. 126422, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.snb.2019.04.053.
- [123] Y. Lee *et al.*, "Wireless, intraoral hybrid electronics for real-time quantification of sodium intake toward hypertension management.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 115, no. 21, pp. 5377–5382, May 2018, doi: 10.1073/pnas.1719573115.
- [124] M. Dervisevic, M. Alba, B. Prieto-Simon, and N. H. Voelcker, "Skin in the diagnostics game: Wearable biosensor nano- and microsystems for medical diagnostics," *Nano Today*, vol. 30, p. 100828, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.nantod.2019.100828.
- [125] J. R. Sempionatto, I. Jeerapan, S. Krishnan, and J. Wang, "Wearable Chemical Sensors: Emerging Systems for On-Body Analytical Chemistry," *Anal Chem*, vol. 92, no. 1, pp. 378–396, Jan. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.9b04668.
- [126] D. Kinnamon, R. Ghanta, K.-C. Lin, S. Muthukumar, and S. Prasad, "Portable biosensor for monitoring cortisol in low-volume perspired human sweat," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 13312, Oct. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13684-7.
- [127] K. Wilke, A. Martin, L. Terstegen, and S. S. Biel, "A short history of sweat gland biology," *Int J Cosmet Sci*, vol. 29, no. 3, pp. 169–179, Jun. 2007, doi: 10.1111/j.1467-2494.2007.00387.x.

- [128] N. A. Taylor and C. A. Machado-Moreira, "Regional variations in transepidermal water loss, eccrine sweat gland density, sweat secretion rates and electrolyte composition in resting and exercising humans," *Extrem Physiol Med*, vol. 2, no. 1, p. 4, Dec. 2013, doi: 10.1186/2046-7648-2-4.
- [129] C. Wang, C. Wang, Z. Huang, and S. Xu, "Materials and Structures toward Soft Electronics," *Advanced Materials*, vol. 30, no. 50, p. 1801368, Dec. 2018, doi: 10.1002/adma.201801368.
- [130] A. J. Bandodkar, W. J. Jeang, R. Ghaffari, and J. A. Rogers, "Wearable Sensors for Biochemical Sweat Analysis.," *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, vol. 12, no. 1, pp. 1–22, Jun. 2019, doi: 10.1146/annurev-anchem-061318-114910.
- [131] A. J. Bandodkar, I. Jeerapan, J.-M. You, R. Nuñez-Flores, and J. Wang, "Highly Stretchable Fully-Printed CNT-Based Electrochemical Sensors and Biofuel Cells: Combining Intrinsic and Design-Induced Stretchability," *Nano Lett*, vol. 16, no. 1, pp. 721–727, Jan. 2016, doi: 10.1021/acs.nanolett.5b04549.
- [132] A. Martín *et al.*, "Epidermal Microfluidic Electrochemical Detection System: Enhanced Sweat Sampling and Metabolite Detection," *ACS Sens*, vol. 2, no. 12, pp. 1860–1868, Dec. 2017, doi: 10.1021/acssensors.7b00729.
- [133] S. Emaminejad *et al.*, "Autonomous sweat extraction and analysis applied to cystic fibrosis and glucose monitoring using a fully integrated wearable platform," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 114, no. 18, pp. 4625–4630, May 2017, doi: 10.1073/pnas.1701740114.
- [134] A. J. Bandodkar *et al.*, "Epidermal tattoo potentiometric sodium sensors with wireless signal transduction for continuous non-invasive sweat monitoring," *Biosens Bioelectron*, vol. 54, pp. 603–609, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.bios.2013.11.039.
- [135] D. P. Rose *et al.*, "Adhesive RFID Sensor Patch for Monitoring of Sweat Electrolytes," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 62, no. 6, pp. 1457–1465, Jun. 2015, doi: 10.1109/TBME.2014.2369991.
- [136] D.-H. Choi, Y. Li, G. R. Cutting, and P. C. Searson, "A wearable potentiometric sensor with integrated salt bridge for sweat chloride measurement," *Sens Actuators B Chem*, vol. 250, pp. 673– 678, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.snb.2017.04.129.
- [137] D.-H. Choi, J. S. Kim, G. R. Cutting, and P. C. Searson, "Wearable Potentiometric Chloride Sweat Sensor: The Critical Role of the Salt Bridge," *Anal Chem*, vol. 88, no. 24, pp. 12241–12247, Dec. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b03391.
- [138] D.-H. Choi *et al.*, "Sweat test for cystic fibrosis: Wearable sweat sensor vs. standard laboratory test," *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 17, no. 4, pp. e35–e38, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.jcf.2018.03.005.
- [139] M. F. L. de Mele, R. C. Salvarezza, V. D. Vasquez Moll, H. A. Videla, and A. J. Arvia, "Kinetics and Mechanism of Silver Chloride Electroformation during the Localized Electrodissolution of Silver in Solutions Containing Sodium Chloride," *J Electrochem Soc*, vol. 133, no. 4, pp. 746– 752, Apr. 1986, doi: 10.1149/1.2108667.

- [140] M. Parrilla, I. Ortiz-Gómez, R. Cánovas, A. Salinas-Castillo, M. Cuartero, and G. A. Crespo, "Wearable Potentiometric Ion Patch for On-Body Electrolyte Monitoring in Sweat: Toward a Validation Strategy to Ensure Physiological Relevance," *Anal Chem*, vol. 91, no. 13, pp. 8644– 8651, Jul. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b02126.
- [141] I. Iwasaki, S. Utsumi, and T. Ozawa, "New Colorimetric Determination of Chloride using Mercuric Thiocyanate and Ferric Ion," *Bull Chem Soc Jpn*, vol. 25, no. 3, pp. 226–226, Mar. 1952, doi: 10.1246/bcsj.25.226.
- [142] J. G. Bergmann and John. Sanik, "Determination of Trace Amounts of Chlorine in Naphtha," Anal Chem, vol. 29, no. 2, pp. 241–243, Feb. 1957, doi: 10.1021/ac60122a018.
- [143] D. M. Zall, Donald. Fisher, and M. Q. Garner, "Photometric Determination of Chlorides in Water," Anal Chem, vol. 28, no. 11, pp. 1665–1668, Nov. 1956, doi: 10.1021/ac60119a009.
- [144] V. I. Birss and C. K. Smith, "The anodic behavior of silver in chloride solutions—I. The formation and reduction of thin silver chloride films," *Electrochim Acta*, vol. 32, no. 2, pp. 259–268, Feb. 1987, doi: 10.1016/0013-4686(87)85033-8.
- [145] T. K. Malongo, S. Patris, P. Macours, F. Cotton, J. Nsangu, and J.-M. Kauffmann, "Highly sensitive determination of iodide by ion chromatography with amperometric detection at a silverbased carbon paste electrode," *Talanta*, vol. 76, no. 3, pp. 540–547, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.talanta.2008.03.053.
- [146] Y. Guo and R. G. Compton, "A bespoke chloride sensor for seawater: Simple and fast with a silver electrode," *Talanta*, vol. 232, p. 122502, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.talanta.2021.122502.
- [147] R. D. Giles, "The anodic behaviour of silver single crystal electrodes in concentrated chloride solutions," *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem*, vol. 27, no. 1, pp. 11–19, Aug. 1970, doi: 10.1016/S0022-0728(70)80198-X.
- [148] S. Safari, P. R. Selvaganapathy, A. Derardja, and M. J. Deen, "Electrochemical growth of highaspect ratio nanostructured silver chloride on silver and its application to miniaturized reference electrodes," *Nanotechnology*, vol. 22, no. 31, p. 315601, Aug. 2011, doi: 10.1088/0957-4484/22/31/315601.
- [149] M. Cuartero, G. A. Crespo, and E. Bakker, "Paper-Based Thin-Layer Coulometric Sensor for Halid Determination," *Anal Chem*, vol. 87, no. 3, pp. 1981–1990, Feb. 2015, doi: 10.1021/ac504400w.

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η κατασκευή μιας χαμηλού κόστους ηλεκτροχημικής διάταξης δυο ηλεκτροδίων με ενσωματωμένη κυψελίδα όγκου 1.4 μL. Η διάταξη αποτελείται από δυο εκτυπωμένα ηλεκτρόδια τοποθετημένα αντικριστά, ένα εκ των οποίων φέρει μια κυκλική οπή (Ø1,6 mm), και μια διάτρητη (Ø 3,0 mm) διαγωριστική ταινία διπλής κολλητικής όψης πάχους 200 μm. Χρησιμοποιώντας εκτυπωμένα ηλεκτρόδια αργύρου (Ag-SPE) ή/και ηλεκτροεπιμεταλλωμένα ηλεκτρόδια Ag/AgCl-SPE ως ηλεκτρόδια εργασίας (WE) ή/και ως αντισταθμιστικά ηλεκτρόδια (CE) εξετάσαμε την ηλεκτροχημική απόκριση των αντίστοιχων διατάξεων για τον προσδιορισμό γλωριούχων στο εύρος συγκεντρώσεων 20-100 mM χλωριούχων, το οποίο παρέχει πληροφορίες για τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης. Η ηλεκτροχημική κυψελίδα Ag/AgCl-SPE(WE)/Ag-SPE(CE) παρείχε αξιόπιστες μετρήσεις και γρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό γλωριούγων σε δείγματα ιδρώτα. Η αναπαραγωγιμότητα μεταξύ διαδοχικών μετρήσεων ήταν 2.47 και 0.94% (60 και 80 mM χλωριούχων, n=3, αντίστοιγα), η επαναληψιμότητα μεταξύ τριών διαφορετικών κυψελίδων στα ίδια επίπεδα συγκεντρώσεων ήταν 14.69% και 6.31% αντίστοιγα, ενώ το επί τοις εκατό σγετικό σφάλμα στην ανάλυση δειγμάτων τεχνητού και βιολογικού ιδρώτα ήταν <4.2% και <21%, αντίστοιγα. Η προτεινόμενη κατασκευή είναι απλή και ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο ηλεκτρόδιο εργασίας ή την κατάλληλη τροποποίηση της επιφάνειας του, μπορεί να βρει ευρεία εφαρμογή για τον προσδιορισμό βιοδεικτών και τη διάγνωση ασθενειών σε βιολογικά υγρά με περιορισμένη διαθεσιμότητα (ιδρώτας, δάκρυα), σε εφαρμογές στο σημείο περίθαλψης ή να ενσωματωθεί σε φορητές αναλυτικές συσκευές.

Abstract

In this work, the construction of a low cost two-electrode electrochemical cell integrating a 1.4 µL volume dosing well, is described. The cell was assembled by placing face-to-face two screenprinted electrodes, one of them is hole-patterned (\emptyset 1.6 mm), which are separated by a 200 μ m thick, hole-patterned (\emptyset 3.0 mm) double-sided adhesive tape. Using screen-printed silver (Ag-SPE) and/or electroplated Ag/AgCl-SPE as working (WE) and/or counter (CE) electrodes, the electrochemical response of the respective 2-electrode cells for the determination of chloride ions over the concentration range from 20 to 100 mM, useful for cystic fibrosis diagnosis, was investigated. Ag/AgCl-SPE(WE)/Ag-SPE(CE) cell gave reliable measurements, and it was used for sweat analysis. The repeatability between successive measurements was $2.47 \text{ } \kappa \alpha 10.94\%$ (60 κ αι 80 mM Cl⁻, n=3, respectively), the inter-electrode reproducibility was 14.69% κ αι 6.31% (60) $\kappa \alpha l$ 80 mM Cl⁻, n=3, respectively), while the percentage of the relative error in the analysis of artificial and human sweat was <4.2% kal <21%, respectively. The construction of the designed miniature electrochemical device is simple and depending on the electrode material or the modification of its surface can offer a wide scope of applicability for the determination of biomarkers and diagnostic purposes in biological fluids that are available in microliter volumes (sweat, tears), for point-of-care applications, and as embedded component in wearable analytical devices.

Παρουσίαση σε διεθνή συνέδρια

<u>Stamatis Argyroudis, Mamas I. Prodromidis,</u> A two silver electrode-based microliter volume integrated screen-printed cell for cystic fibrosis, 18th ESEAC, 5-8 Ιουνίου 2022, Βίλνιους, Λιθουανία, Προφορική Ανακοίνωση.