



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΟΝΥΧΩΝ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ RAMAN ΚΑΙ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑΣ ΟΠΤΙΚΗΣ
ΣΥΝΟΧΗΣ**

ΧΡΥΣΟΥΛΑ ΠΕΤΡΟΚΙΛΙΔΟΥ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΟΝΥΧΩΝ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ RAMAN ΚΑΙ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑΣ ΟΠΤΙΚΗΣ
ΣΥΝΟΧΗΣ**

ΧΡΥΣΟΥΛΑ ΠΕΤΡΟΚΙΛΙΔΟΥ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025**

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης της κ. Πετροκιλίδου Χρυσούλας: 22-03-2019

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 901α/17-07-2019

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Κουρκουμέλης Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Μπασούκας Ιωάννης, Καθηγητής Δερματολογίας με έμφαση στην Ογκολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος,

Βελεγράκη Αριστεά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μυκητολογίας του Τμήματος Ιατρικής του ΕΚΠΑ, μέλος

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 19-09-2019

«Μελέτη αλλοιώσεων των ονύχων με μεθόδους φασματοσκοπίας Raman και τομογραφίας οπτικής συνοχής»

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 1043^α/14-02-2023

Επιβλέπων:

Κουρκουμέλης Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Μπασούκας Ιωάννης, τ. Καθηγητής Δερματολογίας με έμφαση στην Ογκολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γαϊτάνης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Δερματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1133α/28-01-2025

1. Κουρκουμέλης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής-Βιοφυσικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μπασούκας Ιωάννης, Ομότιμος Καθηγητής Δερματολογίας με έμφαση στην Ογκολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Γαϊτάνης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Δερματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Εμφιετζόγλου Δημήτριος, Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής-Ακτινοφυσικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Χατζηκακού Σωτήριος, Καθηγητής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Κυριακού Ιωάννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής με έμφαση στη Μικροδοσιμετρία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Μποζίδης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 02-07-2025

Ιωάννινα 19-11-2025

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Αναπληρώτρια Γραμματέας του Τμήματος

Ιωάννα Ντούβλη

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ιατρικής Φυσικής-Βιοφυσικής κ. Κουρκουμέλη Νικόλαου. Η ολοκλήρωση της διατριβής δε θα ήταν εφικτή εάν σε αυτή την προσπάθεια δεν υπήρχε η συνεισφορά ορισμένων ανθρώπων στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες μου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κουρκουμέλη για την συνεχή καθοδήγηση και την ουσιαστική υποστήριξη του κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής: τον Ομότιμο Καθηγητή Δερματολογίας κ. Μπασούκα Ιωάννη και τον Καθηγητή Δερματολογίας κ. Γαϊτάνη Γεώργιο που με τίμησαν με τη συμμετοχή και την υποστήριξη τους. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: τον Καθηγητή Ιατρικής Φυσικής-Ακτινοφυσικής κ. Εμφιετζόγλου Δημήτριο, τον Καθηγητή Χημείας κ. Χατζηκακού Σωτήριο, την Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής κα. Κυριακού Ιωάννα, και τον Επίκουρο Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Μποζίδη Πέτρο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Καθηγητή Ενδοκρινολογίας κ. Τίγκα Στυλιανό και την δερματολόγο κα. Ζαμπέτα Αθανασία για τη συλλογή δειγμάτων ονύχων. Επιπλέον, ευχαριστώ την Ομότιμη Καθηγήτρια Γενικής Μικροβιολογίας κα. Βελεγράκη Αριστέα και τους συνεργάτες της, για τον χαρακτηρισμό τους.

Θερμά ευχαριστώ στον Δρ. Παύλου Ελευθέριο για την συνεργασία και την ουσιαστική βοήθειά του σε θέματα προγραμματισμού και επεξεργασίας δεδομένων. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για το φιλικό και υποστηρικτικό κλίμα που δημιουργούσαν μαζί με την υποψήφια διδάκτορα Κοτρούμπελου Χριστίνα. Σημαντικό είναι να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου που συνυπήρξαμε ή συνεργαστήκαμε.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Σταύρος Νιάρχος για τη δωρεά του φορητού συστήματος NITID (Dermalumics, Ισπανία) που χρησιμοποιήθηκε στις πειραματικές μετρήσεις των δειγμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την στήριξη που μου παρείχε καθ'όλη την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Χρυσούλα Πετροκιλίδου

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος	9
1 Εισαγωγή	13
1.1 Όνυχες	13
1.1.1 Ανατομία	14
1.1.2 Αιμάτωση	15
1.1.3 Φυσιολογία και ανάπτυξη	17
1.1.4 Ονυχαία πλάκα: Μικροδομή, σύσταση και μηχανικές ιδιότητες	17
1.1.5 Ονυχαία πλάκα: Μοριακή σύσταση-Κερατίνη	19
α-κερατίνη.....	19
β-κερατίνη.....	23
1.2 Ονυχομυκητίαση	25
1.2.1 Αίτια και παθογόνοι μικροοργανισμοί	25
1.2.2 Μηχανισμός δράσης	25
1.2.3 Τύποι.....	27
1.2.4 Συμπτώματα και κλινική εικόνα	28
1.2.5 Διάγνωση	28
Δερμοσκόπηση.....	29
Άμεση μικροσκόπηση	29
Καλλιέργεια μυκήτων	30
1.2.6 Παθοφυσιολογία των ονύχων στον σακχαρώδη διαβήτη	32
Τύποι του σακχαρώδη διαβήτη	34
1.3 Φασματοσκοπία Raman.....	36
1.3.1 Βασικές αρχές	36
1.3.2 Φθορισμός	38
1.3.3 Περιγραφή του φαινομένου	39
Κλασική περιγραφή	39
Κβαντική περιγραφή	42
1.3.4 Φάσμα.....	46
Μετατόπιση	46
Ενεργοί τρόποι δόνησης	46

1.3.5	Πλεονεκτήματα και περιορισμοί	48
1.3.6	Πειραματική διάταξη	49
1.3.7	Όνυχες.....	50
	Φασματοσκοπικοί δείκτες	52
	Δισουλφιδικοί δεσμοί	52
	Πεπτιδικοί δεσμοί	53
1.4	Τομογραφία οπτικής συνοχής.....	56
1.4.1	Βασικές αρχές	56
1.4.2	Πειραματική διάταξη	57
1.4.3	Περιγραφή του φαινομένου	59
1.4.4	Οπτικές ιδιότητες	61
	Συντελεστής απορρόφησης.....	62
	Συντελεστής σκέδασης	64
1.4.5	Σχηματισμός εικόνας–Απεικόνιση OCT	65
1.4.6	Πλεονεκτήματα και περιορισμοί	67
1.4.7	Όνυχες.....	67
1.5	Σκοπός	70
2	Ειδικό μέρος: Υλικά και μέθοδοι	71
2.1	Συλλογή και ταξινόμηση δειγμάτων	71
2.2	Πειραματικές μετρήσεις.....	73
2.3	Εμβάπτιση στην αιθυλική αλκοόλη	75
2.4	Γλυκοζυλίωση ονύχων	76
2.5	Πειραματική διάταξη	78
2.5.1	Φασματοσκοπία Raman	78
2.5.2	Τομογραφία οπτικής συνοχής	79
2.6	Επεξεργασία και ανάλυση πειραματικών μετρήσεων.....	82
2.6.1	Φασματοσκοπία Raman	82
	Επεξεργασία.....	82
	Ανάλυση.....	84
2.6.2	Τομογραφία οπτικής συνοχής	86
	Προσδιορισμός επιφανειακής τραχύτητας	87
	Υπολογισμός μ_{OCT}	91

2.6.3	Στατιστική ανάλυση	93
3	Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	94
3.1	Όνυχες με λοίμωξη από <i>Trichophyton rubrum</i>	94
3.1.1	Διάκριση μεταξύ των υγιών και μυκητιασικών ονύχων	99
3.2	Παθολογία ονύχων σε διαβητικούς ασθενείς	106
3.2.1	Επίδραση της εμφάνισης σε αιθυλική αλκοόλη	109
3.2.2	Διάκριση μεταξύ των υγιών και διαβητικών ονύχων	111
3.2.3	Ανάλυση κορυφών	114
3.2.4	Προγνωστικό μοντέλο διάγνωσης του σακχαρώδη διαβήτη	117
3.3	Διάκριση της ονυχομυκητιάσης στον γενικό πληθυσμό.....	123
3.4	Τομογραφία οπτικής συνοχής (OCT).....	129
3.4.1	Προσδιορισμός επιφανειακής τραχύτητας	135
3.4.2	Υπολογισμός μ_{OCT}	140
3.5	Γλυκοζυλίωση ονύχων	142
4	Συμπεράσματα	146
5	Περίληψη.....	147
6	Abstract.....	149
7	Βιβλιογραφικές αναφορές	150
8	Παράρτημα	162
8.1	Κώδικας προσδιορισμού επιφανειακής τραχύτητας.....	162
8.2	Κατάλογος διεθνών συντομογραφιών.....	165
8.3	Κατάλογος ελληνικών συντομογραφιών	166
8.4	Κατάλογος επιστημονικών δημοσιεύσεων που προέκυψαν στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής.....	167
8.5	Κατάλογος εικόνων	168
8.6	Κατάλογος διαγραμμάτων	174
8.7	Κατάλογος γραφημάτων	175
8.8	Κατάλογος πινάκων.....	176

1 Εισαγωγή

1.1 Όνυχες

Οι όνυχες, κοινώς νύχια, είναι σκληρές, κερατινοποιημένες δομές στα άκρα των δακτύλων, με κύριες λειτουργίες την προστασία των φαλάγγων, τη βελτίωση της αφής και τη διευκόλυνση λεπτών κινήσεων. Αν και συχνά θεωρούνται δευτερεύουσες δομές, έχουν ιδιαίτερο βιολογικό και διαγνωστικό ενδιαφέρον, καθώς αντανακλούν μεταβολές στην υγεία του οργανισμού και την έκθεση σε εξωτερικούς παράγοντες.

Η μορφολογία και σύστασή τους επηρεάζονται τόσο από ενδογενείς παράγοντες (αιμάτωση, ορμονικά επίπεδα, γενετική προδιάθεση), όσο και από εξωγενείς (σακχαρώδης διαβήτης, φαρμακευτική αγωγή).^(1–4) Επιπλέον, λόγω της αργής τους ανάπτυξης (περίπου 1-3 mm/μήνα)⁽⁵⁾, οι όνυχες λειτουργούν ως «βιολογικό αρχείο», αποθηκεύοντας πληροφορίες για φάρμακα και τοξίνες.⁽⁶⁾ Εξαιτίας αυτών των χαρακτηριστικών, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον ως δείκτες.

Παράλληλα, οι όνυχες είναι συχνός στόχος λοιμώξεων από παθογόνους μικροοργανισμούς, με κυριότερη την ονυχομυκητίαση.⁽⁷⁾ Πρόκειται για μια χρόνια και συχνά υποδιαγνωσμένη λοίμωξη, η οποία όχι μόνο αλλοιώνει τη δομή των ονύχων αλλά ενδέχεται να συνδέεται με υποκείμενα συστηματικά νοσήματα, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης.⁽⁸⁾ Στους διαβητικούς ασθενείς, οι μυκητιασικές λοιμώξεις των ονύχων είναι συχνότερες και δυνητικά σοβαρότερες, καθιστώντας την πρώιμη διάγνωση και παρακολούθησή τους ιδιαίτερα σημαντική.

Για να κατανοηθεί ο ρόλος των ονύχων τόσο ως στόχος παθολογικών καταστάσεων όσο και ως πιθανός βιοδείκτης, είναι απαραίτητο να προηγηθεί η μελέτη της φυσιολογικής τους δομής και λειτουργίας. Στα επόμενα κεφάλαια, παρουσιάζεται η ανατομία, η αιμάτωση και η φυσιολογία ανάπτυξης των ονύχων, τα οποία αποτελούν την βάση για την κατανόηση των παθολογικών μεταβολών που παρατηρούνται στην ονυχομυκητίαση και τον διαβήτη.

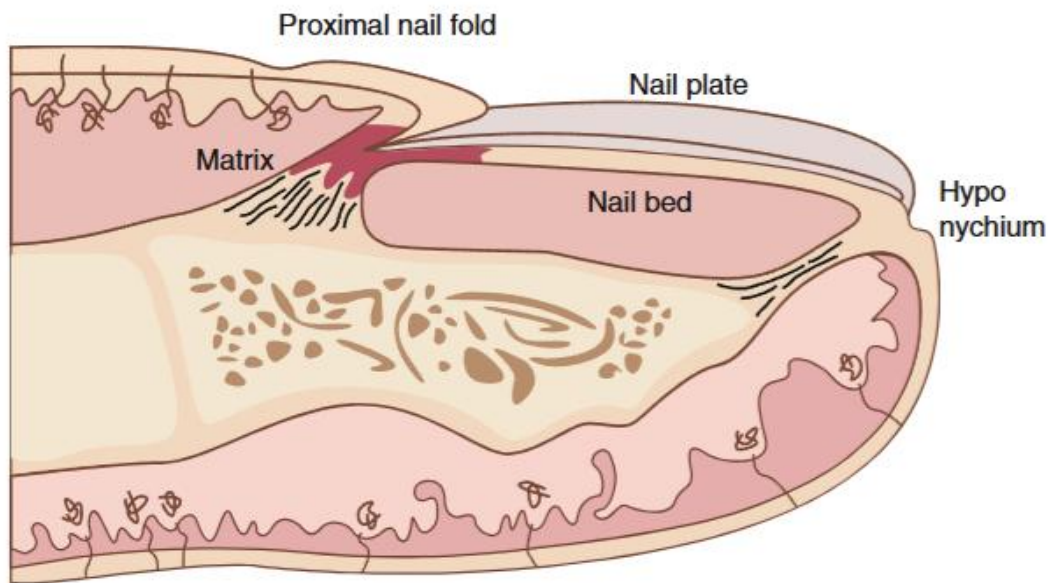
1.1.1 Ανατομία

Η ονυχαία πλάκα (nail plate) αποτελεί το κεντρικό και κύριο στοιχείο των ονύχων. Πρόκειται για σκληρή κερατινοποιημένη δομή, η οποία αναπτύσσεται συνεχώς σε όλη την διάρκεια της ζωής. Λόγω της εύκολης προσβασιμότητάς της και της σταθερής της σύστασης, η ονυχαία πλάκα είναι το κύριο αντικείμενο αναφοράς και μελέτης στις περισσότερες αναλύσεις που αφορούν τους όνυχες, είτε πρόκειται για διαγνωστικούς, είτε για ερευνητικούς σκοπούς.

Στη βάση των ονύχων, η εγγύς ονυχαία πτυχή (proximal nail fold) σχηματίζει το ορατό όριο μεταξύ ονύχων και δέρματος. Από αυτήν εκτείνεται το επωνύχιο (cuticle/eponychium), μια λεπτή στιβάδα επιδερμίδας που προσφύεται στην ραχιαία επιφάνεια της ονυχαίας πλάκας και προστατεύει την μήτρα των ονύχων (nail matrix) από μικρόβια. Τα πλευρικά όρια των ονύχων σχηματίζονται από τις πλάγιες ονυχαίες πτυχές (lateral nail folds).

Κάτω από την εγγύς ονυχαία πτυχή βρίσκεται η μήτρα των ονύχων (nail matrix), η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή της ονυχαίας πλάκας και διακρίνεται σε τρία μέρη: την ραχιαία μήτρα (dorsal matrix), που συνεχίζει την εσωτερική επιφάνεια της εγγύς πτυχής, την ενδιάμεση μήτρα (intermediate/germinative matrix), που βρίσκεται βαθύτερα και σχηματίζει τον κύριο όγκο των ονύχων και την κοιλιακή μήτρα (ventral matrix), γνωστή και ως κοίτη των ονύχων (nail bed). Το σημείο όπου η ενδιάμεση μήτρα μετατρέπεται σε κοίτη είναι ορατό ως μηνίσκος (lunula), η ανοιχτόχρωμη, ημισελήνοειδής ζώνη που φαίνεται πιο συχνά στους αντίχειρες.

Η κοίτη των ονύχων εκτείνεται από τον μηνίσκο μέχρι το υπονύχιο (hyponychium) και αποτελεί την αγγειοβριθή βάση πάνω στην οποία βρίσκεται η ονυχαία πλάκα. Στο όριο με την ελεύθερη άκρη των ονύχων παρατηρείται η ονυχοδερματική ζώνη (onychodermal band), μια στενή λωρίδα με ελαφρώς διαφορετικό χρώμα, ορατή σε ορισμένους τύπους δέρματος. Το υπονύχιο είναι η περιοχή κάτω από την ελεύθερη άκρη των ονύχων και δρα ως προστατευτικός φραγμός από εξωτερικούς παράγοντες. Τέλος, η δομή ολοκληρώνεται με την άπω αύλακα (distal groove), μια πτυχή του δέρματος που διαχωρίζει τις υπονυχαίες δομές από τον πολφό του δακτύλου.(9)



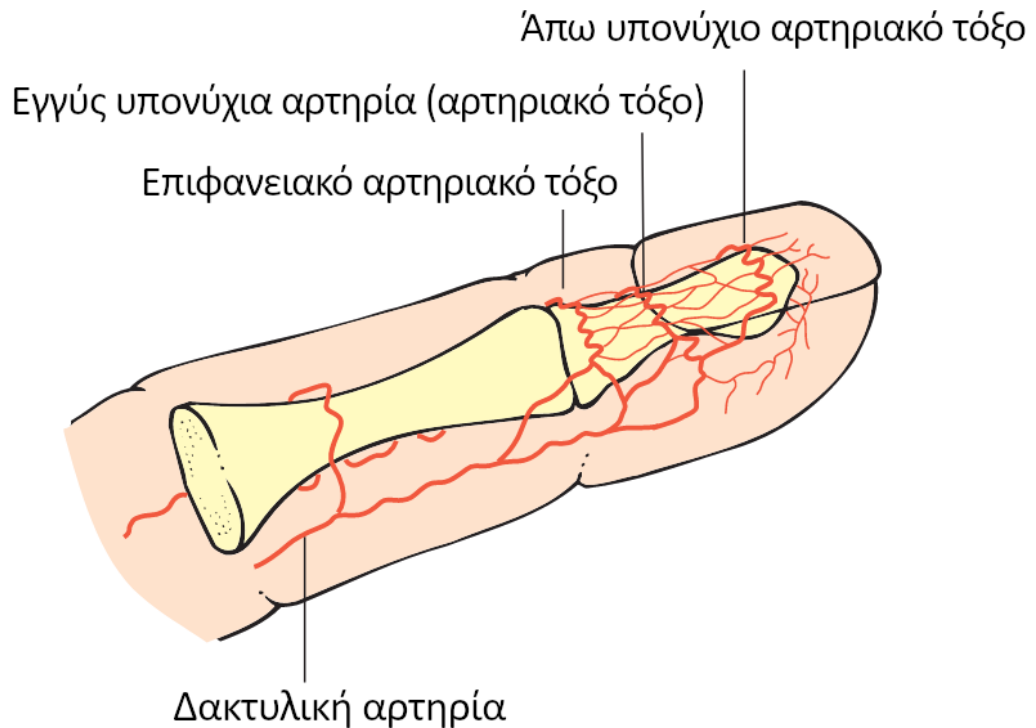
Εικόνα 1: Ανατομική απεικόνιση εγκάρσιας τομής όνυχας.(10)

1.1.2 Αιμάτωση

Η αιμάτωση των ονύχων εξασφαλίζεται μέσω ενός πλούσιου αγγειακού δικτύου, που προέρχεται κυρίως από κλάδους της κερκιδικής (radial artery) και της ωλένιας αρτηρίας (ulnar artery).(11) Οι αρτηρίες σχηματίζουν βαθιά και επιφανειακά παλαμιαία τόξα (palmar arcades), από τα οποία εκφύονται δακτυλικές αρτηρίες (digital arteries) που κατανέμονται στις πλάγιες επιφάνειες των δακτύλων. Η κύρια αιμάτωση των ονύχων παρέχεται από τις παλαμιαίες δακτυλικές αρτηρίες (palmar digital arteries), που σχηματίζουν αναστομώσεις γύρω από την άπω φάλαγγα.(12)

Η υπονύχια περιοχή αιματώνεται μέσω των άπω και εγγύς υπονύχιων αρτηριακών τόξων (arcades), οι οποίες προκύπτουν από την αναστόμωση του παλαμιαίου αρτηριακού τόξου με το ραχιαίο αρτηριακό τόξο της ονυχαίας πτυχής. Το αγγειακό δίκτυο της μήτρας των ονύχων παρουσιάζει χαρακτηριστική ελικοειδή μορφή, γεγονός που λειτουργεί προστατευτικά έναντι της απόφραξης κατά την κάμψη και έκταση των δακτύλων.(12,13)

Η φλεβική παροχέτευση της περιοχής πραγματοποιείται μέσω δικτύου φλεβών, με τις παλαμιαίες δακτυλικές φλέβες (palmar digital veins) να παίζουν κυρίαρχο ρόλο, ιδιαίτερα σε μικροχειρουργικές τεχνικές επανααιμάτωσης.(14) Παρά την ισχυρή αιμάτωση μέσω των αρτηριών, η μήτρα των ονύχων παρουσιάζει χαμηλή αντοχή σε τραυματισμούς, με αποτέλεσμα ακόμη και μικρές βλάβες να προκαλούν μόνιμες δυστροφίες.(15,16)



Εικόνα 2: Απεικόνιση της αρτηριακής αιμάτωσης του άκρου ενός δακτύλου.(9)

Η διαταραχή της αιμάτωσης μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις όπως ονυχόλυση (onycholysis), γραμμώσεις του Beau (Beau's lines), λέπτυνση και αποχρωματισμό των ονύχων, ειδικά σε περιπτώσεις αγγειακής νόσου.(17,18) Επιπλέον, η ισχαιμία κατά την εμβρυϊκή ζωή έχει ενοχοποιηθεί για τη δημιουργία συγγενών δυσπλασιών των ονύχων (congenital onychodysplasias).(19) Παρόμοια, η ακινητοποίηση των δαχτύλων έχει συσχετιστεί με μείωση της ροής του αίματος και ελάττωση της ταχύτητας ανάπτυξης των ονύχων,(20) ενώ η υπεραιμία μέσω αρτηριοφλεβικών αναστομώνσεων μπορεί να επιταχύνει την ανάπτυξή τους.(21) Τέλος, η ονυχοκαμπυλότητα (clubbing) έχει συσχετιστεί με αυξημένη ροή του αίματος και αγγειοδιαστολή, χωρίς υπερπλασία των αγγείων.(22)

1.1.3 Φυσιολογία και ανάπτυξη

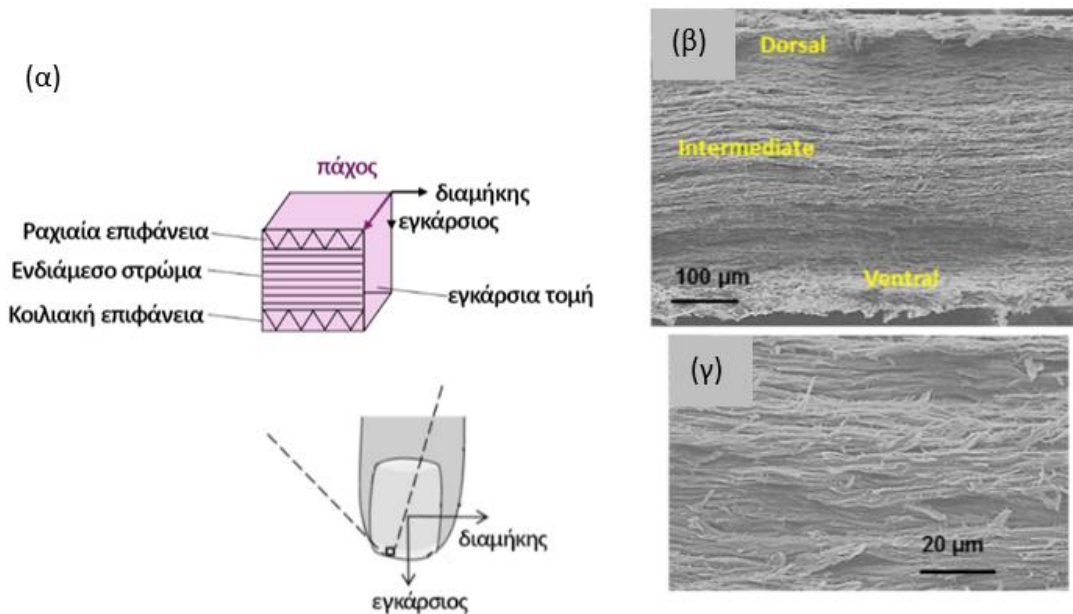
Η επαρκής αγγείωση των ονύχων, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, αποτελεί βασική προϋπόθεση για την φυσιολογική ανάπτυξη των ονύχων. Η διαδικασία της ανάπτυξης τους εξαρτάται επίσης από μια σειρά βιολογικών μηχανισμών, που περιλαμβάνουν την κυτταρική δραστηριότητα της μήτρας, την διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων και την παραγωγή της κερατίνης. Η κατανόηση της φυσιολογίας των ονύχων είναι θεμελιώδης για την ερμηνεία των παθολογικών αλλαγών που παρατηρούνται σε καταστάσεις όπως η ονυχομυκητίαση, ιδιαίτερα σε ευάλωτους πληθυσμούς όπως οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη.(23,24)

Η παραγωγή της κερατίνης και η διαμόρφωση των ονύχων προέρχονται κυρίως από τη μήτρα, που περιέχει διαιρούμενα κερατινοκύτταρα. Τα κύτταρα υφίστανται μίτωση, πολλαπλασιάζονται και καθώς μεταφέρονται προς τα ανώτερα στρώματα, διαφοροποιούνται και κερατινοποιούνται. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στον σχηματισμό της σκληρής κερατίνης που αποτελεί την ονυχαία πλάκα. Η κερατίνη των ονύχων είναι διαφορετική από την κερατίνη της επιδερμίδας, καθώς είναι πιο σκληρή και ανθεκτική, χαρακτηριστικό που οφείλεται στο είδος της κερατινοποίησης που λαμβάνει χώρα στη μήτρα.(9)

Η ονυχαία πλάκα στους όνυχες των χεριών αναπτύσσεται περίπου 3mm/μήνα, ενώ στους όνυχες των ποδιών κατά 1mm/μήνα.(23) Ο ρυθμός ανάπτυξης μπορεί να μειωθεί σε περιπτώσεις αγγειακής δυσλειτουργίας, μεταβολικές παθήσεις όπως ο διαβήτης, και στους ηλικιωμένους.(2,3,25) Το πάχος της ονυχαίας πλάκας είναι περίπου 0.5mm στις γυναίκες και 0.6mm στους άνδρες, ενώ αυξάνεται με το πέρασμα του χρόνου λόγω της αύξησης των κυττάρων και της μείωσης του ποσοστού θανάτωσης τους.(26)

1.1.4 Ονυχαία πλάκα: Μικροδομή, σύσταση και μηχανικές ιδιότητες

Η ονυχαία πλάκα αποτελείται από τρία ιστολογικά στρώματα: το ραχιαίο (dorsal), το ενδιάμεσο (intermediate) και το κοιλιακό (ventral).(27–29) Τα στρώματα αναφέρονται με την σειρά που συναντώνται σε μία εγκάρσια τομή μίας ονυχαίας πλάκας: το ραχιαίο είναι το ανώτερο στρώμα που εκτίθεται στις περιβαλλοντικές συνθήκες, το ενδιάμεσο είναι το δεύτερο που συναντάται, ενώ το κοιλιακό είναι το κατώτατο και έρχεται σε επαφή με την κοίτη των ονύχων. (Εικόνα 3) Η αναλογία πάχους των τριών στρωμάτων είναι 3:5:2, αντίστοιχα.(30)



Εικόνα 3: (α) Σχηματική απεικόνιση μίας ονυχαίας πλάκας ενός υγιούς όνυχα ανθρώπου και της τριστρωματικής της δομής. (β), (γ) Εικόνες SEM εγκάρσιας διατομής της ονυχαίας πλάκας: Στην πρώτη εικόνα απεικονίζονται και επισημαίνονται τα τρία στρώματα της (dorsal: ραχιαίο, intermediate: ενδιάμεσο, ventral: κοιλιακό), ενώ στην δεύτερη φωτογραφία φαίνονται καθαρά οι διαμήκεις προσανατολισμένες ίνες κερατίνης.(31)

Σε μικροσκοπικό επίπεδο η ονυχαία πλάκα αποτελείται κυρίως από ινίδια κερατίνης (80-90%) τα οποία οργανώνονται σε λεπτές, στρωματώδεις δομές.(31,32) Σε κάθε στρώμα ο προσανατολισμός των δομών είναι διαφορετικός με αποτέλεσμα την μηχανική συνοχή και αντοχή των ονύχων. Η ραχιαία και η κοιλιακή επιφάνεια έχουν παρόμοια δομή, καθώς οι δομές είναι οριζόντιες και παράλληλες προς την επιφάνεια. Οι δομές συνδέονται με χαρακτηριστικές συνδέσεις και διασταυρώσεις, οι οποίες ενισχύουν την σκληρότητα και αντοχή των ονύχων. Οι δομές της ραχιαίας επιφάνειας έχουν πλάτος 2-4 μm . Σε αντίθεση με το ανώτερο και κατώτερο στρώμα, στο ενδιάμεσο στρώμα, οι ίνες είναι διατεταγμένες παράλληλα προς το ελεύθερο άκρο των ονύχων.(33,34) Η διάταξη των δομών εξηγεί την τάση των ονύχων να σπάνε παράλληλα με την άκρη, χωρίς κάθετη διάδοση των ρωγμών. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται από την μέτρηση του ενεργειακού κόστους κοπής κατά μήκος των ονύχων, το οποίο υπολογίζεται περίπου 6 kJ/m^2 . Η τιμή αυτή είναι σχεδόν διπλάσια από την αντίστοιχη κοπή στο εγκάρσιο επίπεδο.(35)

Εκτός από την κερατίνη, η ονυχαία πλάκα περιέχει επίσης νερό, λιπίδια και ιχνοστοιχεία/μέταλλα. Η ποσότητα νερού που ανιχνεύεται κυμαίνεται σε 7-12%, τα λιπίδια αποτελούν 0.1-1% των συστατικών της ονυχαίας πλάκας και εντοπίζονται κυρίως στην ραχιαία και κοιλιακή επιφάνεια των ονύχων.(9) Η ποσότητα τους εξαρτάται από το φύλο και μειώνεται στους ηλικιωμένους.(31) Τα ιχνοστοιχεία και μέταλλα βρίσκονται στην μικρότερη συγκέντρωση, <1%, και είναι κυρίως: Ασβέστιο (Ca), Μαγνήσιο (Mg), Σίδηρος

(Fe), Χαλκός (Cu), Ψευδάργυρος (Zn).(36) Η ποσότητα τους εξαρτάται επίσης, από το φύλο και την ηλικία αλλά και από την διατροφή (ανεπάρκεια σε σίδηρο ή ψευδάργυρο), κατάστασης υγείας (ασθενείς με αναιμία ή μεταβολικές ασθένειες όπως ο διαβήτης), έκθεση σε καλλυντικά ή περιβαλλοντικούς ρύπους (έκθεση σε μόλυβδο, κάδμιο ή αρσενικό).(36,37) Η παρουσία και η αναλογία των συστατικών της ονυχιάς πλάκας συμβάλουν στην ευκαμψία και ελαστικότητα της.(37)

1.1.5 Ονυχία πλάκα: Μοριακή σύσταση-Κερατίνη

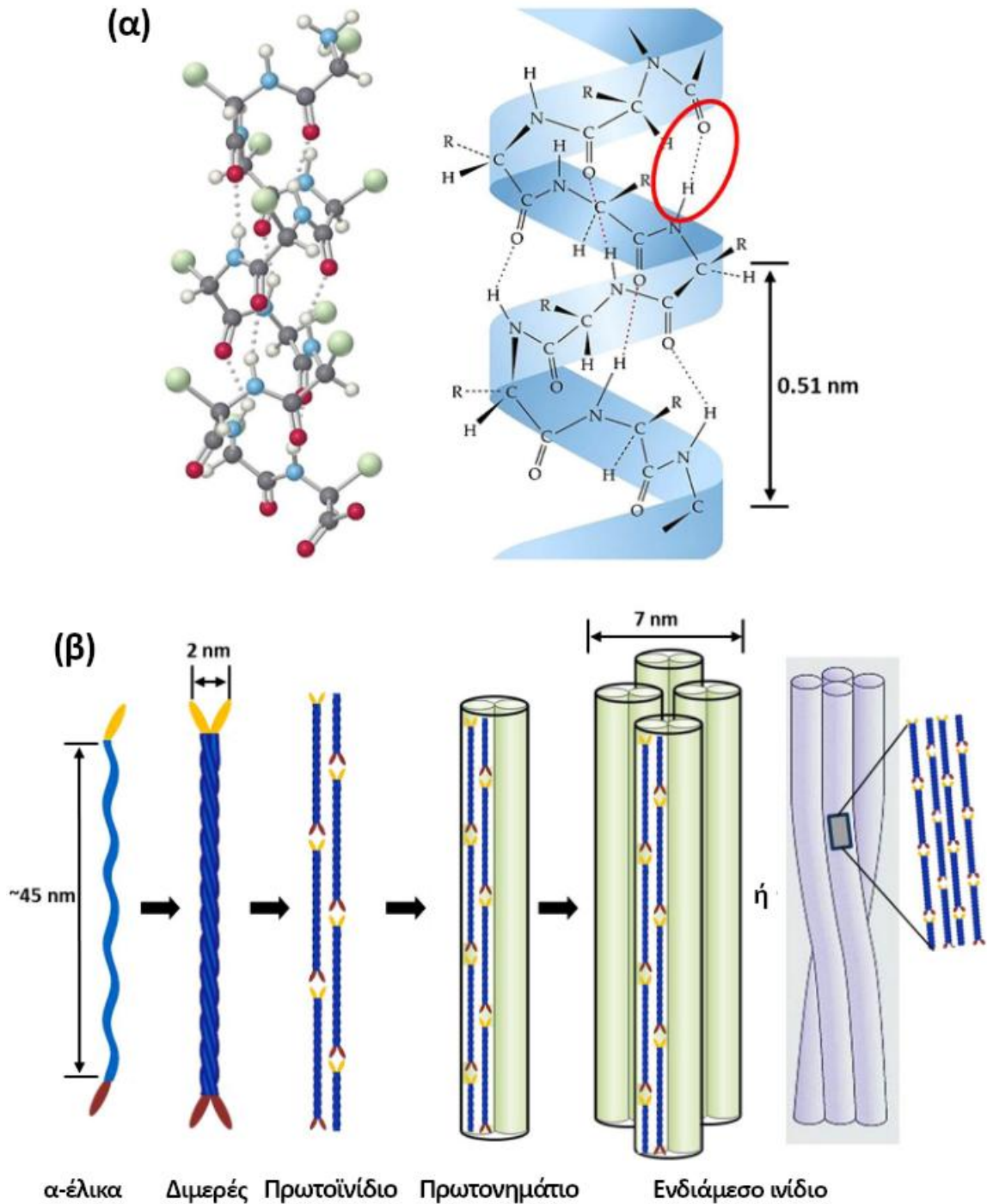
Η κερατίνη είναι μία πρωτεΐνη και αποτελεί το κύριο δομικό συστατικό της ονυχιάς πλάκας, των μαλλιών και της επιδερμίδας. Η κερατίνη συναντάται σε δύο βασικούς τύπους: *α-κερατίνη* και *β-κερατίνη*. Η *α-κερατίνη* ανιχνεύεται κυρίως στα θηλαστικά, ενώ η *β-κερατίνη* εντοπίζεται κυρίως στα φτερά, στα λέπια, στα ράμφη και στους όνυχες των πτηνών και των ερπετών.

α-κερατίνη

Η *α-κερατίνη* αποτελεί τη βασική δομική πρωτεΐνη των ανθρώπινων ονύχων. Ανήκει στην οικογένεια των ενδιάμεσων ινιδίων (intermediate filaments-IFs) και σχηματίζεται από δύο κύριους τύπους πολυπεπτιδικών αλυσίδων: τύπου I (όξινες) και τύπου II (βασικές/ουδέτερες) κερατίνες, που ενώνονται μεταξύ τους σε ετεροδιμερή coiled-coils (συσπειρωμένες σπείρες 1:1), δηλαδή σε δομές που αποτελούνται από δύο δεξιόστροφες *α-έλικες* (*α-helices*) τυλιγμένες μεταξύ τους σε μία αριστερόστροφη έλικα.(38–40) Κάθε στροφή περιλαμβάνει περίπου 3.6 αμινοξέα και σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου.(31,41) Η κεντρική ελικοειδής περιοχή κάθε αλυσίδας έχει μήκος περίπου 46nm και συνοδεύεται από μη-ελικοειδή άκρα N- και C-, τα οποία προσδίδουν ευκαμψία και διευκολύνουν τον σχηματισμό των IFs και την διασύνδεση με την εξωκυτταρική μήτρα.(31,42,43) Επίσης, περιλαμβάνει τέσσερα ελικοειδή τμήματα (1A, 1B, 2A, 2B), τα οποία διαχωρίζονται από τρεις περιοχές σύνδεσης: L1, L12 και L2, οι οποίες επιτρέπουν στο μόριο να έχει μεγαλύτερη ευκαμψία και ικανότητα για πολυμερισμό. Στην ίδια περιοχή εντοπίζεται επίσης ένα χαρακτηριστικό stutter (μικρή διαταραχή στο επαναλαμβανόμενο μοτίβο των αμινοξέων), το οποίο προκαλεί παραμόρφωση στην έλικα και συμβάλει επίσης στην ευκαμψία της δομής και τη δυνατότητα σχηματισμού των ετεροδιμερών coiled-coils. Τα ετεροδιμερή σχηματίζουν τα πρωτοϊνίδια (protofilaments), τα οποία έχουν διάμετρο περίπου 2 nm. Τέσσερα πρωτοϊνίδια συνενώνονται πλευρικά σε πρωτονημάτια (protofibrils), και τέσσερα πρωτονημάτια τελικά σχηματίζουν το ενδιάμεσο

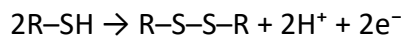
ινίδιο (IF), με συνολική διάμετρο περίπου 7–10 nm. Τα IFs οργανώνονται σε ελάσματα (lamellae) πάχους περίπου 2-4 μm, τα οποία σχηματίζουν τα τρία στρώματα της ονυχαίας πλάκας.(31) Συνοπτικά, η ιεραρχική οργάνωση περιλαμβάνει: α -έλικα $\rightarrow$ διμερές $\rightarrow$ πρωτοϊνίδιο $\rightarrow$ πρωτονημάτιο $\rightarrow$ ενδιάμεσο ινίδιο $\rightarrow$ έλασμα.

Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, της α -έλικας αλλά και του σχηματισμού ενός ενδιάμεσου ινιδίου α -κερατίνης. Η περιγραφή των βημάτων σχηματισμού των ινιδίων της κερατίνης αντικατοπτρίζει τα επίπεδα δευτεροταγούς, τριτοταγούς και κυρίως τεταρτοταγούς δομής της α -κερατίνης: η δευτεροταγής δομή αφορά τις α -έλικες, η τριτοταγής την πλήρη διαμόρφωση κάθε αλυσίδας με τα ευέλικτα άκρα της, ενώ η τεταρτοταγής δομή σχετίζεται με την ιεραρχική ένωση αλυσίδων και συμπλόκων σε πολυμερείς δομές που προσδίδουν στην κερατίνη τις μηχανικές της ιδιότητες.



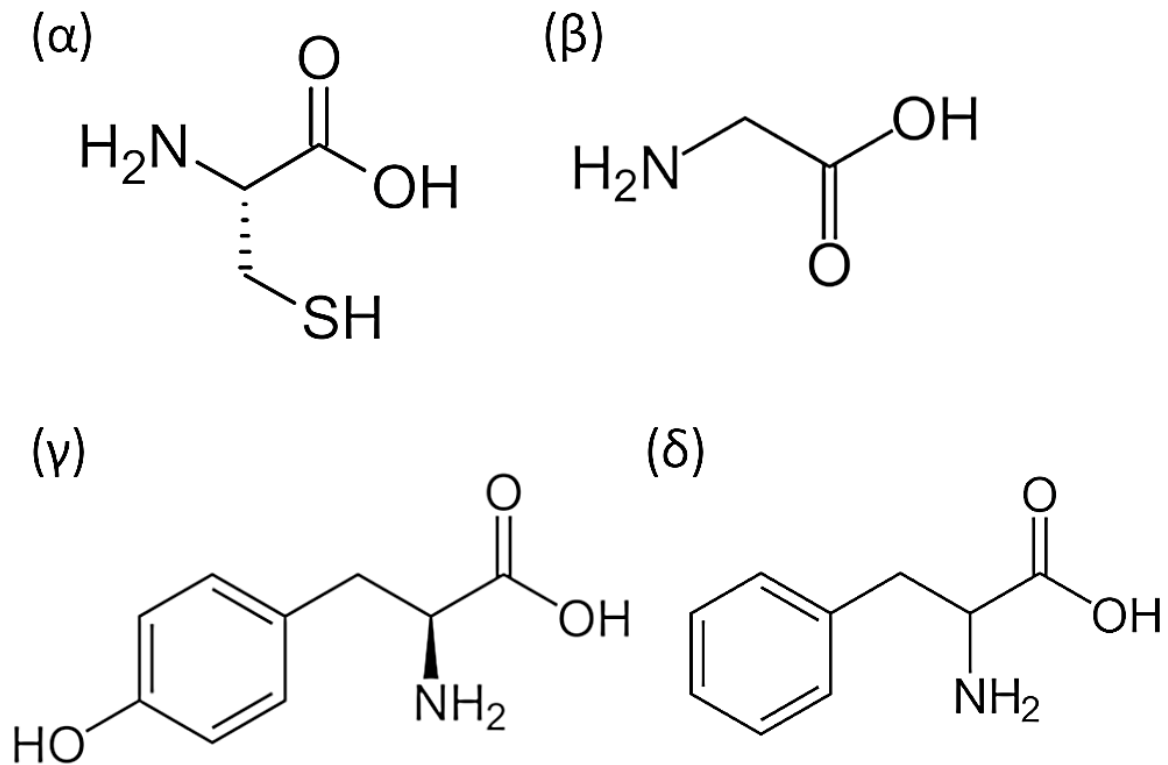
Εικόνα 4: Απεικόνιση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, της α -έλικας (α) και του σχηματισμού ενός ενδιάμεσου ινιδίου (β). Η πολυπεπτιδική αλυσίδα (αριστερά) παρουσιάζεται στην μορφή σφαιρών και ράβδων. Στην α -έλικα σημειώνεται το βήμα της που είναι 0.51nm και θέση των δεσμών υδρογόνου (κόκκινη έλλειψη). Οι αλυσίδες της α -έλικας οργανώνονται ώστε να σχηματιστούν τα διμερή, τα οποία στην συνέχεια σχηματίζουν το πρωτοϊνίδιο (protofilament). Τέσσερα πρωτοϊνίδια οργανώνονται και σχηματίζουν ένα ενδιάμεσο ινίδιο.(31)

Η α -κερατίνη περιέχει επίσης μια μη-ινώδη πρωτεϊνική μήτρα, η οποία είναι πλούσια σε κυστεΐνη (Cys), γλυκίνη (Gly), τυροσίνη (Tyr) και φαινυλαλανίνη (Phe), η οποία περιβάλλει τα IFs και συμβάλλει στην μηχανική συνοχή της δομής.(31,44) Από τα παραπάνω αμινοξέα, η κυστεΐνη, παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση, έως και 50% της συνολικής της σύστασης και διαδραματίζει τον σημαντικότερο ρόλο στην σταθερότητα του τρισδιάστατου πλέγματος της κερατίνης.(45) Αυτό οφείλεται στην ικανότητά της να σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς (S-S), οι οποίοι συμβάλλουν στην ενίσχυση της πρωτεϊνικής δομής. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί σχηματίζονται με την οξείδωση δύο θειολικών ομάδων (-SH) των κυστεϊνών, σύμφωνα με την χημική εξίσωση αντίδρασης:



όπου R αντιπροσωπεύει την πλευρική αλυσίδα της κυστεΐνης.(46) Οι δισουλφιδικοί δεσμοί σχηματίζονται είτε εντός της ίδιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας (intra-chain), είτε μεταξύ διαφορετικών αλυσίδων ή ινιδίων (inter-chain), ενισχύοντας έτσι την συνοχή της δομής σε διαφορετικά επίπεδα οργάνωσης. Στην α -κερατίνη των ονύχων, οι δεσμοί αυτοί εντοπίζονται κυρίως στην μη-ινώδη πρωτεϊνική μήτρα, λειτουργώντας ως μοριακές γέφυρες που ενισχύουν την συνδεσιμότητα και την σταθερότητα των ενδιάμεσων ινιδίων.(47,48)

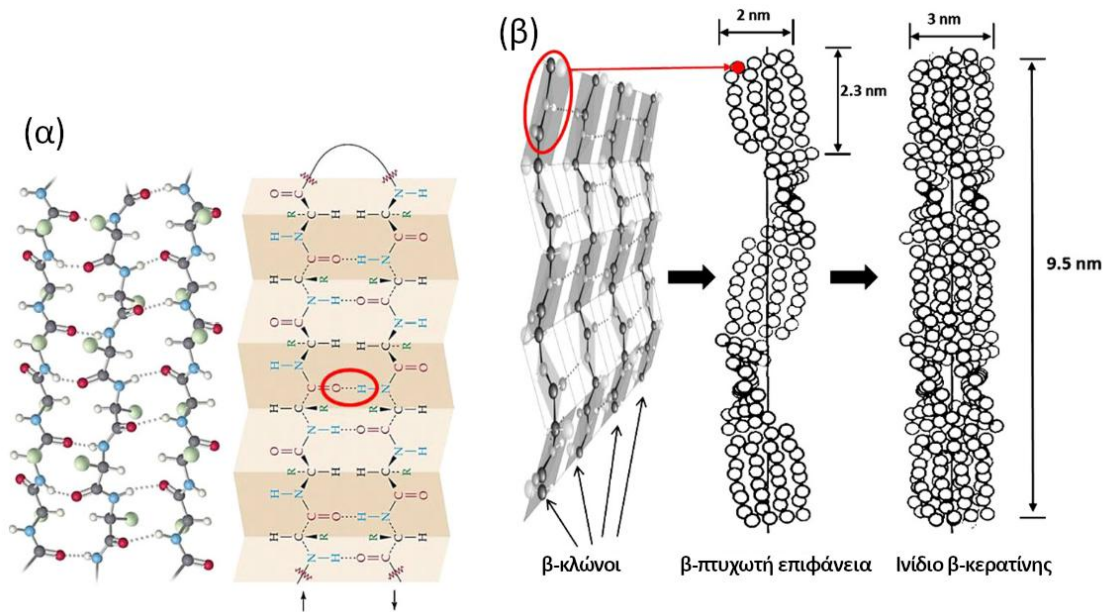
Η χημική δομή των αμινοξέων που ανιχνεύονται σε μεγάλη συγκέντρωση στην α -κερατίνη απεικονίζεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Τα αμινοξέα που βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην δομή της α -κερατίνης: (α) κυστεΐνη, (β) γλυκίνη, (γ) τυροσίνη και (δ) φαινυλαλανίνη.

β-κερατίνη

Η β -κερατίνη αποτελεί επίσης μια ινώδη πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από β -πτυχωτές επιφάνειες (β -sheets), οι οποίες είναι οργανωμένες παράλληλα ή αντιπαράλληλα σε μία διαστρωματωμένη διάταξη που περιβάλλεται από μία μη-ινώδη πρωτεϊνική μήτρα. Οι β -πτυχωτές επιφάνειες σχηματίζονται από αναδιπλωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες με κεντρική περιοχή 34 αμινοξέων.(31) Οι δομές σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ αντικριστών αλυσίδων. Οι δομές αυτές παρουσιάζουν υψηλή πυκνότητα και σκληρότητα, με μικρή ελαστικότητα, χαρακτηριστικά που τις καθιστούν ιδανικές για προστατευτικούς σχηματισμούς. Τα άκρα N - και C - των β -sheets ενώνονται μεταξύ τους άλλα και με την μήτρα, δημιουργώντας ένα σταθερό δίκτυο.(48–50)



Εικόνα 6: (α) Απεικόνιση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (σε μορφή σφαιρών και ράβδων) και της β-πτυχωτής επιφάνειας. (β) Απεικόνιση του σχηματισμού του ινιδίου της β-κερατίνης: μία πολυπεπτιδική αλυσίδα διπλώνεται ώστε να σχηματίσει τέσσερις β-κλώνους (*β-strands*), οι οποίοι περιστρέφονται, ώστε να σχηματίσουν την β-πτυχωτή επιφάνεια (*distorted β-sheet*). Δύο τέτοιες επιφάνειες οργανώνονται για να σχηματίσουν ένα ινίδιο β-κερατίνης (*β-keratin filament*).⁽³¹⁾

Η β-κερατίνη εμφανίζει υψηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκίνη και σερίνη, αλλά χαμηλότερη περιεκτικότητα σε κυστεΐνη σε σύγκριση με την α-κερατίνη.⁽³¹⁾ Αυτό το γεγονός συνεπάγεται λιγότερους δισουλφιδικούς δεσμούς (S–S), οι οποίοι παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ελαστικότητα και την σταθεροποίηση της δομής. Ως αποτέλεσμα, η β-κερατίνη εμφανίζει μεγαλύτερη σκληρότητα, αλλά μικρότερη ελαστικότητα και πιο περιορισμένη ικανότητα επαναδιάταξης.^(31,51)

Η β-κερατίνη αποτελεί βασικό δομικό συστατικό του εξωσκελετού πτηνών και ερπετών, ιδιαίτερα στα φτερά, ράμφη, λέπια και νύχια τους. Στους όνυχες των ανθρώπων, η β-κερατίνη είναι σχεδόν ανύπαρκτη.^(31,52)

1.2 Ονυχομυκητίαση

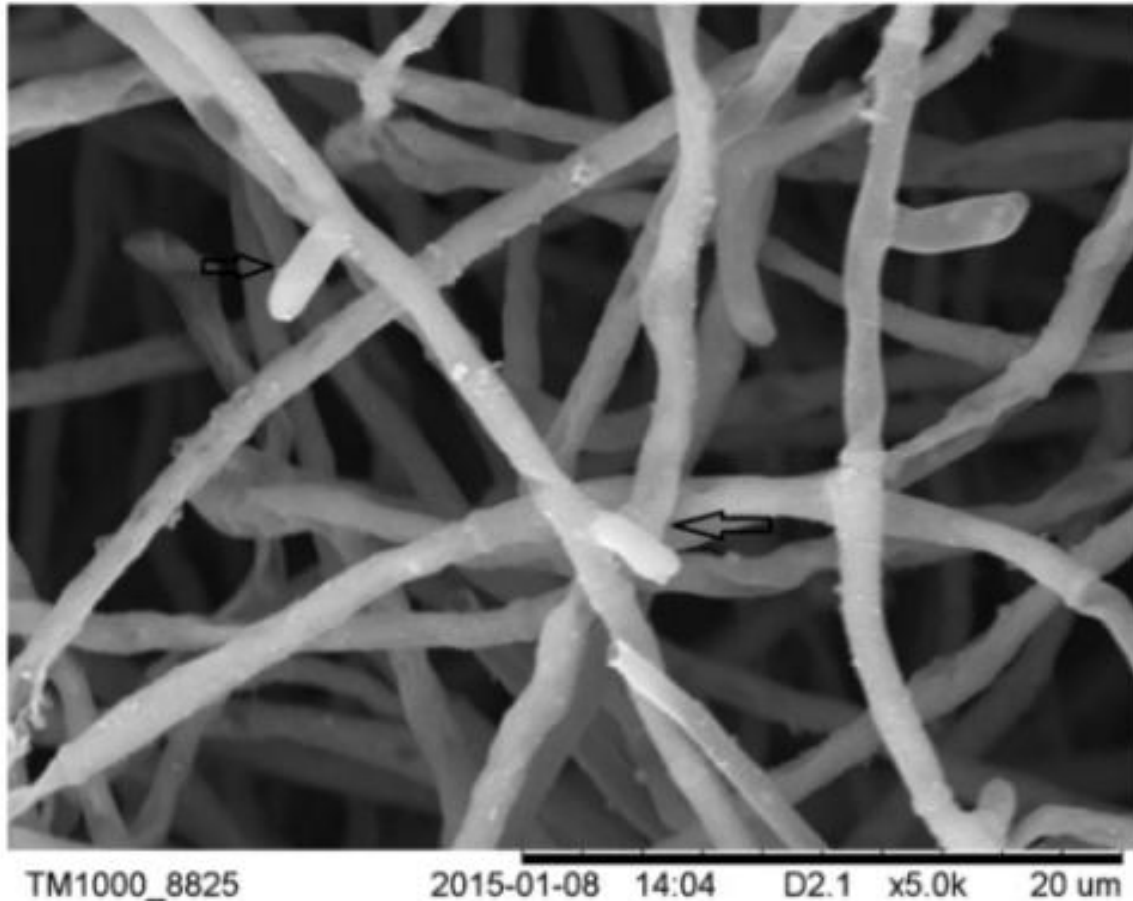
1.2.1 Αίτια και παθογόνοι μικροοργανισμοί

Η ονυχομυκητίαση αποτελεί τη συχνότερη λοίμωξη των ονύχων και είναι υπεύθυνη για περίπου 50% των περιστατικών.(7) Πρόκειται για μυκητιασική λοίμωξη που προκαλεί σταδιακή αλλοίωση και καταστροφή της ονυχαίας πλάκας. Η λοίμωξη μπορεί να προσβάλλει τους όνυχες τόσο των χεριών όσο και των ποδιών. Αιτιολογικοί παράγοντες είναι κυρίως τα δερματόφυτα, αλλά και οι ζυμομύκητες και τα μη-δερματόφυτα (NDM-Non-Dermatophyte Molds). Μεταξύ των δερματόφυτων περιλαμβάνονται κυρίως είδη του γένους *Trichophyton*, όπως *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* και *T. interdigitale*. Οι συχνότεροι μη-δερματόφυτοι μύκητες περιλαμβάνουν τα *Aureobasidium spp.*, *Fusarium spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Nigrospora spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* και *Scopulariopsis brevicaulis*. Στους ζυμομύκητες συγκαταλέγονται κυρίως είδη του γένους *Candida*.(53)

1.2.2 Μηχανισμός δράσης

Τα δερματόφυτα είναι κερατινολυτικοί μύκητες, δηλαδή καταναλώνουν και αποδομούν την κερατίνη που υπάρχει στους όνυχες, στις τρίχες και στο δέρμα. Ανάμεσα στα δερματόφυτα, κύριο αίτιο της ονυχομυκητίασης είναι το *T. rubrum*, το οποίο συνήθως προσβάλλει τους όνυχες των κάτω άκρων.(54) Η ικανότητα των δερματόφυτων να εγκαθίστανται και να εξαπλώνονται στους όνυχες συνδέεται άμεσα με την μορφολογία και τον τύπο των αναπαραγωγικών τους δομών, καθώς παράγουν μακροκονίδια και μικροκονίδια. Τα μικροκονίδια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην παθογένεια, καθώς διεισδύουν στους μαλακούς ή μικροτραυματισμένους όνυχες. Η βλάστηση των κονιδίων οδηγεί στην δημιουργία υφών, νηματοειδών στοιχείων των μυκήτων, μέσω των οποίων πραγματοποιείται η αποδόμηση της κερατίνης και η εξάπλωση της λοίμωξης. Οι υφές είναι νηματοειδή, πολυπύρρηνα κύτταρα με παχύ κυτταρικό τοίχωμα, τα οποία επεκτείνονται ακτινωτά μέσα στους κερατινοποιημένους ιστούς. (Εικόνα 7) Σε ιστολογικό επίπεδο, παρατηρούνται ως πολυάριθμες, παχύτοιχες μυκητιακές δομές, συχνά σε συσσωματώσεις, εντός της ονυχαίας πλάκας.(55) Κατά την διείσδυσή τους στον ιστό, οι υφές εκκρίνουν «εξειδικευμένα» πρωτεολυτικά ένζυμα που αποδομούν την κερατίνη, επιτρέποντας την προοδευτική επέκταση του μύκητα προς τα βαθύτερα στρώματα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η εκκριτική δραστηριότητα των ενζύμων συγκεντρώνεται στα άκρα των υφών, γεγονός που εξηγεί τη στοχευμένη αποδόμηση της κερατίνης κατά μήκος της πορείας τους.(56) Αυτά τα «εξειδικευμένα» ένζυμα στοχεύουν τους πολυπεπτιδικούς και

δισουλφιδικούς δεσμούς της κερατίνης, με σκοπό την θρέψη και τον πολλαπλασιασμό τους εντός των ονύχων.(57,58) Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε πάχυνση, αποχρωματισμό, αποκόλληση και παραμόρφωση της ονυχαίας πλάκας.(59) Η επιμονή της λοίμωξης και η τάση υποτροπής αποδίδονται στην ανθεκτικότητα των σπορίων, κυρίως των μικροκονιδίων, και στην αργή ανάπτυξη της ονυχαίας πλάκας, που επιτρέπει στον μύκητα να επιβιώσει.(60)



Εικόνα 7: Αποικίες *T. rubrum* που παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (SEM). Διάσπαρτα μικροσκοπικά σωματίδια είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια των υφών, μικροκονίδια (βέλη) και διακλαδώσεις υφών. (61)

Η μόλυνση από *Candida spp.* είναι η πιο συνηθισμένη μη-δερματοφύτη ονυχομυκητίαση, και συνήθως επηρεάζει τους όνυχες των άνω άκρων. Είδη του γένους *Candida*, καθώς και άλλοι μη-δερματοφύτοι μύκητες εντοπίζονται συνήθως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα ή σε ασθενείς με προϋπάρχουσα βλάβη της ονυχαίας πλάκας.(9) Τα είδη των *Candida* ανιχνεύονται επίσης σε άτομα που πάσχουν από διαβήτη ή λαμβάνουν μακροχρόνια αντιβιοτική αγωγή, ενώ τα μη-δερματοφύτα παρουσιάζονται σε ασθενείς που

υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία ή σε μεταμόσχευση οργάνων.(9,62) Η παρατεταμένη έκθεση των ονύχων σε υγρό περιβάλλον είναι επίσης ένας προδιαθεσικός παράγοντας επιμόλυνσης από *Candida spp.*(9) Ο παθογενετικός μηχανισμός των μυκήτων αυτών στην ονυχομυκητίαση δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, δεδομένου ότι συχνά ανιχνεύονται σε ήδη προσβεβλημένους όνυχες ή συνυπάρχουν με δερματόφυτα. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι τα *Candida spp.* παράγουν ένζυμα, όπως πρωτεάσες, φωσφολιπάσες και λιπάσες, τα οποία ενισχύουν την διείσδυση στους ιστούς.(63) Επίσης, σε ορισμένες μελέτες, υποστηρίζεται ότι τα μη-δερματόφυτα παράγουν κερατινάσες και πρωτεάσες, όπως τα δερματόφυτα.(64)

1.2.3 Τύποι

Η είσοδος των παθογόνων πραγματοποιείται συνήθως μέσω του υπονυχίου ή της πλάγιας ονυχαίας πτυχής, και η λοίμωξη μπορεί να προχωρήσει μέχρι την μήτρα των ονύχων. Ανάλογα με την περιοχή που ξεκινάει η λοίμωξη, η ονυχομυκητίαση κατατάσσεται σε διαφορετικούς τύπους. Οι κύριοι τύποι είναι:

- Άπω και πλάγια υπονύχια ονυχομυκητίαση (Distal and Lateral Subungual Onychomycosis–DLSO)
- Λευκή επιφανειακή ονυχομυκητίαση (Superficial White Onychomycosis–SWO)
- Εγγύς υπονύχια ονυχομυκητίαση (Proximal Subungual Onychomycosis–PSO)
- Ολική δυστροφική ονυχομυκητίαση (Total Dystrophic Onychomycosis–TDO)

Η άπω και πλάγια υπονύχια ονυχομυκητίαση είναι ο συχνότερος τύπος και προκαλείται συνήθως από τα δερματόφυτα *T. rubrum*. Η λοίμωξη ξεκινάει από το ελεύθερο άκρο και την πλάγια ονυχαία πτυχή, επιμολύνει την κοίτη των ονύχων και μπορεί να προσβάλλει μέχρι και τη μήτρα. Από δερματόφυτα προκαλείται επίσης, η λευκή επιφανειακή ονυχομυκητίαση και συγκεκριμένα από *T. mentagrophytes* ή *T. interdigitale*. Η μόλυνση περιορίζεται στην επιφάνεια της ονυχαίας πλάκας και εμφανίζεται συνήθως στους όνυχες των κάτω άκρων. Χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση λευκών κηλίδων ή γραμμών στην ονυχαία πλάκα, η οποία καθίσταται εύθραυστη και θρυμματίζεται εύκολα. Αντίθετα, στην εγγύς υπονύχια ονυχομυκητίαση, η λοίμωξη ξεκινάει από την εγγύς ονυχαία πτυχή σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Το τελικό στάδιο όλων των τύπων ονυχομυκητίασης είναι η ολική δυστροφική ονυχομυκητίαση (total dystrophic onychomycosis), η οποία χαρακτηρίζεται από πλήρη καταστροφή της ονυχαίας πλάκας.(9,37) Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως σε ασθενείς με χρόνια βλεννοδερματική καντιντίαση (CMC), η ολική δυστροφική μορφή μπορεί να αποτελεί την πρώτη και μοναδική εκδήλωση της νόσου.(9,65)

1.2.4 Συμπτώματα και κλινική εικόνα

Η λοίμωξη επηρεάζει την αισθητική, τη λειτουργικότητα και συχνά την ποιότητα ζωής των ασθενών, ιδιαίτερα σε χρόνιες και προχωρημένες περιπτώσεις. Τα κυριότερα κλινικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν αλλοιώσεις στην μακροσκοπική εικόνα των ονύχων, όπως η αποκόλληση της ονυχαίας πλάκας από την κοίτη (ονυχόλυση), η πάχυνση λόγω υπερκεράτωσης, η τραχύτητα και ευθραυστότητα της επιφάνειας, καθώς και η εμφάνιση δυσχρωμιών, συνήθως λευκού, κίτρινου ή καφέ χρώματος. Επιπλέον, ενδέχεται να παρατηρηθεί φλεγμονή στην περιοχή γύρω από τον όνυχα χαρακτηριστική της παρωνυχίας.(9)



Εικόνα 8: Περιστατικό άπω και πλάγιας υπονύχιας ονυχομυκητίασης.(66)

1.2.5 Διάγνωση

Η έγκαιρη και ακριβής διάγνωση της ονυχομυκητίασης είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς επιτρέπει την κατάλληλη θεραπευτική αγωγή, προλαμβάνει την εξάπλωση της λοίμωξης και μειώνει τον κίνδυνο επιπλοκών, ιδιαίτερα σε ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης. Η διαγνωστική προσέγγιση βασίζεται στον συνδυασμό κλινικής αξιολόγησης και εργαστηριακών μεθόδων, καθώς τα μακροσκοπικά ευρήματα, όπως πάχυνση, αποχρωματισμός και αποκόλληση των ονύχων, δεν είναι ειδικά και μπορεί να εμφανιστούν και σε άλλες νοσολογικές ονυχοπάθειες. Η αρχική κλινική εκτίμηση της ονυχομυκητίασης πραγματοποιείται με δερμοσκόπηση, ενώ η επιβεβαίωσή

της γίνεται με άμεση μικροσκόπηση ρινισμάτων ονύχων, και την καλλιέργεια τους σε διάφορα μυκητολογικά υποστρώματα.(55)

Δερμοσκόπηση

Η δερμοσκόπηση είναι μία μη-επεμβατική και γρήγορη διαγνωστική μέθοδος, που επιτρέπει την απεικόνιση χαρακτηριστικών όπως η δυσχρωμία, η υπονύχια υπερκεράτωση και οι μορφολογικές αλλοιώσεις της ονυχαίας πλάκας. Επίσης, συμβάλλει στη διαφορική διάγνωση μεταξύ ονυχομυκητίασης και τραυματικής αιτιολογίας ονυχόλυσης ή μελανονυχίας.(55) Ωστόσο, η τεχνική είναι χρήσιμη ως συμπληρωματικό εργαλείο και δεν επαρκεί για την τελική διάγνωση η οποία απαιτεί μικροσκοπική ή/και καλλιεργητική τεκμηρίωση.(67)

Άμεση μικροσκόπηση

Η άμεση μικροσκόπηση αποτελεί μία από τις βασικές και καθιερωμένες διαγνωστικές μεθόδους για την ανίχνευση μυκητιασικών στοιχείων στην ονυχομυκητίαση, κυρίως λόγω της ταχείας απόδοσης αποτελεσμάτων, της άμεσης εφαρμογής και της συγκριτικά απλής τεχνικής διαδικασίας.(55) Το δείγμα συλλέγεται από τις βλάβες, κυρίως από την περιοχή της υπονύχιας υπερκεράτωσης, και υποβάλλεται σε επεξεργασία με διάλυμα υδροξειδίου του καλίου (KOH) σε συγκέντρωση 10–30%, ώστε να διαλυθεί η κερατίνη και να γίνουν εμφανή τα μυκητιακά υφάδια και σπόρια. Η διαδικασία μπορεί να επιταχυνθεί με ήπια θέρμανση του δείγματος και επιπέδωση μέσω καλυπτρίδας. Εναλλακτικά, η χρήση τροποποιημένων διαλυμάτων, όπως το μίγμα KOH–DMSO, επιτρέπει την επεξεργασία χωρίς θέρμανση, αν και ενδέχεται να προκαλέσει τεχνητά μορφολογικά ευρήματα που συγχέονται με ζύμες. Για την ενίσχυση της διακριτικής ικανότητας της μεθόδου, εφαρμόζονται ειδικές χρωστικές όπως:

- Parker blue ink σε συνδυασμό με KOH
- Chlorazol black
- Calcofluor white, η οποία προσφέρει φθορίζουσα εικόνα μέσω σύνδεσης με τη χιτίνη των μυκήτων.

Επιπλέον, η εφαρμογή της χρώσης PAS έχει αναδειχθεί ως ιδιαίτερα ευαίσθητη στην ανίχνευση μυκητιακών στοιχείων εντός της ονυχαίας πλάκας, ιδιαίτερα σε ιστικά παρασκευάσματα.(9)

Αν και η άμεση μικροσκόπηση αποτελεί μέθοδο πρώτης γραμμής στη διαγνωστική προσέγγιση της ονυχομυκητίασης, η αξιοπιστία της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την εμπειρία και την εξειδίκευση του εξεταστή. Επιπλέον, η τεχνική δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση του υπεύθυνου παθογόνου είδους, γεγονός που καθιστά απαραίτητο τον συνδυασμό της με μυκητιαστική καλλιέργεια ή/και μοριακές μεθόδους, για ακριβή διάγνωση.(55)

Καλλιέργεια μυκήτων

Η καλλιέργεια αποτελεί βασικό διαγνωστικό εργαλείο για την ταυτοποίηση του υπεύθυνου παθογόνου μικροοργανισμού στην ονυχομυκητίαση, ιδιαίτερα όταν απαιτείται διαφοροδιάγνωση μεταξύ δερματόφυτων, μη-δερματόφυτων μυκήτων και ζυμομυκήτων. Τα δείγματα συλλέγονται από τις κλινικά ύποπτες περιοχές των ονύχων, κυρίως από την υπονύχια υπερκεράτωση, και ενοφθαλμίζονται σε άγαρ Sabouraud, συνήθως εμπλουτισμένο με αντιβιοτικά, όπως χλωραμφενικόλη, στρεπτομυκίνη ή πενικιλίνη, με στόχο την αναστολή βακτηριακών επιμολύνσεων. Η προσθήκη του αντιβιοτικού της κυκλοεξιμίδης στο θρεπτικό μέσο αποτελεί σημαντικό στοιχείο, καθώς αναστέλλει την ανάπτυξη μη-δερματόφυτων μυκήτων. Η αποκλειστική χρήση κυκλοεξιμιδο-εμπλουτισμένων μέσων, όμως, μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, γεγονός που οδηγεί στην παράλληλη καλλιέργεια σε κυκλοεξιμιδο-ελεύθερα μέσα για πλήρη εκτίμηση της μυκητιακής χλωρίδας.

Παρότι αποτελεί θεμελιώδες διαγνωστικό εργαλείο, η καλλιέργεια παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου έχει προηγηθεί αντιμυκητιασική αγωγή ή τα μυκητιακά στοιχεία είναι μη-βιώσιμα. Σημειώνεται ότι η καλλιέργεια δεν μπορεί να ανιχνεύσει νεκρά ή ανενεργά παθογόνα, γεγονός που περιορίζει περαιτέρω την διαγνωστική της ικανότητα. Η χρονική καθυστέρηση αποτελεί έναν ακόμα πρακτικό περιορισμό της τεχνικής, καθώς η ανάπτυξη των μυκήτων στο θρεπτικό μέσο ενδέχεται να απαιτεί έως και τέσσερις εβδομάδες για την έκδοση αποτελεσμάτων. Η αξιοπιστία της καλλιέργειας επηρεάζεται επίσης από την ποιότητα και την τεχνική συλλογής του δείγματος. Σύγχρονες μέθοδοι, όπως η χρήση οδοντιατρικού τροχού με απορροφητήρα, έχουν βελτιώσει σημαντικά τα ποσοστά θετικών καλλιέργειών, φτάνοντας έως και το 88%. Η ερμηνεία των καλλιεργητικών ευρημάτων απαιτεί ολιστική προσέγγιση. Τα δερματόφυτα θεωρούνται κατά τεκμήριο παθογόνα, ενώ άλλοι μύκητες όπως μη-δερματόφυτα (π.χ. *Scopulariopsis brevicaulis*) ή ζυμομύκητες (*Candida spp.*, *Malassezia spp.*) αποκτά διαγνωστική σημασία μόνο όταν συνυπάρχουν με μικροσκοπικά ευρήματα, όπως υφές, αρθροσπόρια ή ψευδοϋφές, και επαναλαμβανόμενη ανάπτυξη σε καλλιέργεια. Ενδεικτικά, η *S. brevicaulis*, θεωρείται παθογόνος μόνο εφόσον συνδυάζεται με χαρακτηριστική μορφολογία στο μικροσκόπιο και εμφάνιση άνω των 10 αποικιών στην

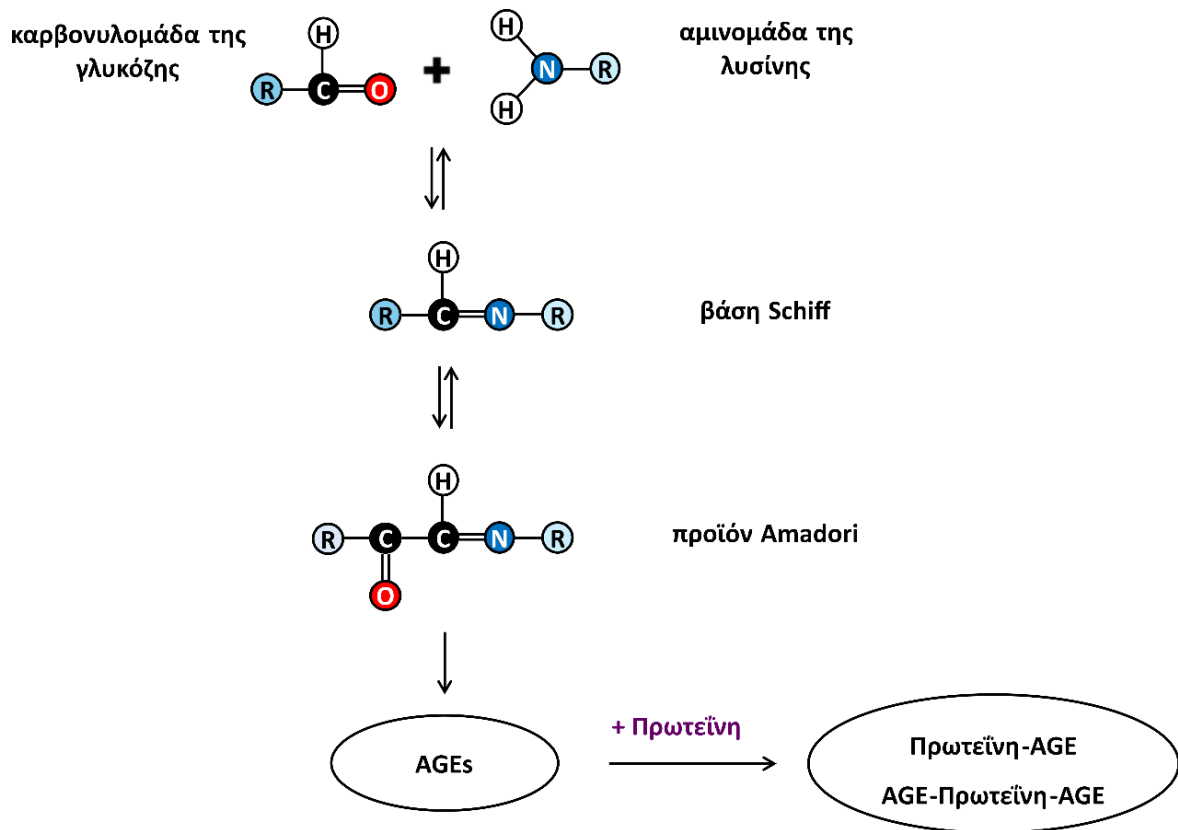
καλλιέργεια. Αντίστοιχα, *Candida spp.* και *Malassezia spp.* ανευρίσκονται συχνά ως συμβιωτικοί οργανισμοί σε ονυχόλυση, χωρίς απαραίτητα παθολογική σημασία. Η συσχέτιση των καλλιεργητικών ευρημάτων με την ιστολογική εικόνα και η ανοσοϊστοχημική τεκμηρίωση μέσω ειδικών αντισωμάτων, συμβάλλει καθοριστικά στην τελική αξιολόγηση της παθογένειας των απομονωθέντων μυκήτων.

Παρά τους περιορισμούς της, η μυκητιακή καλλιέργεια παραμένει αναπόσπαστο στοιχείο της διαγνωστικής διαδικασίας, ιδίως όταν συνδυάζεται με άμεση μικροσκόπηση (ΚΟΗ) και σύγχρονες μοριακές τεχνικές (PCR). Ο συνδυασμός αυτός ενισχύει σημαντικά την διαγνωστική ακρίβεια και επιτρέπει την επιλογή στοχευμένης και αποτελεσματικής θεραπευτικής προσέγγισης.(9,55)

1.2.6 Παθοφυσιολογία των ονύχων στον σακχαρώδη διαβήτη

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μια χρόνια μεταβολική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία, δηλαδή αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, εξαιτίας της ανεπάρκειας παραγωγής ινσουλίνης ή/και αντίστασης των κυττάρων στη δράση της. Οι επιπτώσεις του είναι εκτεταμένες και πολυπαραγοντικές επηρεάζοντας το καρδιαγγειακό, νευρικό, νεφρικό και οφθαλμικό σύστημα. Πέρα από τα βασικά συστήματα του σώματος, ο σακχαρώδης διαβήτης επηρεάζει τη μορφολογία και φυσιολογία των ονύχων. Η επίδραση αυτή οφείλεται σε παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς, με κυρίαρχο τη μικροαγγειοπάθεια που προκαλείται από τη χρόνια υπεργλυκαιμία. Η μικροαγγειοπάθεια εκδηλώνεται κυρίως μέσω της πάχυνσης της βασικής μεμβράνης των αγγείων (vascular basement membrane), οδηγώντας σε μειωμένη οξυγόνωση των ιστών, συμπεριλαμβανομένων των ονύχων. Η περιορισμένη αιμάτωση επηρεάζει την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στη μήτρα των ονύχων, γεγονός που επιβραδύνει την ανάπτυξή τους και αυξάνει την ευπάθειά τους σε τραυματισμούς και λοιμώξεις.(68)

Κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των βλαβών διαδραματίζουν τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End-products-AGEs), τα οποία σχηματίζονται μέσω μη-ενζυματικής γλυκοζυλίωσης (Maillard reactions) μεταξύ της γλυκόζης και των πρωτεϊνών (π.χ. κερατίνη).(69,70) Αρχικά, σχηματίζονται οι βάσεις Schiff, οι οποίες είναι ενδιάμεσα μόρια, τα οποία φέρουν μία ένωση με διπλό δεσμό άνθρακα-αζώτου ($C=N$). Η αμινομάδα (όπως η τελική ομάδα ενός μορίου λυσίνης) συνδέεται με διπλό δεσμό με την ομάδα αλδεϋδης της γλυκόζης. Στην συνέχεια, οι βάσεις Schiff αναδιατάσσονται προκαλώντας τον σχηματισμό των σταθερότερων δομών των προϊόντων Amadori, τα οποία φέρουν μία ομάδα κετόνης ($C=O$). Η ομάδα κετόνης δημιουργείται από την μετακίνηση του υδρογόνου από την υδροξυλομάδα που βρίσκεται δίπλα στον διπλό δεσμό άνθρακα-αζώτου ($C=N$) και την δέσμευση του με το άζωτο (N). Η οξείδωση των προϊόντων Amadori οδηγεί στον σχηματισμό μη-αναστρέψιμων τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs).(70) Γνωστές ενώσεις AGEs είναι: CML (καρβοξυμεθυλλυσίνη), CEL (καρβοξυαιθυλλυσίνη), πεντοσιδίνη (pentosidine).(71) Η CML αποτελεί ένα από τα πιο μελετημένα AGEs.(72–74) Οι AGEs αντιδρούν μη-αναστρέψιμα με τα αμινοξέα πεπτιδίων ή πρωτεϊνών δημιουργώντας τα σύμπλοκα (protein adducts): πρωτεΐνη-AGE ή AGE-πρωτεΐνη-AGE.(75) (Εικόνα 9)



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της αντίδρασης Maillard: αρχικά σχηματίζεται βάση Schiff από την αντίδραση αμίνης με αλδεΐδη, η οποία αναδιατάσσεται σε προϊόν Amadori. Σε επόμενο στάδιο, η οξείδωση και περαιτέρω τροποποίηση οδηγούν στον σχηματισμό μη αναστρέψιμων τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs), τα οποία σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες, αλλοιώνοντας τη δομή και λειτουργία τους.

Μία συχνή και σοβαρή επιπλοκή του σακχαρώδους διαβήτη είναι η διαβητική νευροπάθεια, η οποία μειώνει την αίσθηση στα κάτω άκρα, οδηγώντας σε επαναλαμβανόμενους μικροτραυματισμούς, οι οποίοι συχνά περνούν απαρατήρητοι και ενδέχεται να εξελιχθούν σε δευτερογενείς λοιμώξεις.(76) Οι μεταβολικές, αγγειακές και νευρολογικές επιδράσεις της υπεργλυκαιμίας αντανακλώνται σε χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλοιώσεις των ονύχων. Στους διαβητικούς παρατηρούνται συχνά παθολογικά ευρήματα, όπως πάχυνση (ονυχογρύπωση), αποκόλληση της ονυχιαίας πλάκας (ονυχόλυση), αυξημένη ευθραυστότητα (ονυχόρρηξη) και δυσχρωμίες. Οι αλλαγές αυτές ενδέχεται να λειτουργούν ως πρώιμοι δείκτες γλυκαιμικής απορρύθμισης ή περιφερικής ισχαιμίας. Παράλληλα, η εξασθενημένη ανοσολογική απόκριση στους διαβητικούς ασθενείς αυξάνει τη συχνότητα και τη βαρύτητα των ονυχομυκητιάσεων, οι οποίες συχνά αποτελούν την αρχική εστία επιμόλυνσης σε περιπτώσεις διαβητικού ποδιού. Σύμφωνα με μελέτες, η ονυχομυκητίαση εμφανίζεται σε περίπου 33% των διαβητικών ασθενών, ποσοστό σημαντικά υψηλότερο από τον γενικό πληθυσμό, και συνδέεται κυρίως με στελέχη όπως η *Candida albicans* και το *Trichophyton rubrum*. (62,77)

Τύποι του σακχαρώδη διαβήτη

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ-WHO),(78) ο σακχαρώδης διαβήτης διακρίνεται σε δύο κύριες κατηγορίες, με βάση την αιτία και τον μηχανισμό ανάπτυξής του:

- Διαβήτης τύπου 1

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (Type 1 Diabetes Mellitus-T1DM) είναι μια χρόνια νόσος που χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση ή ιδιοπαθή καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, με αποτέλεσμα την ανεπάρκεια ινσουλίνης. Αν και εμφανίζεται συχνά στην παιδική ηλικία, στις περισσότερες περιπτώσεις (84%) η διάγνωση πραγματοποιείται στην ενήλικη ζωή. Ένα σημαντικό ποσοστό T1DM εμφανίζεται μετά τα 30 έτη και σχετίζεται με χαμηλό δείκτη μάζας σώματος (BMI), ταχεία ανάγκη για ινσουλίνη, και αυξημένο κίνδυνο για κετοξέωση.

Στις ανεπτυγμένες χώρες, παρατηρείται ετήσια αύξηση της εμφάνισης νέων περιστατικών διαβήτη τύπου 1 κατά 3–4%, κυρίως στην παιδική ηλικία. Η πρόγνωση είναι δυσμενής σε χώρες με περιορισμένη ή ανεπαρκή πρόσβαση σε ινσουλίνη και βασικές υπηρεσίες υγείας.

Περίπου 70–90% των ασθενών με T1DM εμφανίζουν αντισώματα (GAD65, IA-2, ZnT8, ή ινσουλίνη) που στοχεύουν σε συγκεκριμένα αντιγόνα που υπάρχουν στα νησίδια του παγκρέατος, ενώ τα υπόλοιπα περιστατικά παραμένουν αδιευκρίνιστα ή ενδέχεται να έχουν μονογονιδιακή αιτιολογία.

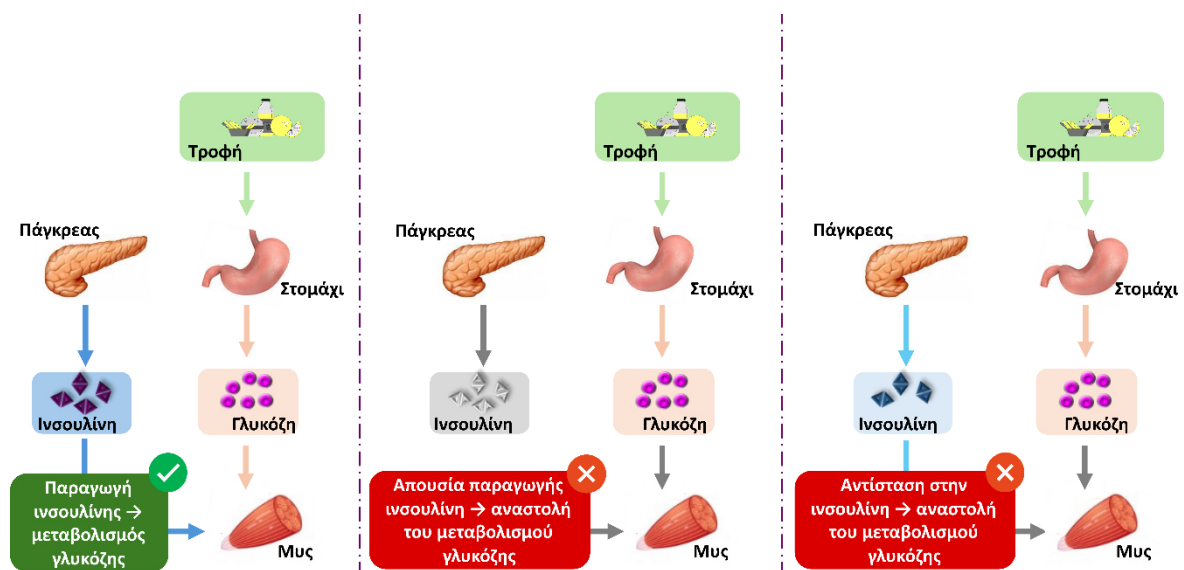
- Διαβήτης τύπου 2

Ο διαβήτης τύπου 2 (Type 2 Diabetes Mellitus-T2DM) αντιπροσωπεύει το 90–95% των περιστατικών διαβήτη παγκοσμίως, με συχνότερη εμφάνιση σε αναπτυσσόμενες χώρες. Αποτελεί ένα σημαντικό και αυξανόμενο πρόβλημα δημόσιας υγείας που συνδέεται με τις γρήγορες κοινωνικο-οικονομικές αλλαγές, την γήρανση του πληθυσμού, την αυξημένη και μη-ελεγχόμενη αστικοποίηση, τις αλλαγές στην διατροφή και τις ανθυγιεινές συνήθειες, την παχυσαρκία, και την μειωμένη φυσική δραστηριότητα. Επιπλέον, ο συγκεκριμένος τύπος διαβήτη σχετίζεται με την εμβρυϊκή υποθρεψία (ή ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη-IUGR).

Η ανάπτυξη του σχετίζεται με την δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος. Στα αρχικά στάδια της νόσου, παρατηρείται έλλειψη ινσουλίνης, ενώ συνοδεύεται από αντίσταση στην δράση της ινσουλίνης. Οι περισσότεροι ασθενείς με T2DM είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι, κατάσταση που είτε προκαλεί είτε επιδεινώνει την ινσουλινο-αντίσταση. Ακόμη και άτομα με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος (BMI) μπορεί να εμφανίζουν αυξημένη σπλαχνική παχυσαρκία, γεγονός που συνδέεται με μεγαλύτερο

κίνδυνο. Σε ορισμένους πληθυσμούς, όπως ασιατικής καταγωγής, η δυσλειτουργία των β-κυττάρων φαίνεται να συμβάλλει σε μεγαλύτερο βαθμό στην παθογένεια του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, συγκριτικά με πληθυσμούς ευρωπαϊκής καταγωγής.

Τα άτομα με T2DM δεν εξαρτώνται από την ινσουλίνη για την επιβίωσή τους, όπως συμβαίνει στον διαβήτη τύπου 1. Ωστόσο, απαιτείται αποτελεσματική ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και τροποποίηση του τρόπου ζωής, με στόχο την πρόληψη των χρόνιων επιπλοκών και τη διατήρηση της ποιότητας ζωής. Η διαχείριση του T2DM περιλαμβάνει συνήθως συνδυασμό από του στόματος υπογλυκαιμικών παραγόντων, άσκηση και εξατομικευμένο διαιτολόγιο. Ο διαβήτης τύπου 2 συχνά παραμένει χωρίς διάγνωση για χρόνια, λόγω της ήπιας υπεργλυκαιμίας που δεν προκαλεί έντονα συμπτώματα. Ωστόσο, οι ασθενείς διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο μικρο-αγγειακών και μακρο-αγγειακών επιπλοκών. Ιδιαίτερο πρόβλημα αποτελεί ο διαβήτης με πρώιμη έναρξη (νεανικός T2DM), ο οποίος χαρακτηρίζεται από βαρύτερη κλινική εικόνα, υψηλότερη θνησιμότητα, αυξημένες επιπλοκές και δυσμενέστερους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου σε σύγκριση με τον διαβήτη τύπου 1 αντίστοιχης διάρκειας. Η κετοξέωση σπάνια εμφανίζεται και συνήθως σχετίζεται με επιπλοκές άλλων παθήσεων, όπως λοιμώξεις. Μπορεί επίσης να παρατηρηθεί υπερωσμωτικό κώμα, κυρίως σε ηλικιωμένους ασθενείς.



Εικόνα 10: Κύριοι τύποι σακχαρώδη διαβήτη και πώς επηρεάζουν τη χρήση της γλυκόζης στο σώμα. Αριστερά: Σε υγιή άτομα, η ινσουλίνη επιτρέπει στους μύες να χρησιμοποιούν την γλυκόζη. Μέση: Στον διαβήτη τύπου 1, δεν παράγεται καθόλου ινσουλίνη, και η γλυκόζη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Δεξιά: Στον διαβήτη τύπου 2, υπάρχει ινσουλίνη, αλλά οι ιστοί εμφανίζουν αντίσταση σε αυτήν, με αποτέλεσμα και πάλι η γλυκόζη να μην χρησιμοποιείται επαρκώς. (Εμπνευσμένο από: (79))

1.3 Φασματοσκοπία Raman

1.3.1 Βασικές αρχές

Η φασματοσκοπία Raman είναι μια τεχνική δονητικής φασματοσκοπίας που επιτρέπει την ανάλυση της χημικής σύστασης διαφόρων υλικών, μέσω της αλληλεπίδρασης του φωτός με τους δονητικούς και περιστροφικούς τρόπους ταλάντωσης των μορίων τους. Η μέθοδος βασίζεται στη σκέδαση του φωτός (Raman scattering), κατά την οποία ένα μικρό ποσοστό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας υφίσταται μετατόπιση συχνότητας, παρέχοντας πληροφορίες για την μοριακή δομή και τους χημικούς δεσμούς των υλικών.

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (φως) όταν προσπίπτει σε ένα υλικό, αλληλεπιδρά με τα μόρια του με διάφορους μηχανισμούς. Τα φωτόνια μπορεί να απορροφηθούν, να σκεδαστούν (ελαστικά ή ανελαστικά), ή να διαπεράσουν το υλικό χωρίς σημαντική αλληλεπίδραση. Η φύση και ο βαθμός αυτών των αλληλεπιδράσεων εξαρτώνται από τις οπτικές ιδιότητες του υλικού και την ενέργεια των φωτονίων. Όταν η ενέργεια του φωτονίου «ταιριάζει» με την διαφορά ενέργειας ανάμεσα σε δύο ενεργειακές καταστάσεις του μορίου, τότε απορροφάται και το μόριο μεταβαίνει σε πιο υψηλή κατάσταση. Διαφορετικά, το φωτόνιο αλληλεπιδρά με την ύλη και αλλάζει πορεία (σκέδαση).

Η σκέδαση του φωτός κατά την αλληλεπίδρασή του με την ύλη διακρίνεται σε δύο βασικές κατηγορίες:

- Ελαστική σκέδαση

Το φωτόνιο αλλάζει κατεύθυνση αλλά η ενέργεια του (και συχνότητα) δεν μεταβάλλεται. Η πιο χαρακτηριστική μορφή σκέδασης της κατηγορίας είναι η σκέδαση Rayleigh, η οποία παρατηρείται όταν τα σωματίδια εντός του υλικού είναι μικρότερα από το μήκος κύματος του φωτός. Παρότι η Rayleigh σκέδαση είναι έντονη, δεν παρέχει πληροφορίες για την μοριακή δομή, καθώς δεν συνοδεύεται από αλλαγή ενέργειας.

- Ανελαστική σκέδαση

Το φωτόνιο αλληλεπιδρά με τα μόρια και υφίσταται μεταβολή στην ενέργεια του. Αυτό συμβαίνει επειδή ανταλλάσσει ενέργεια με τις δονήσεις των μορίων του υλικού. Η μεταβολή καταγράφεται ως μετατόπιση συχνότητας και αποτελεί την βάση του σήματος Raman. Ωστόσο, πρόκειται για μία εξαιρετικά ασθενή διαδικασία, αντιπροσωπεύει μόλις 0.01% έως 0.1% της αρχικής έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας(80) και η πιθανότητα εμφάνισης είναι 10^{-8} - 10^{-6} φορές μικρότερη από την σκέδαση Rayleigh.(81)

Το φαινόμενο της ανελαστικής σκέδασης διακρίνεται σε σκέδαση: Stokes και anti-Stokes.

- Σκέδαση Stokes

Το φωτόνιο αλληλεπιδρά με τα μόρια και προκαλεί μετάβαση σε υψηλότερη δονητική στάθμη, με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτονίου με χαμηλότερη ενέργεια από το αρχικό.

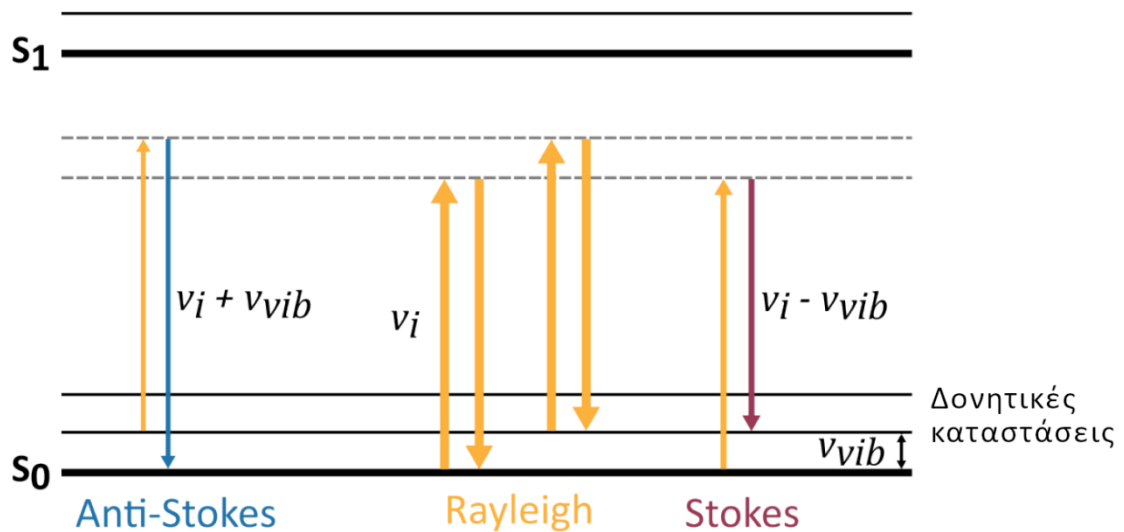
- Σκέδαση anti-Stokes

Το φωτόνιο αλληλεπιδρά με μόριο που βρίσκεται σε διεγερμένη δονητική κατάσταση, το οποίο μεταβαίνει σε χαμηλότερη στάθμη και εκπέμπει φωτόνιο με περισσότερη ενέργεια από την αρχική.

Η σκέδαση Stokes είναι εντονότερη από την anti-Stokes, γιατί τα μόρια είναι κυρίως στην θεμελιώδη δονητική κατάσταση. Αυτή η συμπεριφορά οδηγεί στην χρήση του τμήματος Stokes των φασμάτων Raman στις μετρήσεις. Η ένταση της σκέδασης Raman είναι ανάλογη με την τέταρτη δύναμη της συχνότητας του φωτός της πηγής:

$$I_R \propto \nu^4 I_0 N \left(\frac{\partial a}{\partial Q} \right)^2$$

όπου ν είναι η συχνότητα διέγερσης, I_0 η ένταση της ακτινοβολίας της πηγής, N ο αριθμός των μορίων που συμμετέχουν στην σκέδαση, a η πολωσιμότητα των μορίων και Q το μέγιστο πλάτος ταλάντωσης κατά τη δονητική κίνηση του μορίου. (82)



Διάγραμμα 1: Το διάγραμμα Jablonski απεικονίζει τις διεργασίες σκέδασης Rayleigh και Raman για μεταβάσεις μεταξύ δύο δονητικών καταστάσεων ενός μορίου. Τα S_0 και S_1 αντιστοιχούν στην θεμελιώδη και στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση του μορίου, αντίστοιχα.(83)

1.3.2 Φθορισμός

Στην φασματοσκοπία Raman παρατηρείται ένα ανεπιθύμητο φαινόμενο, ο φθορισμός. Ο φθορισμός είναι μια φωτοφυσική διεργασία κατά την οποία ένα μόριο απορροφά ένα φωτόνιο και διεγείρεται σε υψηλότερη ηλεκτρονική και δονητική κατάσταση, από την οποία επιστρέφει στην θεμελιώδη κατάστασή του με εκπομπή φωτονίου. Το εκπεμπόμενο φωτόνιο έχει πάντοτε χαμηλότερη ενέργεια (μεγαλύτερο μήκος κύματος) από το αρχικό, λόγω απώλειας ενέργειας μέσω μη-ακτινοβόλων διαδικασιών (όπως δονητική χαλάρωση). Η διάρκεια ζωής του φθορισμού είναι συνήθως της τάξης των νανοδευτερολέπτων (10^{-9} s).

Ο λόγος που ο φθορισμός αποτελεί ανεπιθύμητο φαινόμενο είναι το γεγονός ότι είναι πολλαπλάσιας έντασης από την σκέδαση Raman, δημιουργώντας ισχυρό υπόβαθρο στα φάσματα και μειωμένο λόγο σήματος προς θόρυβο (SNR). Το αποτέλεσμα είναι η επικάλυψη και αλλοίωση των χαρακτηριστικών κορυφών Raman, καθιστώντας δύσκολη την διαδικασία εντοπισμού και υπολογισμού της έντασης και του εύρους.(81,84) Η επίδραση του φθορισμού είναι έντονη στα βιολογικά δείγματα όπως οι όνυχες, καθώς περιέχουν φθοροφόρα μόρια: αρωματικά αμινοξέα και λιπίδια.(85,86)

Η μείωση του φαινομένου αποτελεί καθοριστική προϋπόθεση για την αξιόπιστη φασματοσκοπική ανάλυση. Προς αυτή την κατεύθυνση, εφαρμόζονται διάφορες πειραματικές και υπολογιστικές τεχνικές. Η χρήση πηγών μεγάλου μήκους κύματος όπως

η ακτινοβολία NIR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες πρακτικές, καθώς δεν διαθέτει επαρκή ενέργεια για την ηλεκτρονική διέγερση.(87) Σε συνδυασμό, μπορεί να εφαρμοστεί η υπολογιστική μέθοδος αφαίρεσης υποβάθρου με πολυωνυμική προσαρμογή ή χρήση παραγώγων.(88,89)

1.3.3 Περιγραφή του φαινομένου

Η φασματοσκοπία Raman μπορεί να περιγραφεί τόσο με κλασική όσο και με κβαντική προσέγγιση. Κάθε προσέγγιση εξηγεί διαφορετικές πτυχές του φαινομένου. Στην κλασική περιγραφή, οι μοριακές δομές θεωρούνται σύνολα φορτισμένων σωματιδίων (πυρήνες και ηλεκτρονικά νέφη) με συγκεκριμένη πολωσιμότητα. Όταν ένα τέτοιο μόριο αλληλεπιδρά με το ταλαντούμενο ηλεκτρικό πεδίο ενός προσπίπτοντος φωτονίου, προκαλείται ένα ταλαντούμενο ηλεκτρικό δίπολο, το οποίο με την σειρά του εκπέμπει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε συγκεκριμένες συχνότητες, προκαλώντας σκέδαση Rayleigh και Raman (Stokes, anti-Stokes). Ωστόσο, η συγκεκριμένη προσέγγιση παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς, καθώς δεν περιλαμβάνει την ποσοτικοποίηση των μεταβάσεων. Το «κενό» καλύπτεται από την κβαντική περιγραφή.

Κλασική περιγραφή

Η κλασική περιγραφή του φαινομένου βασίζεται στην ηλεκτροδυναμική και προσφέρει πληροφορίες για την εξάρτηση της σκέδασης από την συχνότητα και ορισμένα στοιχεία των κανόνων επιλογής.(90,91)

Συγκεκριμένα, θεωρούμε το ταλαντούμενο ηλεκτρικό πεδίο $\vec{E}$ ενός προσπίπτοντος φωτονίου ως επίπεδο κύμα με γωνιακή συχνότητα ω_i ($\omega_i = 2\pi\nu_i$, όπου ν_i η συχνότητα της ταλάντωσης):

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\vec{k}_i \cdot \vec{r} - \omega_i t + \varphi)$$

Θέτουμε $\varphi=0$ (φάση) και $\vec{r}=0$ (θέση), καθώς παρατηρούμε το ηλεκτρικό πεδίο σε μία συγκεκριμένη σταθερή θέση στο χώρο, εκεί όπου το πεδίο αλληλεπιδρά με το μόριο. Έτσι, το ηλεκτρικό πεδίο:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\omega_i t)$$

προκαλεί ένα επαγόμενο δίπολο:

$$\vec{\mu} = \alpha \vec{E}$$

όπου α η πολωσιμότητα του μορίου, δηλαδή το μέτρο της ικανότητάς του να αναπτύσσει επαγόμενη διπολική ροπή όταν αλληλεπιδρά με ένα εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο. Η πολωσιμότητα ενός μορίου δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από τις δονήσεις του. Αν η πολωσιμότητα μεταβάλλεται καθώς το μόριο πάλλεται, τότε είναι δυνατή η εμφάνιση Raman σκέδασης.

Η πολωσιμότητα εκφράζεται ως ένας τανυστής (πίνακας 3x3). Τα διαγώνια στοιχεία του πίνακα εκφράζουν την απόκριση ενός υλικού στο ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται κατά τον ίδιο άξονα με την διπολική ροπή, ενώ τα εκτός διαγωνίου στοιχεία εκφράζουν την απόκριση του υλικού σε ηλεκτρικά πεδία που εφαρμόζονται σε κάθετες διευθύνσεις. Για τα ισότροπα υλικά, τα διαγώνια στοιχεία του πίνακα έχουν την ίδια τιμή α , ενώ τα εκτός διαγωνίου είναι μηδέν. Για τα αυτόνομα και ανεξάρτητα μόρια τα οποία μπορούν να δονηθούν χωρίς να περιστραφούν, κάθε στοιχείο του τανυστή μπορεί να αναπτυχθεί σε σειρά Taylor (σε κανονικές συντεταγμένες): (91,92)

$$\alpha_{\rho\sigma} = (\alpha_{\rho\sigma})_0 + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k + \frac{1}{2} \sum_{k,l} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k \partial Q_l} \right)_0 Q_k Q_l + \dots$$

όπου: $(\alpha_{\rho\sigma})_0$: η πολωσιμότητα στη θέση ισορροπίας

Q_k : η δονητική συντεταγμένη (stretching, bending)

Οι παράγωγοι δείχνουν πώς αλλάζει η πολωσιμότητα καθώς το μόριο πάλλεται.

Κρατώντας μόνο τον πρώτο όρο της σειράς Taylor, για την αρμονική προσέγγιση και μελετώντας μία μόνο δόνηση, τότε:

$$\alpha_k = a_0 + a'_k Q_k$$

όπου: $a'_k = \left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right)_0$: παράγωγος πολωσιμότητας, κριτήριο Raman ενεργότητας.

$Q_k = Q_{k0} \cos(\omega_k t + \delta_k)$: αρμονική ταλάντωση μορίου (Q_{k0} : πλάτος, δ_k : φάση)

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση του ηλεκτρικού πεδίου $\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\omega_i t)$ και της μεταβαλλόμενης πολωσιμότητας:

$$\vec{\mu} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_i t) + \sum_k \alpha'_k \vec{E}_0 Q_{k0} \cos(\omega_k t + \delta_k) \cos(\omega_i t)$$

και με την χρήση τριγωνομετρικών ταυτοτήτων:

$$\vec{\mu} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_i t) + \frac{1}{2} \sum_k \alpha'_k \vec{E}_0 Q_{k0} \{ \cos[(\omega_i - \omega_k)t - \delta_k] + \cos[(\omega_i + \omega_k)t + \delta_k] \}$$

Η εξίσωση αποκαλύπτει τρία φασματικά μέρη που σχετίζονται με :

- Σκέδαση Rayleigh: το πρώτο μέρος, το οποίο εξαρτάται από την γωνιακή συχνότητα ω_i , και παράγει ακτινοβολία συχνότητας ν_i δηλαδή ίδια συχνότητα με το προσπίπτον φως.
- Σκέδαση Stokes: το δεύτερο μέρος, το οποίο εξαρτάται από την συχνότητα $\omega_i - \omega_k$, παράγει ακτινοβολία συχνότητας $\nu_i - \nu_k$ και το εκπεμπόμενο φως έχει μικρότερη ενέργεια από το προσπίπτον.
- Σκέδαση anti-Stokes: το τρίτο μέρος, το οποίο εξαρτάται από την συχνότητα $\omega_i + \omega_k$, παράγει ακτινοβολία συχνότητας $\nu_i + \nu_k$ και το εκπεμπόμενο φως έχει μεγαλύτερη (κέρδισε) ενέργεια από το προσπίπτον.

Σύμφωνα με την εξίσωση, για να πραγματοποιηθούν οι σκεδάσεις Stokes και anti-Stokes (δεύτερο και τρίτο μέρος) πρέπει:

$$a'_k = \left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right)_0 \neq 0$$

Δηλαδή αποδείχτηκε ότι η πολωσιμότητα πρέπει να αλλάζει όταν το μόριο δονείται.

Κβαντική περιγραφή

Η κβαντική περιγραφή του φαινομένου βασίζεται στην κβαντική μηχανική και θεωρούμε ότι η απορρόφηση ή η εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας συμβαίνει όταν ένα κβαντικό σύστημα μεταβαίνει μεταξύ ενεργειακών καταστάσεων, από μια χαμηλότερη σε μία υψηλότερη και αντίστροφα. Μία τέτοια μετάβαση είναι επιτρεπτή μόνο εφόσον η μεταβατική διπολική ροπή μεταξύ των δύο καταστάσεων είναι διάφορη του μηδενός.

Όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συχνότητας ν_i αλληλεπιδρά με ένα μόριο, το ηλεκτρικό του πεδίο:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\omega_i t)$$

διαταράσσει την κυματοσυνάρτηση του μορίου. Η διαταραχή προκαλεί την εμφάνιση μιας επαγόμενης μεταβατικής ροπής μ_{fi} μεταξύ μιας αρχικής κατάστασης i και μιας τελικής κατάστασης f , η οποία περιγράφεται από:

$$\mu_{fi} = \int \psi_f^* \hat{\mu} \psi_i d\tau$$

όπου: ψ_i, ψ_f : κυματοσυναρτήσεις της αρχικής και της τελικής κατάστασης

$\hat{\mu}$: τελεστής της επαγόμενης διπολικής ροπής

$d\tau$: στοιχειώδες στοιχείο όγκου στον χώρο διαμόρφωσης

σύμβολο *: το συζυγές μιγαδικό της κυματοσυνάρτησης.

- Κυματοσυναρτήσεις

Οι κυματοσυναρτήσεις ψ μπορούν να διαχωριστούν σε ηλεκτρονική (φ_e), δονητική (φ_v) και περιστροφική (Y_j) συνιστώσα.(93) Εμείς θεωρούμε ότι μόνο η δονητική συνιστώσα μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια μιας δονητικής μετάβασης. Άρα, για την εξίσωση της επαγόμενης μεταβατικής ροπής μ_{fi} ισχύει:

$$\mu_{fi} = \int \varphi_{v_f}^* \hat{\mu} \varphi_{v_i} d\tau$$

- Τελεστής της επαγόμενης διπολικής ροπής

Ο τελεστής της επαγόμενης διπολικής ροπής εκφράζεται ως:

$$\hat{\mu} = \alpha \vec{E}$$

όπου α είναι ο τανυστής πολωσιμότητας του συστήματος και $\vec{E}$ το ηλεκτρικό πεδίο.

Ο τανυστής πολωσιμότητας για μία αρμονική ταλάντωση γύρω από την θέση ισορροπίας αναπτύσσεται σε σειρά Taylor:

$$\alpha_{\rho\sigma} = (\alpha_{\rho\sigma})_0 + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k + \frac{1}{2} \sum_{k,l} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k \partial Q_l} \right)_0 Q_k Q_l + \dots$$

Διατηρώντας μόνο τους πρώτους όρους και επικεντρώνοντας την ανάλυση σε μία κανονική δόνηση Q_k , παίρνουμε:

$$\alpha_k = a_0 + a'_k Q_k$$

- Επαγόμενη μεταβατική ροπή

Σύμφωνα με την ανάλυση των κυματοσυναρτήσεων και του τελεστή επαγόμενης διπολικής ροπής, η επαγόμενη μεταβατική ροπή γίνεται:

$$\mu_{fi} = \alpha_0 \vec{E} \int \varphi_{v_f}^* \hat{\mu} \varphi_{v_i} d\tau + \vec{E} \sum_k \left\{ \alpha'_k \int \varphi_{v_f}^* Q_k \varphi_{v_i} d\tau \right\}$$

Η πρώτη ολοκλήρωση είναι μη μηδενική μόνο όταν $\varphi_{v_f} = \varphi_{v_i}$, δηλαδή δεν υπάρχει μεταβολή στην ενέργεια. Αυτή είναι η περίπτωση της σκέδασης Rayleigh. Εφόσον οι αντίστοιχες τιμές α_0 είναι πάντα διάφορες του μηδενός, η σκέδαση Rayleigh είναι πάντα επιτρεπτή.

Η δεύτερη ολοκλήρωση αντιστοιχεί στην σκέδαση Raman, και είναι μη μηδενική μόνο εφόσον η παράγωγος της πολωσιμότητας ως προς τη δονητική συντεταγμένη στη θέση ισορροπίας είναι διάφορη του μηδενός:

$$\left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right)_0 \neq 0$$

Αυτός είναι ο βασικός κανόνας επιλογής για την σκέδαση Raman.

- Αρμονικός ταλαντωτής

Για έναν αρμονικό ταλαντωτή οι κυματοσυναρτήσεις κάθε δονητικής στάθμης περιγράφονται ως:(94)

$$\varphi_v(Q) = N_v H_v(\sqrt{b}Q) e^{-bQ^2/2}$$

όπου: H_v : πολυώνυμο Hermite

N_v : σταθερά κανονικοποίησης

$$b = \sqrt{\frac{km_{eff}}{\hbar^2}}: \text{σταθερά}$$

Η εφαρμογή των πολυωνύμων Hermite και οι ιδιότητές τους οδηγούν στον εξής κανόνα επιλογής για Raman μεταβάσεις (Stokes και anti-Stokes): $\Delta\nu = \pm 1$, δηλαδή τα φωτόνια που σκεδάζονται μέσω του φαινομένου Raman είτε χάνουν είτε αποκτούν ενέργεια ίση με:

$$\Delta E = h\nu_{vib}$$

Αφού η ενεργειακή διαφορά μεταξύ διαδοχικών επιπέδων είναι:

$$\Delta E = E_1 - E_0 \left(\frac{3}{2} - \frac{1}{2} \right) h\nu_{vib} = h\nu_{vib}, \text{ όπου } \nu_{vib} \text{ η συχνότητα της δονητικής μετάβασης.}$$

Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραπάνω ανάλυση περιορίζεται στην ιδανική περίπτωση αρμονικού ταλαντωτή.

Στην πραγματικότητα, οι δονητικές κινήσεις των μορίων δεν υπακούουν αυστηρά στο αρμονικό μοντέλο, λόγω της πολυπλοκότητας της μοριακής δομής και της μορφής του δυναμικού, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται μεταβάσεις $\Delta\nu \neq \pm 1$ (όπως overtones), οι οποίες είναι ασθενέστερες.

- Ένταση Stokes και anti-Stokes

Η κβαντομηχανική προσέγγιση προβλέπει τον λόγο έντασης των Stokes και anti-Stokes γραμμών:

$$\frac{I_{anti-Stokes}}{I_{Stokes}} = \left(\frac{\nu_i - \Delta\nu}{\nu_i + \Delta\nu} \right)^4 e^{-\frac{h\Delta\nu}{kT}}$$

η οποία εξαρτάται από: την συχνότητα του προσπίπτοντος φωτός (ν_i), το πλάτος της Raman μετατόπισης ($\Delta\nu$), την θερμοκρασία (T) και τις πληθυσμιακές κατανομές των δονητικών καταστάσεων.

1.3.4 Φάσμα

Μετατόπιση

Η συμπεριφορά κάθε μορίου κατά την σκέδαση Raman διαφέρει και η διαφοροποίηση αποτυπώνεται σε μια γραφική απεικόνιση που παρουσιάζει την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με την μετατόπιση Raman (Raman shift). Η μετατόπιση Raman αντιστοιχεί στην διαφορά ενέργειας μεταξύ της προσπίπτουσας και της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και εκφράζεται ως: $\Delta\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda_0} - \frac{1}{\lambda'}$, όπου λ_0 είναι το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και λ' είναι το αντίστοιχο μήκος κύματος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Όταν τα μήκη κύματος εκφράζονται σε νανόμετρα (nm), η μετατόπιση Raman εκφράζεται σε cm^{-1} , μονάδα που χρησιμοποιείται ευρέως στην φασματοσκοπία. Για να γίνει αυτή η μετατροπή, απαιτείται κανονικοποίηση με παράγοντα 10^7 , καθώς $1 \text{ nm}^{-1} = 10^7 \text{ cm}^{-1}$. Η ποσότητα $\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$ ονομάζεται κυματάριθος (wavenumber) και αποτελεί τυπική φασματοσκοπική μονάδα για την περιγραφή δονητικών μεταβάσεων. Το φάσμα Raman, δηλαδή η κατανομή της έντασης ως προς τη Raman μετατόπιση, παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τη μοριακή δομή, τις ενεργές χημικές ομάδες και τη σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, καθώς κάθε δονητική μετάβαση εμφανίζεται ως χαρακτηριστική κορυφή.

Ενεργοί τρόποι δόνησης

Το φάσμα Raman προκύπτει από τους ενεργούς τρόπους δόνησης (Raman) των μορίων (Raman-active molecular vibrations), δηλαδή τις δονήσεις που αλληλεπιδρούν με το φως μέσω της αλλαγής της πολωσιμότητας του μορίου κατά τη διάρκεια της δόνησης. Οι μοριακές κινήσεις διακρίνονται σε εξωτερικές, (μεταφορές και περιστροφές), και εσωτερικές, τις δονήσεις, όπου τα άτομα κινούνται μεταξύ τους στο εσωτερικό του μορίου. Μόνο συγκεκριμένοι από αυτούς τους εσωτερικούς τρόπους δόνησης είναι Raman ενεργοί, ανάλογα με το αν προκαλούν μεταβολή στην πολωσιμότητα.

Οι βασικοί τύποι ενεργών τρόπων δονήσεων (Raman) που συναντώνται σε πολυατομικά μόρια είναι:

- Συμμετρικές δονήσεις τάσης (Symmetric stretching)

Τα άτομα που συνδέονται με έναν δεσμό απομακρύνονται και πλησιάζουν ταυτόχρονα με τον ίδιο ρυθμό, διατηρώντας την συμμετρία του μορίου.

- Ασύμμετρες δονήσεις τάσης (Asymmetric stretching)

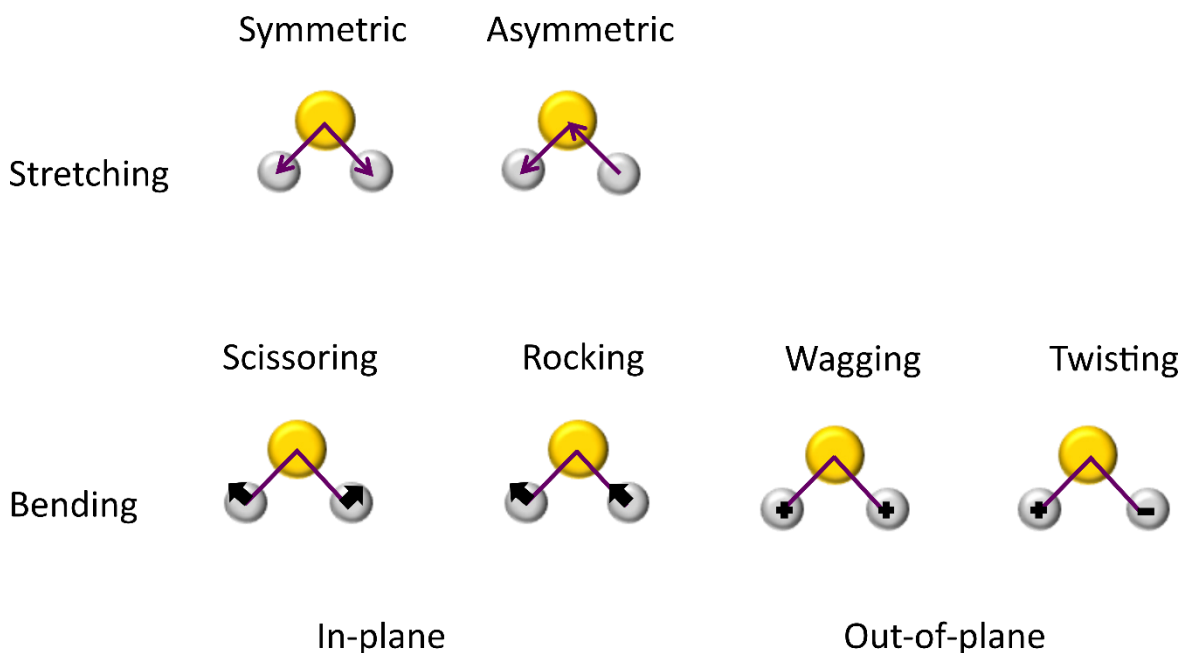
Τα άτομα κινούνται με αντίθετο ρυθμό: ενώ ο ένας δεσμός εκτείνεται, ο άλλος συστέλλεται, προκαλώντας ασυμμετρία στην κίνηση του μορίου.

- Δονήσεις κάμψης εντός επιπέδου (In-plane bending)

Τα άτομα κινούνται μέσα στο ίδιο επίπεδο με δύο τρόπους: το scissoring, και το rocking, όπου πλησιάζουν και απομακρύνονται μεταξύ τους εντός του επιπέδου.

- Δονήσεις κάμψης εκτός επιπέδου (Out-of-plane bending) (wagging, twisting)

Τα άτομα κινούνται εκτός του επιπέδου του μορίου, σε τρεις διαστάσεις με δύο τρόπους: το wagging, και το twisting, όπου εκτρέπονται από το μοριακό επίπεδο, είτε με ταυτόχρονη ταλάντωση προς και από το επίπεδο, είτε με περιστροφή γύρω από έναν κοινό άξονα ή δεσμό, αντίστοιχα.



Εικόνα 11: Βασικοί τύποι των τρόπων δόνησης πολυατομικών μορίων. Οι δονήσεις τάσης (stretching): συμμετρικές και ασύμμετρες, και οι δονήσεις κάμψης (bending): ψαλιδοειδής (scissoring) και λικνιζόμενη (rocking), πραγματοποιούνται στο ίδιο επίπεδο. Οι δονήσεις κάμψης: παλλόμενη (wagging) και συστρεφόμενη (twisting) πραγματοποιούνται εκτός του επιπέδου του μορίου. Τα σύμβολα (+), (-) αποτυπώνουν την φάση της ταλάντωσης των ατόμων που κινούνται πάνω και κάτω από το επίπεδο του μορίου: (+) τα άτομα κινούνται προς την ίδια πλευρά του επιπέδου και (-) κινούνται προς την αντίθετη πλευρά του επιπέδου. (Βασισμένο σε (95))

1.3.5 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί

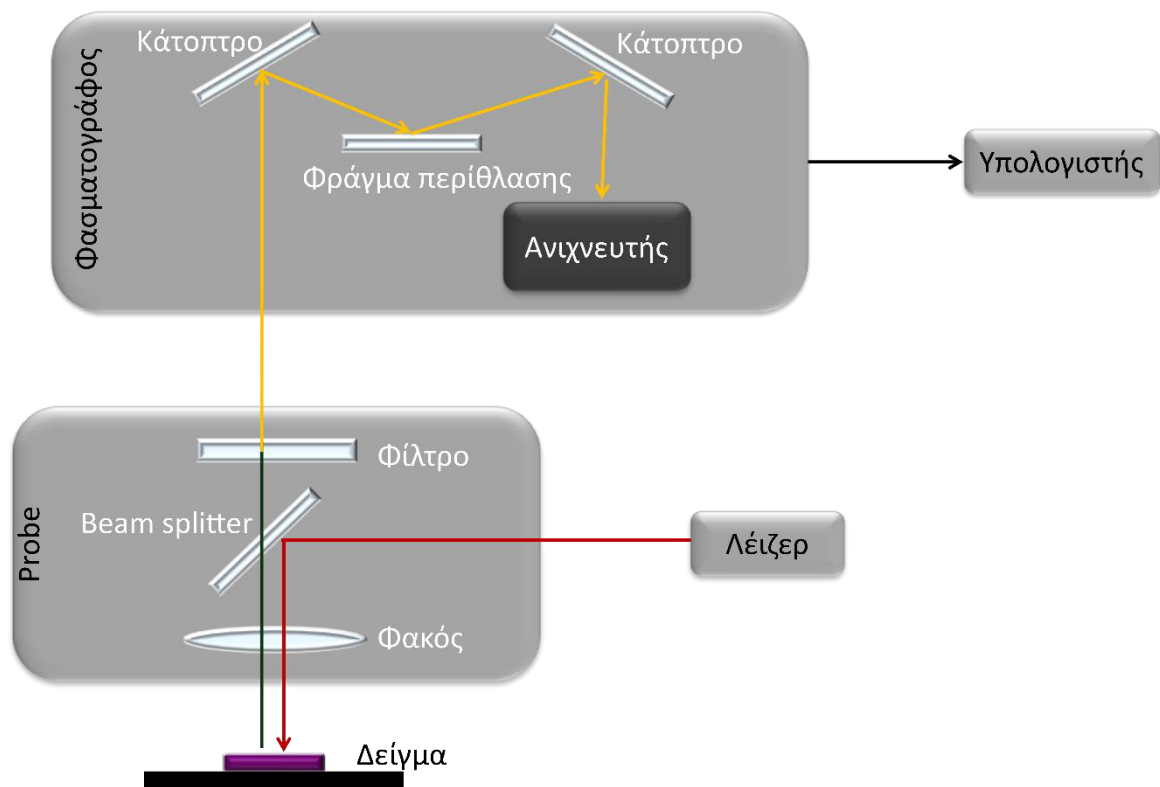
Η φασματοσκοπία Raman έχει αρκετά πλεονεκτήματα που την καθιστούν κατάλληλη μέθοδο για την εξέταση βιολογικών δειγμάτων. Αρχικά, είναι μη-επεμβατική και μη-καταστρεπτική επιτρέποντας τις *in vivo* μετρήσεις αλλά και την επανάληψη αυτών (*in vivo* και *ex vivo*). Επίσης, απαιτείται ελάχιστη ή καθόλου προετοιμασία των δειγμάτων και η μέτρηση αυτών πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα (τυπικά λίγα δευτερόλεπτα). Η ύπαρξη νερού (που παρουσιάζει χαμηλή πολωσιμότητα) επηρεάζει ελάχιστα τα αποτελέσματα της μέτρησης. Ωστόσο, η σκέδαση Raman χαρακτηρίζεται από μικρή διατομή (cross-section), καθιστώντας την μια ασθενή διαδικασία, η οποία δυσχεραίνει την απόκτηση σήματος, το οποίο συχνά συνοδεύεται από φθορίζον υπόβαθρο, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλό λόγο σήματος προς θόρυβο (SNR). (96–98)

1.3.6 Πειραματική διάταξη

Μια βασική διάταξη για φασματοσκοπία Raman αποτελείται από τρία κύρια μέρη: μια πηγή laser, έναν ανιχνευτή και ένα φασματόμετρο. Το laser χρησιμοποιείται στην ακτινοβολήση των δειγμάτων. Χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι laser, όπως laser στερεάς κατάστασης (Nd:YAG), αερίου (He-Ne) ή laser διόδου, που εκπέμπουν στο κοντινό υπεριώδες μέχρι το κοντινό υπέρυθρο (325-1064nm) και ισχύ στην έξοδο που υπολογίζεται σε mW. Η επιλογή του μήκους κύματος και της ισχύος εξόδου εξαρτάται από την εφαρμογή. Στην εξέταση βιολογικών δειγμάτων επιλέγονται συχνά laser διόδου στα 785 nm λόγω της καλής ισορροπίας μεταξύ απόδοσης, παρεμβολών λόγω φθορισμού, κόστους και φορητότητας.(99)

Η διάταξη μπορεί να περιλαμβάνει ένα ενιαίο σύστημα (probe) που να συνδυάζει την δέσμη του laser με του ανιχνευτή: το φως από το laser κατευθύνεται μέσω οπτικής ίνας στο probe, όπου ένας διχρωμικός καθρέφτης (beam splitter) ανακλά το laser προς το δείγμα και παράλληλα επιτρέπει στο σκεδαζόμενο φως να περάσει. Στη συνέχεια, το φως εστιάζεται στο δείγμα με τη βοήθεια φακού, και το σκεδαζόμενο φως ακολουθεί την ίδια διαδρομή επιστροφής, περνάει από φίλτρο που μπλοκάρει την σκέδαση Rayleigh, και οδηγείται μέσω οπτικής ίνας στο φασματόμετρο.(100–102) Στο φασματόμετρο, το φως αναλύεται μέσω οπτικών διατάξεων (μονοχρωμάτορες και καθρέφτες) και εστιάζεται σε έναν ανιχνευτή (Charged-Coupled Device-CCD), ο οποίος καταγράφει το φάσμα.(100) Τα δεδομένα του φάσματος μετατρέπονται σε ψηφιακή μορφή και αποθηκεύονται σε έναν υπολογιστή για περαιτέρω ανάλυση.

Η πειραματική διάταξη που περιγράφηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 12.



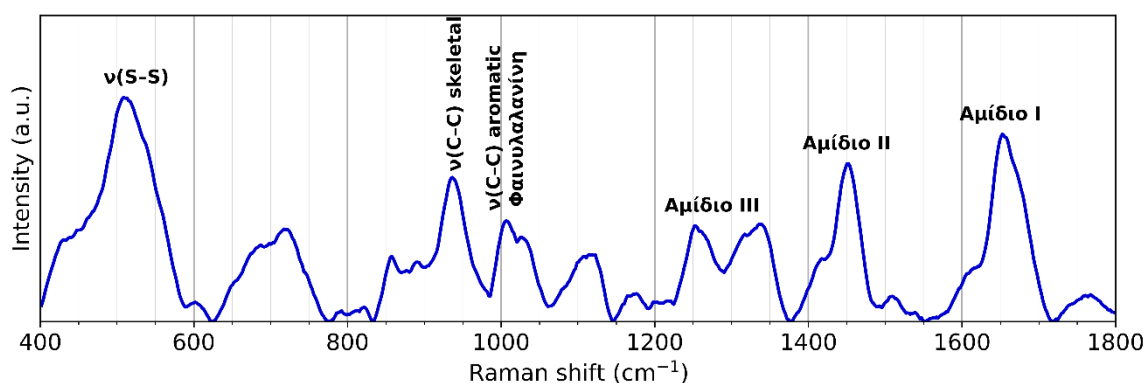
Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης της φασματοσκοπίας Raman.

1.3.7 Όνυχες

Η φασματοσκοπία Raman αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο στην μη-καταστρεπτική ανάλυση της ονυχιάας πλάκας, επιτρέποντας την διάγνωση της ονυχομυκητίασης από *T.rubrum* και *Candida spp.*(103) και την ανίχνευση παθολογικών καταστάσεων όπως του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.(104)

Η χημική σύσταση και η δομική ακεραιότητα των ονύχων προσδιορίζονται κυρίως από το φασματικό εύρος $400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$, γνωστό και ως περιοχή μοριακού αποτυπώματος (fingerprint region). Σε αυτό το εύρος καταγράφονται χαρακτηριστικές κορυφές Raman που σχετίζονται με την σύσταση της κερατίνης, λειτουργώντας ως βιοδείκτες για την αξιολόγηση της φυσιολογικής ή παθολογικής κατάστασης του ιστού. Συγκεκριμένα εντοπίζονται:

- Δισουλφιδικοί δεσμοί (--S--S--)
- Πεπτιδικό δεσμοί (του αμίδιου I,II, III)
- Αρωματικά αμινοξέα (όπως φαινυλαλανίνη και τυροσίνη).



Εικόνα 13: Μοριακό αποτύπωμα του φάσματος Raman ενός υγιούς όνυχας, όπου οι κύριες κορυφές αντιστοιχίστηκαν σε δονήσεις.

Πίνακας 1: Αντιστοίχιση κύριων κορυφών του φάσματος Raman ενός όνυχας.(102)

Raman shift (cm ⁻¹)	Αντιστοίχιση κορυφών
500–550	ν(S–S), Κερατίνη
830–870	δ(CCH) aliphatic, Τυροσίνη δ(CCH) aromatic, Τυροσίνη
938	ν(C-C) skeletal, α-έλικα, Κερατίνη
1000–1030	ν(C-C) aromatic, Φαινυλαλανίνη ν(C-H), Φαινυλαλανίνη
1240–1280	δ(CH ₂) wagging, ν(C-N), Αμίδιο III
1450	δ(CH ₂) scissoring, Αμίδιο II
1654	ν(C = O), α-έλικα, Αμίδιο I
1670	ν(C = O), β-πτυχωτή επιφάνεια, Αμίδιο I

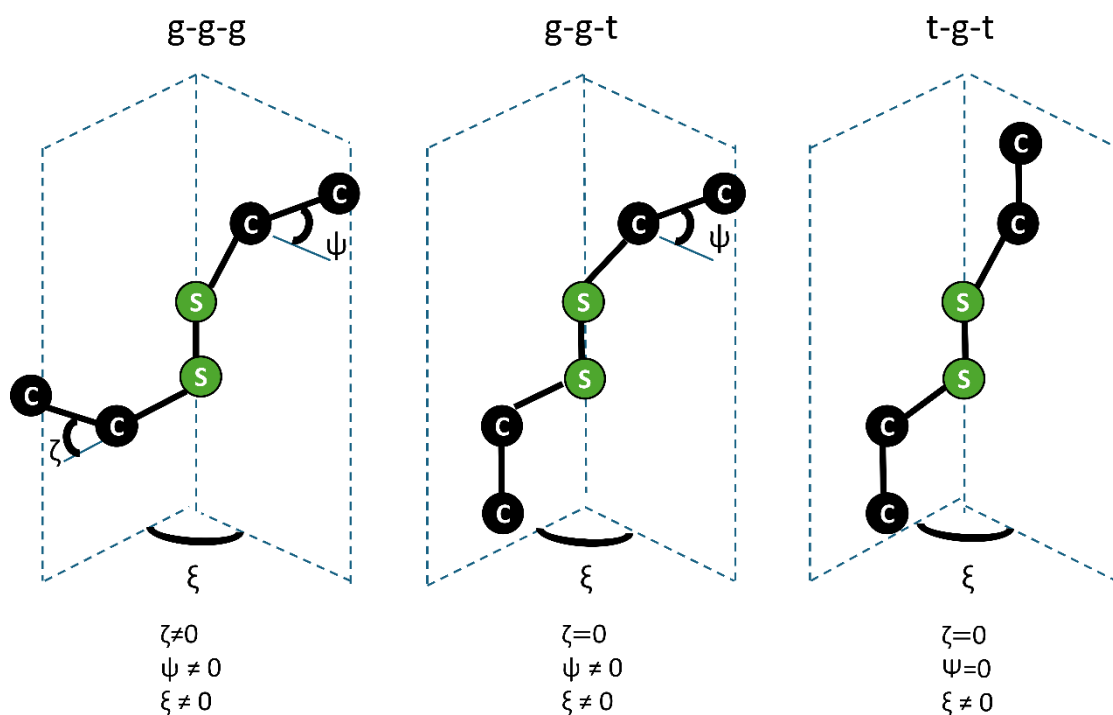
Φασματοσκοπικοί δείκτες

Δισουλφιδικοί δεσμοί

Οι δισουλφιδικοί δεσμοί αποτελούν δείκτη της δομικής σταθερότητας και μπορούν να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες αποδιοργάνωσης της κερατίνης στο πλαίσιο της φασματοσκοπίας Raman. Οι αλλοιώσεις τους εμπλέκονται στην παθολογία τόσο της ονυχομυκητίασης όσο και του σακχαρώδη διαβήτη. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί δεν είναι επίπεδοι αλλά έχουν διαφορετικές χωρικές διαμορφώσεις, οι οποίες επηρεάζουν την δονητική τους συμπεριφορά με αποτέλεσμα την ανίχνευση τους με φασματοσκοπία Raman. Κάθε διαμόρφωση αντιστοιχεί σε διαφορετική γωνιακή διάταξη των τριών διαδοχικών δεσμών C-S-S-C. (Εικόνα 14)

Οι διαμορφώσεις που παρατηρούνται είναι τρεις: (105)

- gauche-gauche-gauche
- gauche-gauche-trans
- trans-gauche-trans



Εικόνα 14: Διαμορφώσεις των δισουλφιδικών δεσμών.

Η διαμόρφωση *gauche-gauche-gauche* (*g-g-g*) αποτελεί την θερμοδυναμικά σταθερότερη και η παρουσία της κυριαρχεί στους υγιείς όνυχες, εμφανιζόμενη ως χαρακτηριστική κορυφή στην θέση $\sim 510\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος. Αντίθετα στις περιπτώσεις της ονυχομυκητίασης, η δομή της κερατίνης αλλοιώνεται, οδηγώντας στην εμφάνιση ή ενίσχυση λιγότερο σταθερών διαμορφώσεων, όπως η *gauche-gauche-trans* (*g-g-t*) ($\sim 525\text{ cm}^{-1}$) και η *trans-gauche-trans* (*t-g-t*) ($\sim 548\text{ cm}^{-1}$).⁽¹⁰⁶⁾ Οι διαμορφώσεις αυτές αποτελούν ένδειξη αποσταθεροποίησης και χαλάρωσης της κερατινικής δομής. Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί ότι διαφορετικά είδη μυκήτων, όπως οι *Candida spp.* και *T. rubrum*, προκαλούν χημικές και δομικές αλλοιώσεις στην κερατίνη, επηρεάζοντας τους S-S δεσμούς με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με το είδος του μύκητα.⁽¹⁰³⁾

Επιπλέον, η ένταση και το εμβαδόν των κορυφών που σχετίζονται με τους S-S δεσμούς μειώνονται σημαντικά στους προσβεβλημένους όνυχες ή όνυχες ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη. Σε μελέτες προσβεβλημένων ονύχων, καταγράφηκε μείωση της έντασης κορυφής κατά 55% και του εμβαδού κορυφής κατά 38%, υποδεικνύοντας την διάσπαση των S-S δεσμών και την επακόλουθη αποδιοργάνωση της κερατίνης.⁽¹⁰⁷⁾ Στους όνυχες διαβητικών ατόμων παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έντασης της κορυφής υποδηλώνοντας διαταραχή της κερατινικής δομής λόγω της υπεργλυκαιμίας.⁽¹⁰⁴⁾ Ο λόγος του εμβαδού των κορυφών S-S προς C-C δεσμούς προτείνεται επίσης, ως ποσοτικός βιοδείκτης, με σημαντικά χαμηλότερες τιμές σε προσβεβλημένα δείγματα συγκριτικά με υγιή, ενισχύοντας την διαγνωστική αξία της φασματοσκοπίας Raman.⁽¹⁰⁸⁾

Πεπτιδικοί δεσμοί

Οι πεπτιδικοί δεσμοί επιτρέπουν την παρακολούθηση μεταβολών στην δευτεροταγή δομή της κερατίνης και μπορούν να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες στην διάγνωση της ονυχομυκητίασης και του σακχαρώδη διαβήτη αλλά και στην αξιολόγηση της θεραπευτικής απόκρισης σε περιστατικά ονυχομυκητιασικής λοίμωξης. Οι κύριες ζώνες που σχετίζονται με τους αμιδικούς δεσμούς είναι:

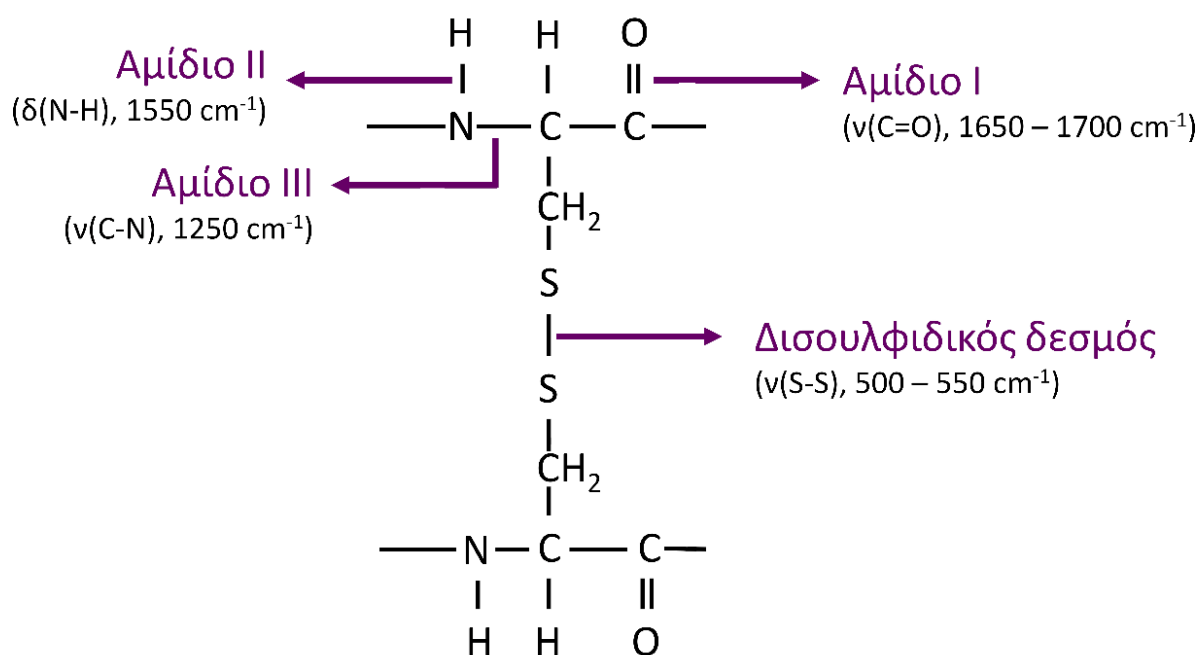
- Αμίδιο I ($\sim 1650\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$): περιλαμβάνει την δόνηση C=O που αντιστοιχεί στην διαμόρφωση της α -έλικας ($\sim 1652\text{ cm}^{-1}$) και της β -πτυχωτής επιφάνειας ($\sim 1670\text{ cm}^{-1}$)
- Αμίδιο II ($\sim 1450\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$): σχετίζεται με την δόνηση κάμψης του δεσμού -CH₂ και N-H
- Αμίδιο III ($\sim 1250\text{ cm}^{-1}$): αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης C-N και κάμψης -CH₂

Σε προσβεβλημένους όνυχες έχουν καταγραφεί σημαντικές μεταβολές στις ζώνες του αμίδιου I και III. Συγκεκριμένα, ο λόγος του εμβαδού της κορυφής της α -έλικας προς την β -πτυχωτή επιφάνεια ήταν σημαντικά μειωμένος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο των υγιών ονύχων, υποδηλώνοντας μετατροπή της δομής από α -έλικα σε β -πτυχωτή

επιφάνεια ή σε *random coils*. Η α -κερατίνη υπό φυσιολογικές συνθήκες εμφανίζει υψηλό βαθμό οργάνωσης με κυρίαρχη δευτεροταγή δομή την α -έλικα. Δεν παρουσιάζει περιοχές τύπου *random coil*, καθώς η σταθερότητα της δομής διασφαλίζεται μέσω εκτεταμένων ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου και δισουλφιδικών γεφυρών. Ωστόσο, υπό την επίδραση κερατινολυτικών ενζύμων που εκκρίνονται από παθογόνους μύκητες, παρατηρείται αποδιάταξη της οργανωμένης δομής και μερική μετάπτωση προς λιγότερο σταθερές και περισσότερο άμορφες διαμορφώσεις, όπως περιοχές τύπου *random coil* ή β -πτυχωτών φύλλων (β -sheets), υποδεικνύοντας μείωση της δομικής ακεραιότητας της πρωτεΐνης.(106)

Στους διαβητικούς ασθενείς, παρατηρήθηκε αύξηση του εμβαδού της φασματικής ζώνης που αποδίδεται στην α -έλικα και αντίστοιχη μείωση της ζώνης της β -πτυχωτής επιφάνειας. Η μεταβολή αυτή υποδηλώνει ανακατανομή της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, πιθανόν ως αποτέλεσμα αποδιοργάνωσης ή τροποποίησης τους λόγω υπεργλυκαιμικών συνθηκών ή γλυκοζυλίωσης. Η δομική αυτή αλλοίωση ενδέχεται να σχετίζεται με αυξημένη ευθραυστότητα και μειωμένη μηχανική αντοχή των ιστών, ιδίως σε κερατινοποιημένες δομές όπως τους όνυχες.(104)

Τέλος, σε όνυχες που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με laser Nd:YAG, καταγράφηκαν δομικές αλλοιώσεις στην κερατίνη. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έντασης και της επιφάνειας της χαρακτηριστικής ζώνης των δισουλφιδικών δεσμών, γεγονός που υποδεικνύει θερμική αποδιάταξη της κερατίνης. Επιπλέον, στην περιοχή του αμιδίου Ι, η ένταση της ζώνης της β -πτυχωτής επιφάνειας ($\sim 1673\text{ cm}^{-1}$) υπερίσχυσε της αντίστοιχης της α -έλικας ($\sim 1652\text{ cm}^{-1}$) μετά την θεραπεία, σε αντίθεση με τα αθεράπευτα δείγματα, όπου η α -έλικα κυριαρχούσε. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν θερμική αναδιάταξη και μερικής αναδιάταξης της δευτεροταγούς δομής της κερατίνης, ως πιθανό μηχανισμό δράσης της θεραπείας με laser στην αντιμετώπιση της ονυχομυκητίασης.(107)



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση της θέσης των δισουλφιδικών και αμιδικών δεσμών στην κερατίνη των ονύχων.

1.4 Τομογραφία οπτικής συνοχής

1.4.1 Βασικές αρχές

Η τομογραφία οπτικής συνοχής (Optical Coherence Tomography–OCT) είναι μια απεικονιστική τεχνική, που χρησιμοποιεί φως χαμηλής συνοχής για την λήψη τομογραφικών εικόνων μικροσκοπικών δομών σε διαφανή ή ημιδιαφανή δείγματα, όπως οι βιολογικοί ιστοί. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή της χαμηλής συνοχής συμβολομετρίας (low-coherence interferometry), κατά την οποία μια φωτεινή δέσμη διαχωρίζεται σε δύο σκέλη: το ένα ανακλάται από ένα σταθερό κάτοπτρο αναφοράς και το άλλο διεισδύει στο δείγμα. Τα ανακλώμενα σήματα από διαφορετικά βάθη του δείγματος συνδυάζονται (συμβάλλουν) με το σήμα αναφοράς, και το αποτέλεσμα της συμβολής ανιχνεύεται μόνο όταν η διαφορά οπτικής διαδρομής (optical path length) βρίσκεται εντός του μήκους συνοχής της φωτεινής πηγής. Η καταγραφή της έντασης του σήματος σε συνάρτηση με το βάθος οδηγεί στην δημιουργία (A-scan) ενώ η διαδοχική λήψη πολλών A-scan κατά μήκος της επιφάνειας του δείγματος συνθέτει μία δισδιάστατη εικόνα (B-scan). Η τρισδιάστατη απεικόνιση (3D volume) επιτυγχάνεται μέσω της απόκτησης πολλαπλών B-scan σε διαδοχικές θέσεις κατά μήκος του δείγματος, επιτρέποντας την ανακατασκευή του πλήρους όγκου του δείγματος.

Οι διαστάσεις και η ποιότητα της απεικόνισης που προκύπτει εξαρτώνται από παραμέτρους όπως η αξονική και η πλάγια ανάλυση, οι οποίες καθορίζονται από τα χαρακτηριστικά της φωτεινής πηγής και του οπτικού συστήματος, αντίστοιχα. Η αξονική ανάλυση (κατά το βάθος) εξαρτάται από το φασματικό εύρος της πηγής φωτός και σχετίζεται με το μήκος συνοχής όσο μεγαλύτερο το φασματικό εύρος, τόσο μικρότερο το μήκος συνοχής και άρα μεγαλύτερη η ανάλυση. Αντίθετα, η πλάγια ανάλυση (κατά μήκος της επιφάνειας του δείγματος) καθορίζεται από τα οπτικά χαρακτηριστικά του συστήματος, όπως το αριθμητικό άνοιγμα του φακού και η εστίαση της δέσμης.

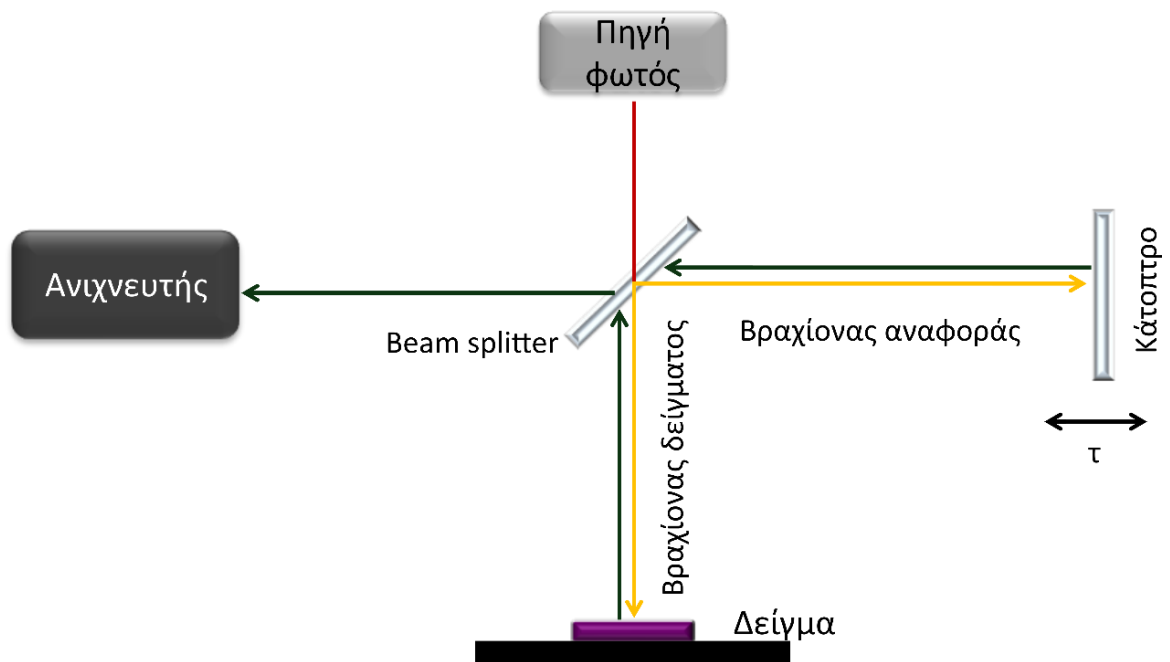
Πέρα από τις βασικές αρχές που καθορίζουν την ανάλυση της απεικόνισης, δηλαδή την ικανότητα του συστήματος να διακρίνει λεπτομέρειες στο χώρο, τόσο κατά το βάθος (αξονική ανάλυση) όσο και κατά μήκος της επιφάνειας (πλάγια ανάλυση), η συνολική ποιότητα της απεικόνισης επηρεάζεται και από φυσικά φαινόμενα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση του φωτός με τον ιστό. Παράλληλα, η ανάλυση εξαρτάται κυρίως από τα χαρακτηριστικά της φωτεινής πηγής και του οπτικού συστήματος, η ποιότητα της τελικής εικόνας περιλαμβάνει και άλλες παραμέτρους όπως το βάθος διείσδυσης, ο λόγος σήματος προς θόρυβο (SNR), η αντίθεση και η σαφήνεια των ορίων μεταξύ των μικροσκοπικών δομών. Αυτοί οι παράγοντες επηρεάζονται από φαινόμενα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση του φωτός με τον ιστό. Συγκεκριμένα, η σκέδαση που

προκαλείται από ανομοιογένειες στον δείκτη διάθλασης περιορίζει την διείσδυση και την κατευθυντικότητα του φωτός με κυρίαρχο φαινόμενο την ελαστική σκέδαση τύπου Mie, η οποία προκύπτει όταν οι σκεδαζόμενες δομές είναι συγκρίσιμες ή μεγαλύτερες από το μήκος κύματος του φωτός. Η απορρόφηση, κυρίως από το νερό, μειώνει την ένταση του σήματος σε μεγαλύτερα βάθη, ενώ η εξασθένηση του φωτός, ως αποτέλεσμα συνδυασμένης σκέδασης και απορρόφησης, οδηγεί σε εκθετική μείωση της έντασης του ανιχνευόμενου σήματος. Επιπλέον, η ποιότητα επηρεάζεται επίσης, από την ικανότητα του συστήματος να καταγράφει συμβολή μόνο όταν η διαφορά της οπτικής διαδρομής βρίσκεται εντός του μήκους συνοχής της πηγής. Αν αυτή η προϋπόθεση δεν ικανοποιείται, λόγω πολλαπλής σκέδασης ή διακύμανσης της φάσης μεταξύ των επιμέρους διαδρομών επηρεάζεται αρνητικά η ευκρίνεια και ο λόγος σήματος προς θόρυβο (SNR). Τέλος, το φαινόμενο της διασποράς, δηλαδή η διαφορετική ταχύτητα διάδοσης των φασματικών συνιστωσών της πηγής, προκαλεί χρονική επιμήκυνση του παλμού και μειώνει τη διακριτική ικανότητα σε βάθος, απαιτώντας διόρθωση μέσω ψηφιακής επεξεργασίας του σήματος.

1.4.2 Πειραματική διάταξη

Μια βασική διάταξη OCT αποτελείται από: μια πηγή φωτός, έναν ανιχνευτή και μία διάταξη συμβολομέτρου. Η πηγή φωτός είναι συνήθως μια ευρέως φάσματος συνεκτική πηγή, όπως superluminescent diode (SLD), ή μία σάρωσης φάσματος (swept-source), με μήκη κύματος συνήθως στην περιοχή των 800–1300 nm. Το φως από την πηγή διαχωρίζεται σε δύο οπτικούς βραχίονες μέσω διαιρετή δέσμης (beam splitter) ή οπτικού κυκλοφορητή (σε fiber-based συστήματα):

- Βραχίονας δείγματος (sample arm): Περιλαμβάνει οπτικά στοιχεία εστίασης και μηχανισμό πλευρικής σάρωσης (π.χ. γαλβανόμετρα ή MEMS καθρέφτες). Το φως διεισδύει στον ιστό και σκεδάζεται από δομές με διαφορετικό δείκτη διάθλασης
- Βραχίονας αναφοράς (reference arm): Περιλαμβάνει καθρέφτη σταθερής ή ρυθμιζόμενης θέσης. Η απόσταση του καθρέφτη καθορίζει την χρονική καθυστέρηση και επιτρέπει την επιλογή του βάθους από το οποίο προέρχεται το σήμα.
- Τα σήματα από τους δύο βραχίονες συνδυάζονται και οδηγούνται προς τον ανιχνευτή, όπου λαμβάνει χώρα η συμβολή. Η ανίχνευση του σήματος συνήθως πραγματοποιείται με μηχανική σάρωση της θέσης του καθρέφτη αναφοράς και ανιχνευτή μονής φωτονικής ευαισθησίας (Time-Domain OCT/TD-OCT) ή χρήση φασματογράφου (spectrometer) με CCD/CMOS, όπου η φασματική πληροφορία μετατρέπεται σε τομογραφική εικόνα με αντίστροφο μετασχηματισμό Fourier (Spectral-Domain OCT/SD-OCT).



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση μίας τυπικής διάταξης συστήματος τομογραφίας οπτικής συνοχής (TD-OCT ή SD-OCT) με χρήση συμβολόμετρου Michelson. Το φως της πηγής διαχωρίζεται από beam splitter και κατευθύνεται προς το κάτοπτρο αναφοράς και το δείγμα. Οι ανακλώμενες ακτίνες επανασυνδυάζονται και σήμα συμβολής ανιχνεύεται για την εξαγωγή της απεικόνισης του δείγματος.

Μετά την ανίχνευση του σήματος, είναι συχνά απαραίτητη η εφαρμογή μιας σειράς επεμβάσεων, με σκοπό είτε την ανάκτηση της πληροφορίας είτε την βελτίωση της ποιότητας της απεικόνισης. Η επεξεργασία δεν ακολουθεί αυστηρά προκαθορισμένη σειρά και δεν είναι όλες οι παρεμβάσεις υποχρεωτικές, αλλά εφαρμόζονται κατά περίπτωση, ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες του συστήματος OCT, τις ιδιότητες του δείγματος και τον τελικό στόχο (π.χ. οπτική αναπαράσταση, εξαγωγή ποσοτικών δεικτών, ενίσχυση αντίθεσης). Η διόρθωση διασποράς (dispersion compensation) αποτελεί συνήθως ένα από τα πρώτα στάδια, ιδίως στην χρήση SD-OCT, με στόχο την αποκατάσταση των φασικών σχέσεων μεταξύ των φασματικών συνιστωσών του σήματος. Κατά τη διάδοση του φωτός μέσα στους ιστούς, διαφορετικά μήκη κύματος καθυστερούν άνισα, οδηγώντας σε παραμόρφωση του παλμού και μείωση της αξονικής διακριτικής ικανότητας. Η διόρθωση αυτή πραγματοποιείται υπολογιστικά, αντιστρέφοντας την φασική παραμόρφωση που έχει προκληθεί από τη διασπορά. Παράλληλα, μπορεί να εφαρμοστεί κανονικοποίηση (normalization), ώστε να εξαλειφθούν ανεπιθύμητες μεταβολές έντασης που οφείλονται στις μεταβολές της απόστασης από τον φακό, της ενέργειας της πηγής ή της γωνίας πρόσπτωσης. Για τη σύγκριση περιοχών εντός και μεταξύ δειγμάτων απαιτείται η κανονικοποίηση του σήματος. Αυτό επιτυγχάνεται με στατιστικές

ή εμπειρικές μεθόδους, όπως η λογαριθμική συμπίεση ή η διαίρεση με τη μέγιστη τιμή. Επίσης, στην τεχνική SD-OCT, η μετατροπή του σήματος από το φασματικό στο χωρικό πεδίο επιτυγχάνεται με μετασχηματισμό Fourier (FFT), που επιτρέπει την ανακατασκευή του προφίλ έντασης ως προς το βάθος (A-scan). Τα δεδομένα βάθους που προκύπτουν από πολλαπλά A-scans συνθέτουν γραμμικές τομές (B-scans), ενώ πολλαπλοί B-scans μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανακατασκευή τρισδιάστατων απεικονίσεων του ιστού (volume rendering). Συχνά, είναι απαραίτητη η αποθορυβοποίηση της εικόνας, λόγω της παρουσίας του χαρακτηριστικού speckle noise. Το speckle noise οφείλεται στην συμβολή φωτονίων που οπισθοσκεδάζονται από δομές μικρότερες του μήκους κύματος (κυτταρικά οργανίδια, μεμβράνες) και εκδηλώνεται ως κοκκώδης υφή με φωτεινές και σκοτεινές κηλίδες. Το μέγεθος και η ένταση του speckle εξαρτώνται από το numerical aperture (NA) του συστήματος και το εύρος ζώνης της πηγής. Μεγαλύτερο NA σημαίνει μικρότερες κηλίδες, άρα και πιο λεπτομερή εικόνα, αλλά ταυτόχρονα μικρότερο βάθος πεδίου. Για την μείωση του speckle χρησιμοποιούνται χωρικά ή φασματικά φίλτρα όπως median, Gaussian, adaptive και wavelet. Σημαντικό είναι να αναφερθούν τα μοντέλα σκέδασης που εφαρμόζονται και οι κατάλληλες γωνιακές διορθώσεις στα δεδομένα, μέτρα που λαμβάνονται για την αντιμετώπιση της ανομοιομόρφης σκέδασης. Η σκέδαση του φωτός εξαρτάται από το μέγεθος των σκεδαστών (κύτταρα και οργανίδια) σε σχέση με το μήκος κύματος και την γωνία πρόσπτωσης του φωτός. Αυτή η εξάρτηση περιγράφεται μαθηματικά μέσω της συνάρτησης σκέδασης $\rho(\theta)$ και του παράγοντα ανισοτροπίας g , όπου όταν είναι μηδενική, η σκέδαση είναι ισοτροπική (το φως διασκορπίζεται εξίσου προς όλες τις γωνίες), και όταν είναι μεγαλύτερη του μηδενός, κυριαρχεί η σκέδαση προς τα εμπρός (forward scattering). Σε μέσα με πολύ μεγάλο g , όπως το δέρμα ($g \sim 0.9$), (109) μόνο ένα μικρό μέρος του φωτός επιστρέφει στον ανιχνευτή, γεγονός που επηρεάζει την ένταση και την ερμηνεία του σήματος.

1.4.3 Περιγραφή του φαινομένου

Η λειτουργία της OCT βασίζεται στην συμβολή ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων που έχουν διανύσει διαφορετικές οπτικές διαδρομές. Το φως που χρησιμοποιείται έχει χαμηλή χρονική συνοχή, δηλαδή μικρό μήκος συνοχής, ώστε η συμβολή να εμφανίζεται μόνο όταν η διαφορά οπτικής διαδρομής είναι μικρότερη από το μήκος συνοχής L_c (coherence length). (110,111)

- Ηλεκτρομαγνητικό κύμα και συμβολή

Το ηλεκτρικό πεδίο ενός μονοχρωματικού κύματος (σταθερής συχνότητας) που διαδίδεται μπορεί να περιγραφεί ως:

$$E(t) = E_0 \cos(\omega t + \varphi)$$

όπου E_0 το πλάτος, ω η κυκλική συχνότητα και φ η φάση.

Για πηγές ευρέος φάσματος, όπως αυτές που χρησιμοποιούνται στην OCT, το συνολικό πεδίο είναι το άθροισμα όλων των συχνοτήτων που συνεισφέρουν στο ηλεκτρικό πεδίο:

$$E(t) = \int A(\omega) \cos(\omega t + \varphi(\omega)) d\omega$$

Η συμβολή λαμβάνει χώρα μεταξύ δύο δεσμών: μία που ανακλάται από το δείγμα (E_s) και μία από τον βραχίονα αναφοράς (E_r):

$$E_r(t) = \sqrt{I_r} \cos(\omega t)$$

$$E_s(t) = \sqrt{I_s} \cos(\omega t + \Delta\varphi)$$

Η ανιχνευόμενη ένταση είναι:

$$I(t) = \langle |E_r(t) + E_s(t)|^2 \rangle = I_r + I_s + 2\sqrt{I_r I_s} \gamma(\tau) \cos(\Delta\omega t + \Delta\varphi)$$

όπου $\gamma(\tau)$ είναι η συνάρτηση συνοχής, που εξαρτάται από το φάσμα της πηγής και περιγράφει πόσο «μοιάζουν» τα κύματα με χρονική καθυστέρηση τ . (112,113)

Η συμβολή είναι σημαντική μόνο όταν $\tau \leq L_c/c$ δηλαδή όταν οι διαδρομές αναφοράς και δείγματος διαφέρουν λιγότερο από το μήκος συνοχής L_c .

- Μήκος συνοχής και ανάλυση βάθους

Το μήκος συνοχής μιας πηγής ευρέος φάσματος δίνεται από:

$$L_c = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda}$$

όπου λ_0 είναι το κεντρικό μήκος κύματος και $\Delta\lambda$ το φασματικό εύρος της πηγής (σε nm).(111)

Όσο μικρότερο το $\Delta\lambda$, τόσο μεγαλύτερο το L_c , με αποτέλεσμα την μείωση της διακριτικής ικανότητας βάθους. Για υψηλή αξονική ανάλυση απαιτείται ευρέως φάσματος πηγή.

1.4.4 Οπτικές ιδιότητες

Κατά την διάδοση της ακτινοβολίας εντός βιολογικών ιστών, το φως υφίσταται εξασθένηση λόγω φαινομένων σκέδασης και απορρόφησης. Τα φαινόμενα αυτά επηρεάζουν τόσο την ένταση όσο και τη μορφή του επιστρεφόμενου σήματος και περιορίζουν το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας. Η εξασθένηση περιγράφεται από δύο βασικούς συντελεστές:

- Ο συντελεστής απορρόφησης μ_a , που εκφράζει την πιθανότητα απώλειας φωτός μέσω απορρόφησης ανά μονάδα μήκους
- Ο συντελεστής σκέδασης μ_s , που εκφράζει την πιθανότητα αλλαγής της κατεύθυνσης διάδοσης του φωτός λόγω μικροσκοπικών ανωμαλιών στον δείκτη διάθλασης του ιστού. (109)

Ο συνολικός συντελεστής εξασθένησης είναι το άθροισμα:

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s$$

και η ένταση του σήματος μειώνεται εκθετικά συναρτήσει του βάθους z :

$$I(z) \propto e^{-\mu_t z}$$

Συντελεστής απορρόφησης

Ο συντελεστής απορρόφησης εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός και το μέσο-υλικό.

Σε ομοιογενή υλικά, ο συντελεστής απορρόφησης δίνεται από την σχέση:

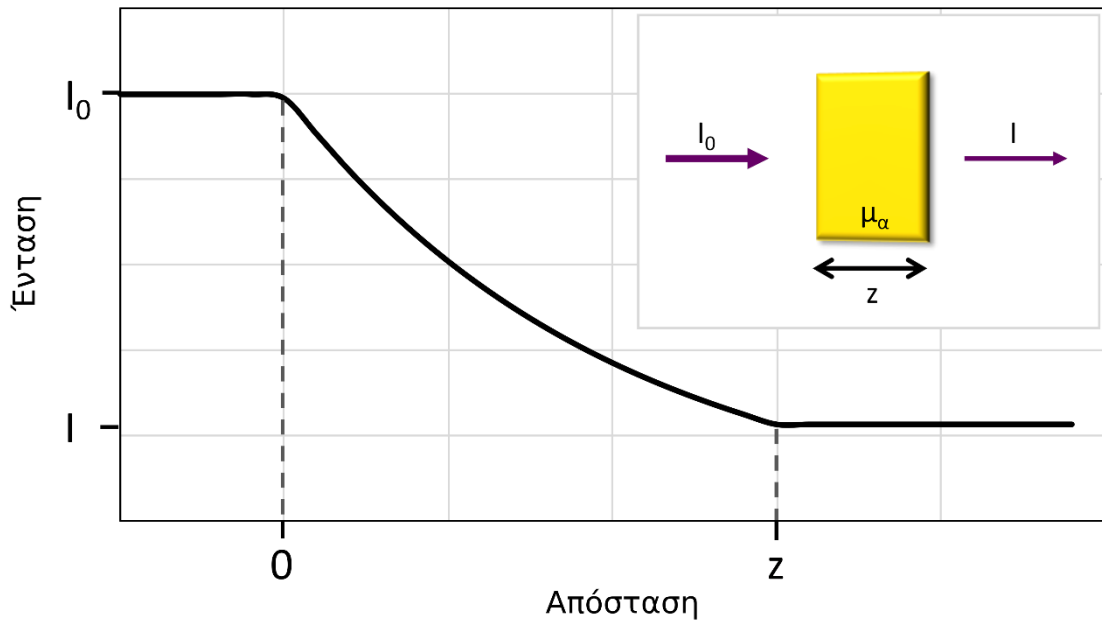
$$\mu_a = \frac{4\pi k}{\lambda}$$

όπου λ είναι το μήκος κύματος του φωτός και k το φανταστικό μέρος του συνολικού δείκτη διάθλασης ενός μέσου: $n = n' + ik$. Για τον συνολικό δείκτη διάθλασης, το πραγματικό μέρος n' περιγράφει την εναπόθεση ενέργειας στο μέσο, ενώ το φανταστικό μέρος k περιγράφει την απώλεια ενέργειας λόγω αλληλεπίδρασης του ηλεκτρομαγνητικού κύματος με τα άτομα του μέσου.

Η απώλεια του φωτός περιγράφεται από τον νόμο Beer-Lambert:

$$I(z) = I_0 e^{-\mu_a z}$$

όπου I_0 η αρχική ένταση στην επιφάνεια του δείγματος και z η απόσταση διάδοσης, ενώ μ_a ο συντελεστής απορρόφησης.



Εικόνα 17: Απεικόνιση του νόμου Beer-Lambert: Η ένταση του φωτός μειώνεται εκθετικά καθώς διαπερνά ένα απορροφητικό μέσο με συντελεστή απορρόφησης μ_α και πάχος z .

Σε ανομοιογενή υλικά, όπως οι βιολογικοί ιστοί, στους οποίους συμμετέχουν διαφορετικά μόρια με διακριτά φάσματα απορρόφησης, η εκτίμηση του συντελεστή απορρόφησης πραγματοποιείται με την εξίσωση:

$$\mu_\alpha = \ln(10) \varepsilon_{\chi,\lambda} C_\chi$$

όπου $\varepsilon_{\chi,\lambda}$ είναι ο μοριακός συντελεστής εξασθένισης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και C_χ η συγκέντρωση του απορροφητή.

Στους ανθρώπινους ιστούς, ο κύριος απορροφητής του φωτός είναι το νερό, που απορροφά κυρίως στο υπέρυθρο φάσμα.

Στην περιοχή του κοντινού υπέρυθρου (700–1400 nm), η απορρόφηση μειώνεται και κυριαρχεί η σκέδαση, με αποτέλεσμα την απόδοση του μηχανισμού στην συνολική εξασθένιση του φωτός στους ιστούς. Αντιθέτως:

- Για μήκη κύματος < 700 nm, η απορρόφηση είναι σημαντική, κυρίως λόγω της μελανίνης και της αιμοσφαιρίνης,

- Για μήκη κύματος >1400 nm, η απορρόφηση από το νερό καθίσταται κυρίαρχη.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιοχή μεταξύ 630 και 1300 nm, γνωστή ως οπτικό παράθυρο ιστού (*optical window*), όπου η απορρόφηση είναι ελάχιστη και το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας μεγιστοποιείται. Η κατανόηση της κατανομής της απορρόφησης στα διάφορα μήκη κύματος είναι κρίσιμη για εφαρμογές όπως η απεικόνιση με βάση την σκεδαζόμενη ακτινοβολία.

Συντελεστής σκέδασης

Ο συντελεστής σκέδασης περιγράφεται από τον τύπο:

$$\mu_s = C_s \rho_s$$

όπου ρ_s είναι η πυκνότητα του υλικού και $C_s = A_s \delta_s$ η ενεργός διατομή σκέδασης. Στην εξίσωση της ενεργούς διατομής: A_s είναι το εμβαδόν διατομής του υλικού και δ_s η απόδοση της σκέδασης.

Σε υλικά με έντονη εμπρόσθια σκέδαση, πέραν του απλού μ_s , συχνά χρησιμοποιείται ο ανηγμένος συντελεστής σκέδασης:

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g)$$

όπου g είναι ο παράγοντας ανισοτροπίας, δηλαδή ο μέσος όρος του συνημιτόνου της γωνίας σκέδασης. Στους περισσότερους ιστούς η τιμή του g κυμαίνεται σε 0.8-0.95, υποδηλώνοντας έντονη εμπρόσθια σκέδαση και καθιστώντας το μ'_s σημαντικά μικρότερο από το μ_s . (109)

1.4.5 Σχηματισμός εικόνας–Απεικόνιση OCT

Η απεικόνιση στην OCT βασίζεται στην μέτρηση της έντασης του ανακλώμενου φωτός από μικροσκοπικές δομές του δείγματος σε διαφορετικά βάθη. Η διαδικασία ξεκινά με την ανίχνευση του σήματος συμβολής μεταξύ της δέσμης αναφοράς και της δέσμης που ανακλάται από το δείγμα. Η ένταση του σήματος καταγράφεται ως συνάρτηση της χρονικής καθυστέρησης (ή ισοδύναμα, του βάθους), οδηγώντας στην δημιουργία της λεγόμενης γραμμικής απεικόνισης κατά το βάθος ή A-scan.

- A-Scan (τομή κατά βάθος)

Ένα A-scan αντιστοιχεί σε μια καταγραφή της έντασης του ανακλώμενου σήματος ως προς το βάθος z σε μία συγκεκριμένη εγκάρσια θέση στην επιφάνεια του δείγματος. Περιγράφεται μαθηματικά από την συσχέτιση του πεδίου αναφοράς $E_r(t)$ με το πεδίο σήματος $E_s(t-\tau(z))$:

$$I(z) \propto \int E_r^*(t) E_s(t - \tau(z)) dt$$

Η καθυστέρηση $\tau(z)$ σχετίζεται με το βάθος σύμφωνα με τη σχέση:

$$\tau(z) = \frac{2z}{nc}$$

όπου n είναι ο δείκτης διάθλασης του δείγματος και c η ταχύτητα του φωτός στο κενό. Κάθε κορυφή στο A-scan αντιστοιχεί σε μεταβολή του δείκτη διάθλασης, δηλαδή σε επιφάνεια ή όριο μεταξύ διαφορετικών ιστών.

- B-Scan (δισδιάστατη τομή)

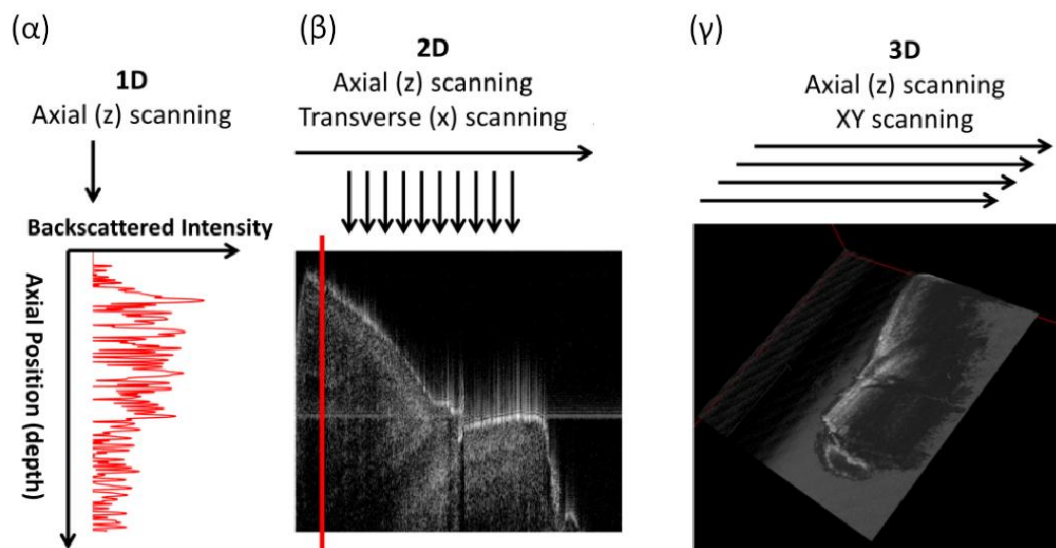
Πολλαπλά A-scans συλλέγονται καθώς η δέσμη σαρώνει πλευρικά το δείγμα (συνήθως κατά τον άξονα x), σχηματίζοντας ένα δισδιάστατο γράφημα ανακλαστικότητας στο επίπεδο xz , γνωστό ως B-scan. Ο άξονας z αντιστοιχεί στο βάθος, ενώ ο άξονας x στην εγκάρσια θέση της δέσμης:

$$B(x, z) = \{A_1(z)A_2(z), \dots, A_n(z)\}$$

Η τελική απεικόνιση εμφανίζει περιοχές διαφορετικής φωτεινότητας: οι φωτεινότερες περιοχές υποδηλώνουν υψηλή ανακλαστικότητα (π.χ. όρια ιστών), ενώ οι σκοτεινότερες υποδεικνύουν χαμηλή ανακλαστικότητα ή εξασθένηση του φωτός λόγω σκέδασης και απορρόφησης σε μεγαλύτερα βάθη.

- C-scan ή 3D απεικόνιση (volumetric imaging)

Με την προσθήκη σάρωσης και κατά τον τρίτο άξονα y , καταγράφονται διαδοχικά B-scans σε παρακείμενες τομές. Αυτό επιτρέπει την τρισδιάστατη ανακατασκευή του δείγματος, γνωστή ως C-scan ή volumetric OCT. Το αποτέλεσμα είναι ένας πλήρης όγκος δεδομένων που αναπαριστά την κατανομή ανακλαστικότητας εντός του δείγματος στους τρεις άξονες (x, y, z).



Εικόνα 18: Διάγραμμα απεικόνισης του σχηματισμού τομογραφικής εικόνας OCT σε υγιές όνυχα και άκρο δακτύλου. (α) Αξονική σάρωση (A-scan), (β) δισδιάστατη σάρωση (B-scan) και (γ) τρισδιάστατη/ογκομετρική σάρωση.(114,115)

- Απεικονιστική ερμηνεία

Η απεικόνιση που προκύπτει μεταφράζει την ένταση της ανακλώμενης ακτινοβολίας σε επίπεδο φωτεινότητας pixel στην τελική εικόνα. Οι μεταβολές στον δείκτη διάθλασης οδηγούν σε ανακλαστικά όρια που γίνονται ορατά στην εικόνα. Η ποιότητα της απεικόνισης, η αντίθεση και η διακριτική ικανότητα εξαρτώνται από την ένταση του σήματος, την εξασθένηση λόγω σκέδασης/απορρόφησης, καθώς και από χαρακτηριστικά του συστήματος OCT (μήκος κύματος, φασματικό εύρος, εστίαση).

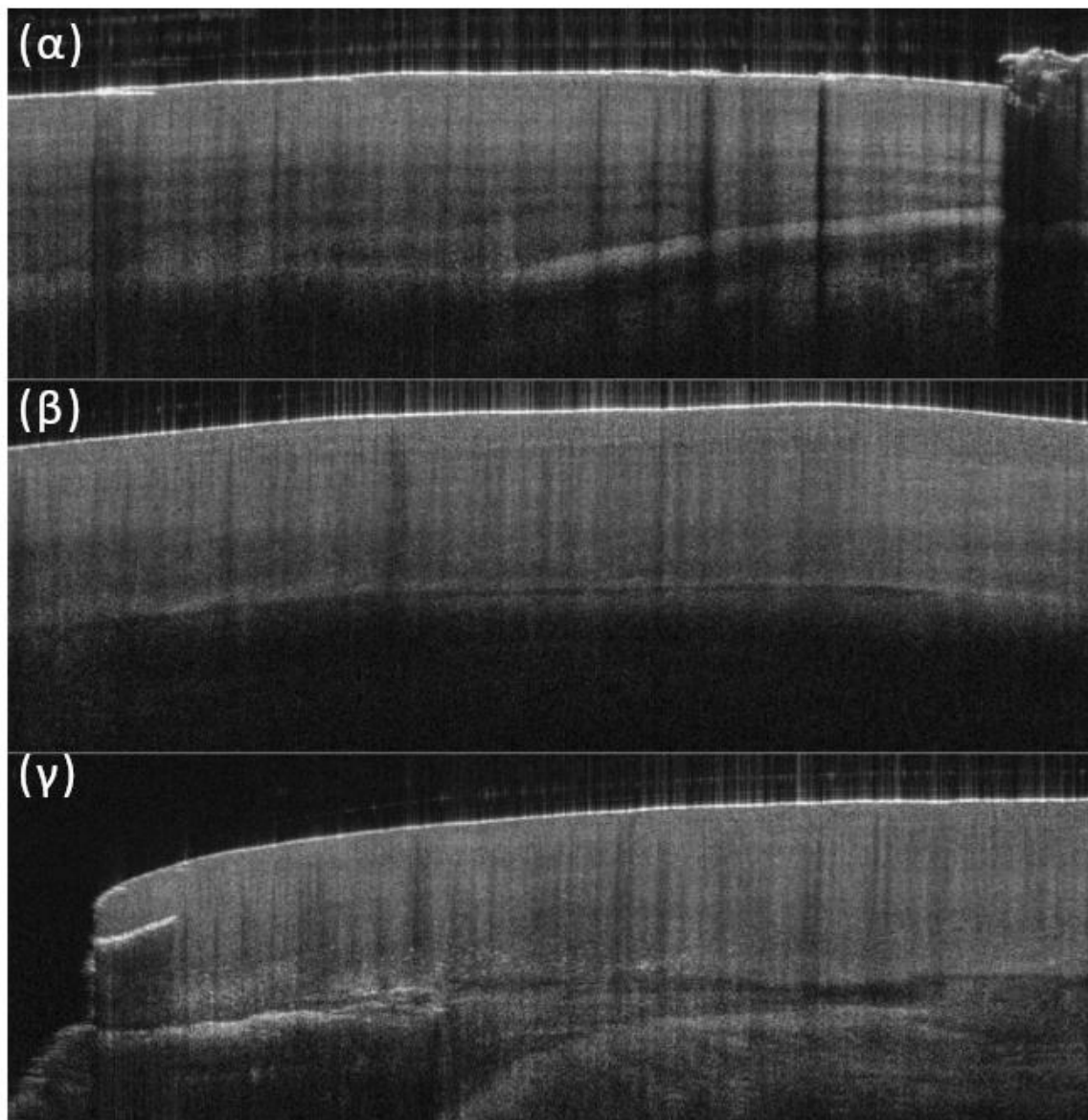
1.4.6 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί

Η τομογραφία οπτικής συνοχής έχει καθιερωθεί ως κατάλληλη τεχνική σε βιοϊατρικές εφαρμογές, κυρίως λόγω της ικανότητάς της να προσφέρει εν τω βάθει απεικόνιση μικροσκοπικών δομών με υψηλή διακριτική ικανότητα. Η τεχνική επιτρέπει την μη-καταστρεπτική διερεύνηση της εσωτερικής αρχιτεκτονικής των ιστών με ακρίβεια μικρομέτρων, χωρίς την ανάγκη παρασκευής ή επεμβατικών διαδικασιών. Επιπλέον, η απεικόνιση πραγματοποιείται σε πραγματικό χρόνο, γεγονός που καθιστά την OCT ιδιαίτερα χρήσιμη για κλινική εφαρμογή. Παρόλα αυτά, όπως κάθε τεχνική, χαρακτηρίζεται και από ορισμένους περιορισμούς. Σε έντονα σκεδαστικούς ιστούς, η πολλαπλή σκέδαση μειώνει την αντίθεση και την ακρίβεια εντοπισμού, ενώ το σήμα εξασθενεί στα ανώτερα στρώματα αυτών. Επίσης, η δημιουργία της απεικόνισης βασίζεται σε πολύπλοκη επεξεργασία (μετασχηματισμοί Fourier, διόρθωση διασποράς), που μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα της σε πραγματικό χρόνο

1.4.7 Όνυχες

Η OCT αποτελεί μία καινοτόμο, μη-επεμβατική απεικονιστική τεχνική, με αυξανόμενη εφαρμογή στη μελέτη της μορφολογίας των ονύχων και τη διάγνωση παθολογιών, όπως η ονυχομυκητίαση. Η OCT προσφέρει τη δυνατότητα άμεσης, *in vivo* απεικόνισης με υψηλή διακριτική ικανότητα (έως 10 μm), χωρίς την ανάγκη αφαίρεσης της ονυχιάς πλάκας ή δειγματοληψίας ιστού, καθιστώντας την ιδανική τόσο για έγκαιρη διάγνωση όσο και για παρακολούθηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης. (116–119) Σε σύγκριση με καθιερωμένες μεθόδους όπως η μυκητιασική καλλιέργεια και η άμεση μικροσκόπηση, που εμφανίζουν ποσοστά ψευδώς αρνητικών (περίπου 40%), η OCT παρέχει πραγματικού χρόνου απεικόνιση, βελτιώνοντας την διαγνωστική ακρίβεια.(117)

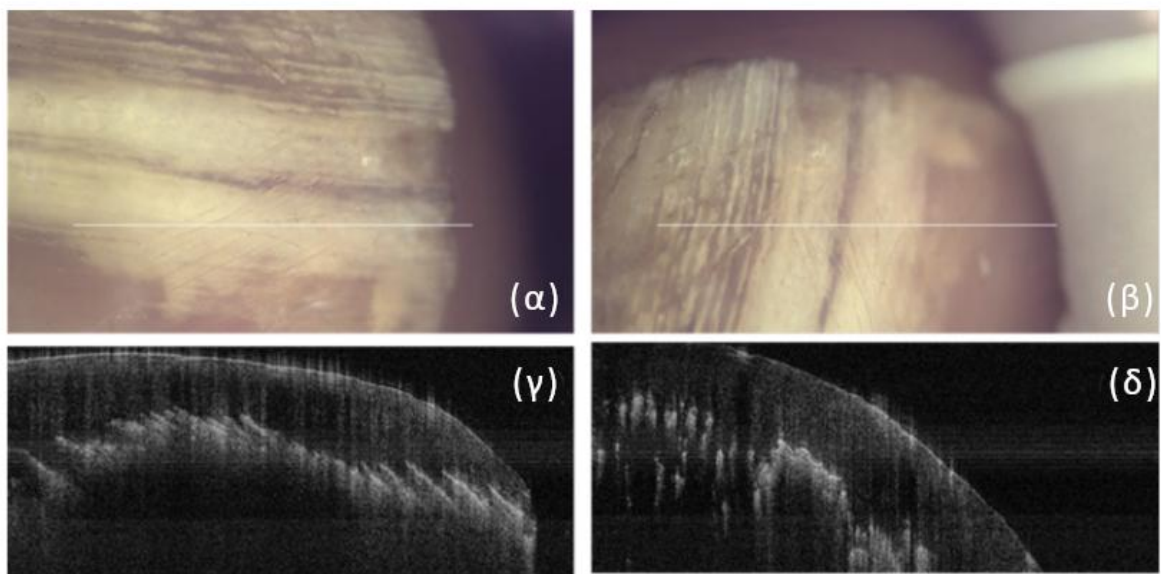
Στην απεικόνιση OCT, ένας φυσιολογικός όνυχας εμφανίζεται ως ομοιόμορφη, πολυστρωματική δομή με σταδιακή μείωση της ανακλαστικότητας σε βάθος, γεγονός που υποδεικνύει την διαφάνεια και την φυσιολογική δομή της πλάκας. Ο διαχωρισμός της ονυχιάς πλάκας από το υπονύχιο(118) και την εγγύς ονυχαία πτυχή(120) είναι διακριτός ενώ το μέσο πάχος υπολογίζεται από 0.45 mm έως 0.65 mm ανάλογα με την ανατομική περιοχή (δάχτυλα χεριών ή ποδιών).(119)



Εικόνα 19: Εγκάρσιες τομές OCT υγιούς όνυχα (α: Άπω, β: μέσο και γ: εγγύς τμήμα). Οι εικόνες παρουσιάζουν ένα λεπτό επιφανειακό σήμα εισόδου και ομοιογενή ονυχαία πλάκα, με μερικώς ορατή την κοίτη. Το άπω άκρο (α) εμφανίζει υπερανακλαστική γραμμή και αυξημένη σκέδαση στο υπονύχιο, ενώ ο μηνίσκος (γ) απεικονίζεται ως μια ελαφρώς υπερανακλαστική ταινία.

Η ονυχομυκητίαση εμφανίζεται ως επιμήκεις υπερανακλαστικές γραμμές εντός της ονυχαίας πλάκας, που αντιστοιχούν σε σήραγγες υψηλής σκέδασης και περιβάλλονται από περιοχές σχετικά χαμηλής σκέδασης. (121,122) Οι δομές αυτές αντιστοιχούν στην παρουσία των μυκητιασικών υφών, οι οποίες περιέχουν χιτίνη και ανακλούν εντονότερα την δέσμη φωτός της OCT σε σύγκριση με τα υπόλοιπα συστατικά των ονύχων. (Εικόνα 20) Επιπλέον, παρατηρείται ανομοιογενής στρωματοποίηση, (117,122) απότομη μετάβαση μεταξύ ονυχαίας πλάκας και κοίτης, και αύξηση πάχους έως 70%. (117) Υπάρχουν επίσης,

σκιές και περιοχές έντονης ανακλαστικότητας λόγω της αυξημένης επιφανειακής τραχύτητας των ονύχων.(116,118) Η OCT μπορεί επίσης να εντοπίσει ειδικές μορφές ονυχομυκητιάσης που επηρεάζουν την ανταπόκριση στην θεραπεία, όπως τα δερματοφυτώματα, τα οποία παρουσιάζονται ως εντοπισμένες, ομοιογενείς υπερανακλαστικές μάζες στην ανομοιογενή ονυχαία πλάκα σε βάθος 0.55-0.98 mm.(123) Ωστόσο, η τεχνική περιορίζεται στην διάκριση μεταξύ μυκητιασικών δομών, υφές ή σπόρια, και παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα ή άλλες ανωμαλίες της πλάκας που προκαλούν «θόρυβο» και αλλοιώνουν την απεικόνιση.(118)



Εικόνα 20: Εικόνες και απεικονίσεις OCT ονύχων προσβεβλημένων από *T. rubrum* (η ταυτοποίηση επιβεβαιώθηκε με καλλιέργεια και άμεση μικροσκόπηση ΚΟΗ). Η λευκή γραμμή (μήκους 9 mm) στην κλινική εικόνα (α,β) υποδεικνύει το κάθετο επίπεδο στο οποίο ελήφθη η απεικόνιση OCT (γ, δ). Πολλαπλές υπερανακλαστικές, ασαφώς ορισμένες, νηματοειδείς γραμμές φαίνεται να προέρχονται από το υπονύχιο και να κατευθύνονται προς την ονυχαία πλάκα υπό γωνία σε σχέση με την επιφάνεια του όνυχος. Οι εικόνες λήφθηκαν με τη συσκευή NITID OCT (DermaLumics, Μαδρίτη, Ισπανία).(115)

1.5 Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η *ex vivo* μελέτη της μοριακής σύστασης και της μικρομορφολογίας της ονυχαίας πλάκας υγιών και παθολογικών ονύχων, με την χρήση φασματοσκοπίας Raman και τομογραφίας οπτικής συνοχής (OCT). Η μελέτη επικεντρώθηκε στην διάγνωση της ονυχομυκητίασης, με ιδιαίτερη έμφαση στην εκδήλωσή της σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Πέραν του βασικού στόχου που ήταν η διερεύνηση της άμεσης και μη-επεμβατικής διάγνωσης της ονυχομυκητίασης διερευνήθηκε, μέσω *ex vivo* πειραματικού μοντέλου, η δυνατότητα φασματοσκοπικής ανίχνευσης τροποποιήσεων στην γλυκοζυλίωση της ονυχαίας πλάκας. Αξιολογήθηκε κατά πόσο τέτοιες αλλοιώσεις, σχετιζόμενες με το μεταβολικό προφίλ ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη, ενδέχεται να επηρεάζουν την ευαισθησία στην ανάπτυξη ονυχομυκητίασης σε μοριακό επίπεδο.

2 Ειδικό μέρος: Υλικά και μέθοδοι

2.1 Συλλογή και ταξινόμηση δειγμάτων

Το πρωτόκολλο μελέτης περιλάμβανε τη συλλογή δειγμάτων ονύχων από συνολικά 55 εθελοντές. Η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατόπιν έγγραφης, ενημερωμένης συγκατάθεσης για τη χρήση του βιολογικού υλικού στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης. Τα δείγματα προήλθαν είτε από ασθενείς της Κλινικής Δερματικών και Αφροδισίων Νόσων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων είτε από υγιείς εθελοντές που πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης. Το πρωτόκολλο εργασίας εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο και την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Αριθμός έγκρισης: 3/22-2-2017(θ.15)).

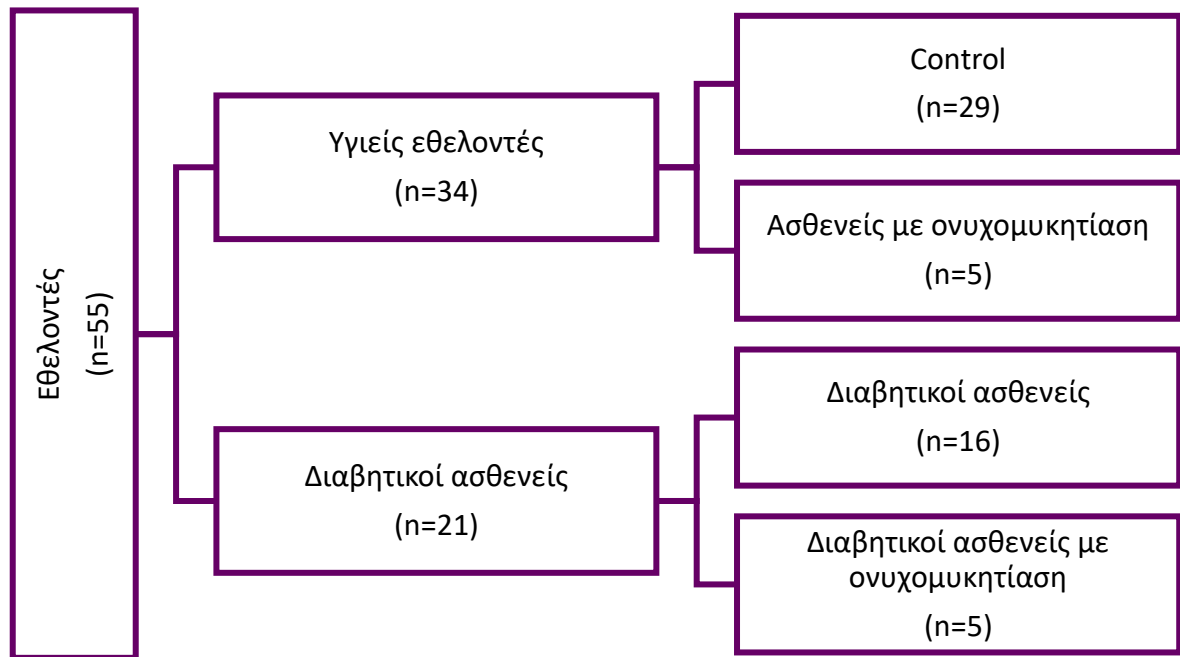
Ο χαρακτηρισμός των ονύχων ως προς την προέλευση τους (από υγιή ή διαβητικά άτομα) βασίστηκε στα αποτελέσματα της εξέτασης των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα κατά τη διάρκεια των τελευταίων 2-3 μηνών (HbA1c). Στα διαβητικά άτομα, τα επίπεδα της γλυκόζης κυμαίνονταν από 6.5% έως 11%.

Η διαδικασία ταξινόμησης των δειγμάτων παρουσιάζεται στην Εικόνα 21. Από τους 55 εθελοντές, 34 καταγράφηκαν ως υγιείς, ενώ οι υπόλοιποι 21 ως διαβητικοί ασθενείς. Κύριος στόχος της διατριβής ήταν η διάγνωση ονυχομυκητίασης σε διαβητικούς ασθενείς, έτσι μετά την συλλογή και την ταξινόμηση τους, τυχαία τμήματα από κάθε όνυχα υποβλήθηκαν σε μικροσκοπική εξέταση και καλλιέργεια, με σκοπό την ταξινόμησή τους ως πάσχοντα ή μη-πάσχοντα από ονυχομυκητίαση. Οι υγιείς εθελοντές υποδιαιρέθηκαν σε δύο υποομάδες: 29 άτομα χωρίς καμία σχετική πάθηση (control) και 5 άτομα με διάγνωση ονυχομυκητίασης, προσβεβλημένα από *Trichophyton spp.* (*Trichophyton rubrum*). Αντίστοιχα, οι διαβητικοί ασθενείς χωρίστηκαν σε 16 άτομα χωρίς ονυχομυκητίαση και 5 άτομα που έπασχαν από την εν λόγω λοίμωξη και είχαν προσβληθεί από *Trichophyton spp.* (*T. rubrum* και *T. interdigitale*) και *Penicillium spp.*

Άρα, οι όνυχες ταξινομήθηκαν στις εξής κατηγορίες:

- (α) Control
- (β) Προσβεβλημένοι από *Trichophyton spp.* (*Trichophyton rubrum*)
- (γ) Πάσχοντες από σακχαρώδη διαβήτη
- (δ) Πάσχοντες από σακχαρώδη διαβήτη και ονυχομυκητίαση (*Trichophyton spp.* και *Penicillium spp.*)

Κάθε κατηγορία δειγμάτων απεικονίστηκε με διαφορετικό χρώμα στην ενότητα Αποτελέσματα-Συζήτηση: μπλε (υγιείς), πορτοκαλί (ονυχομυκητίαση), ροζ (σακχαρώδης διαβήτης), και πράσινο (σακχαρώδης διαβήτης με ονυχομυκητίαση).



Εικόνα 21: Απεικόνιση διαδικασίας ταξινόμησης δειγμάτων.

2.2 Πειραματικές μετρήσεις

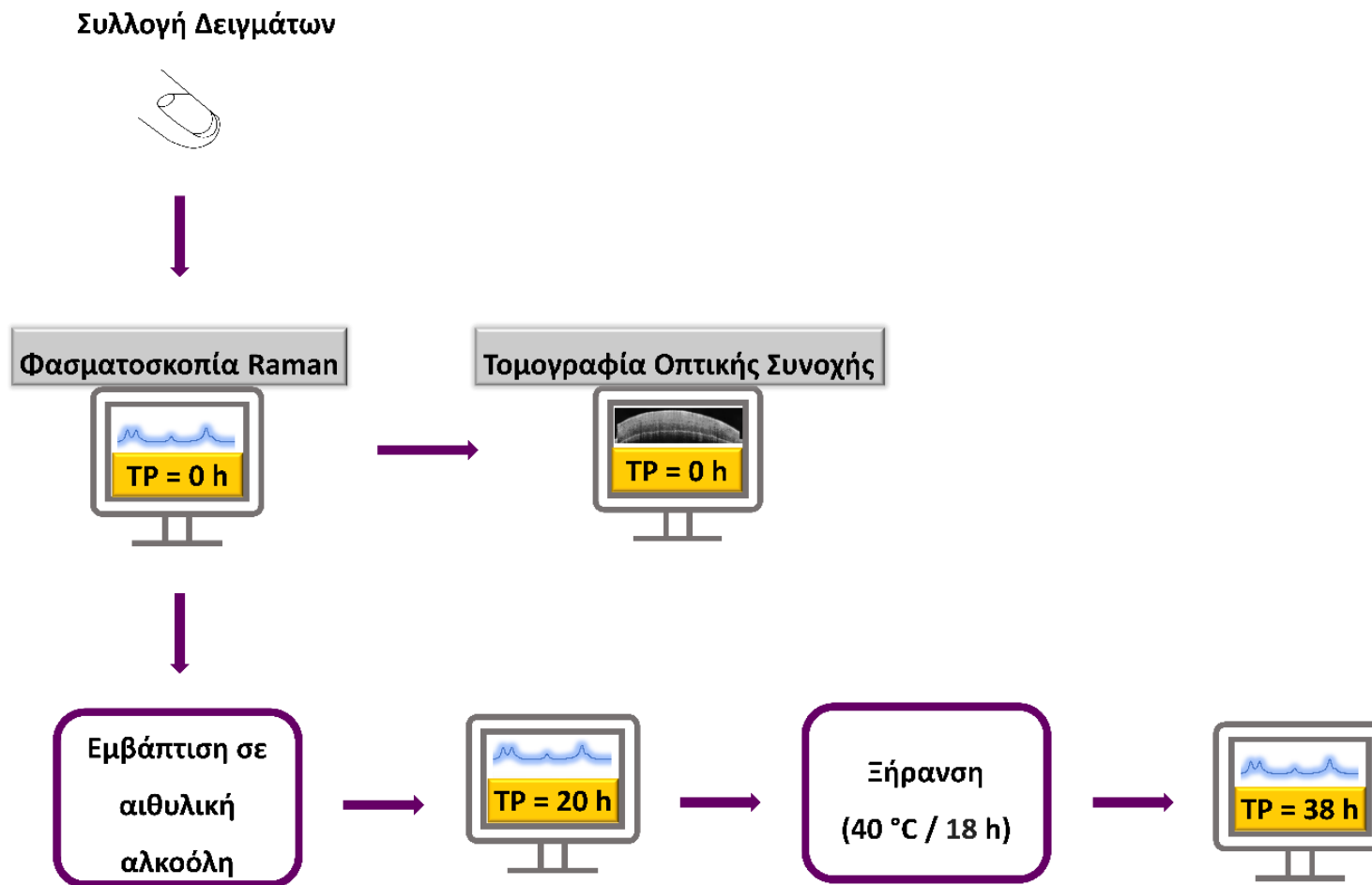
Η αξιολόγηση των ονύχων, πραγματοποιήθηκε με χρήση φασματοσκοπίας Raman και τομογραφίας οπτικής συνοχής. Οι όνυχες ταξινομήθηκαν σε τέσσερις κατηγορίες: (α) control, (β) προσβεβλημένοι από *Trichophyton rubrum*, (γ) πάσχοντες από σακχαρώδη διαβήτη, και (δ) πάσχοντες από σακχαρώδη διαβήτη και ονυχομυκητίαση. Οι μετρήσεις με χρήση φασματοσκοπίας Raman πραγματοποιήθηκαν ως εξής:

- i. Άμεσα στο υλικό χωρίς κάποια προηγούμενη επεξεργασία των δειγμάτων (Χρονική Στιγμή/Time Point [TP], TP0)
- ii. Έπειτα από λουτρό υπερήχων με αποσταγμένο νερό και πλύσεις με αιθανόλη [TP20]
- iii. Μετά από επώαση σε φούρνο [TP38]
- iv. Έπειτα από γλυκοζυλίωση

Οι μετρήσεις στα βήματα (i), (ii), (iii) πραγματοποιήθηκαν διαδοχικά (Εικόνα 22). Το πρώτο βήμα είχε ως στόχο την προσομοίωση των *in vivo* συνθηκών εξέτασης με φασματοσκοπία Raman και τομογραφία οπτικής συνοχής. Μελετήσαμε τις φασματοσκοπικές και μορφολογικές διαφορές που διαχωρίζουν τα δείγματα υγιών ονύχων (control) από εκείνα με μυκητίαση, καθώς και από των ονύχων διαβητικών ασθενών. Επιπλέον, διερευνήθηκαν οι φασματοσκοπικές διαφορές μεταξύ των προαναφερθεισών ομάδων και των διαβητικών ασθενών που παρουσίαζαν ταυτόχρονα μυκητίαση.

Στην συνέχεια, στο βήμα (ii) καθαρίστηκαν οι όνυχες από υπολείμματα που προέρχονται από την καθημερινή, κοινωνική ή επαγγελματική ζωή των εθελοντών. Στο βήμα (iii), οι όνυχες υποβλήθηκαν σε αφύγρανση. Ακολούθως, διερευνήθηκε κατά πόσο ο συνδυασμός των βημάτων (ii) και (iii) ενισχύει τον διαχωρισμό μεταξύ υγιών ονύχων (control) και αυτών που έχουν προσβληθεί από την λοίμωξη. Αντίστοιχη ανάλυση πραγματοποιήθηκε στους όνυχες που προέρχονταν από διαβητικά άτομα χωρίς ονυχομυκητίαση.

Στο (iv) βήμα, εξετάστηκαν όνυχες που είχαν υποβληθεί σε *in vitro* γλυκοζυλίωση. Οι όνυχες προέρχονταν από άτομα χωρίς ιστορικό σακχαρώδη διαβήτη ή ονυχομυκητίασης. Στόχος ήταν να διερευνήσουμε την ικανότητα των διαθέσιμων οργάνων μέτρησης να ανιχνεύουν και να ποσοτικοποιούν την συγκέντρωση γλυκόζης στους όνυχες.



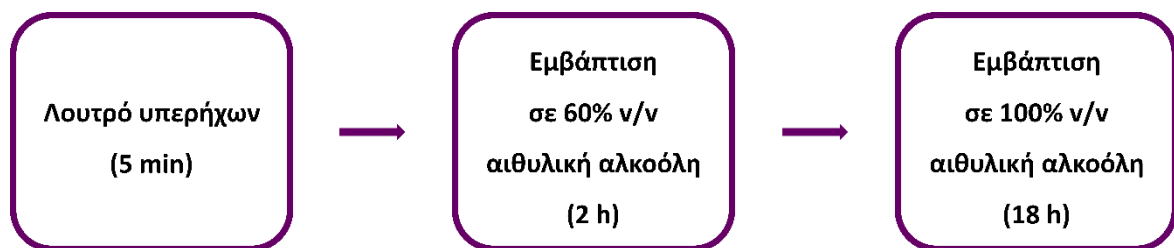
Εικόνα 22: Πρωτόκολλο πειραματικών μετρήσεων.

2.3 Εμβάπτιση στην αιθυλική αλκοόλη

Η εμβάπτιση σε αιθυλική αλκοόλη περιλάμβανε τα ακόλουθα βήματα για τον καθαρισμό και την απολύμανση των δειγμάτων ονύχων (Εικόνα 23):

- (α) τοποθέτηση των φιαλιδίων Errendorf σε υπερήχους για 5 λεπτά,
- (β) εμβάπτιση των δειγμάτων σε διάλυμα 60% v/v αιθυλικής αλκοόλης (EMSURE ACS, Merck) για 2 ώρες,
- (γ) εμβάπτιση σε καθαρή αιθυλική αλκοόλη για 18 ώρες.
- (δ) παθητική εμβάπτιση και ξήρανση σε αλκοολικό περιβάλλον για 24 ώρες (overnight)

Τα χρονικά σημεία επιλέχθηκαν ώστε να είναι πειραματικά εφικτά, επιτρέποντας την παραμονή των δειγμάτων σε συνθήκες χωρίς επιτήρηση για τη διάρκεια των διαδικασιών καθαρισμού και σταδιακής ξήρανσης.



Εικόνα 23: Διαδικασία επεξεργασίας των ονύχων με υδατικό διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης.

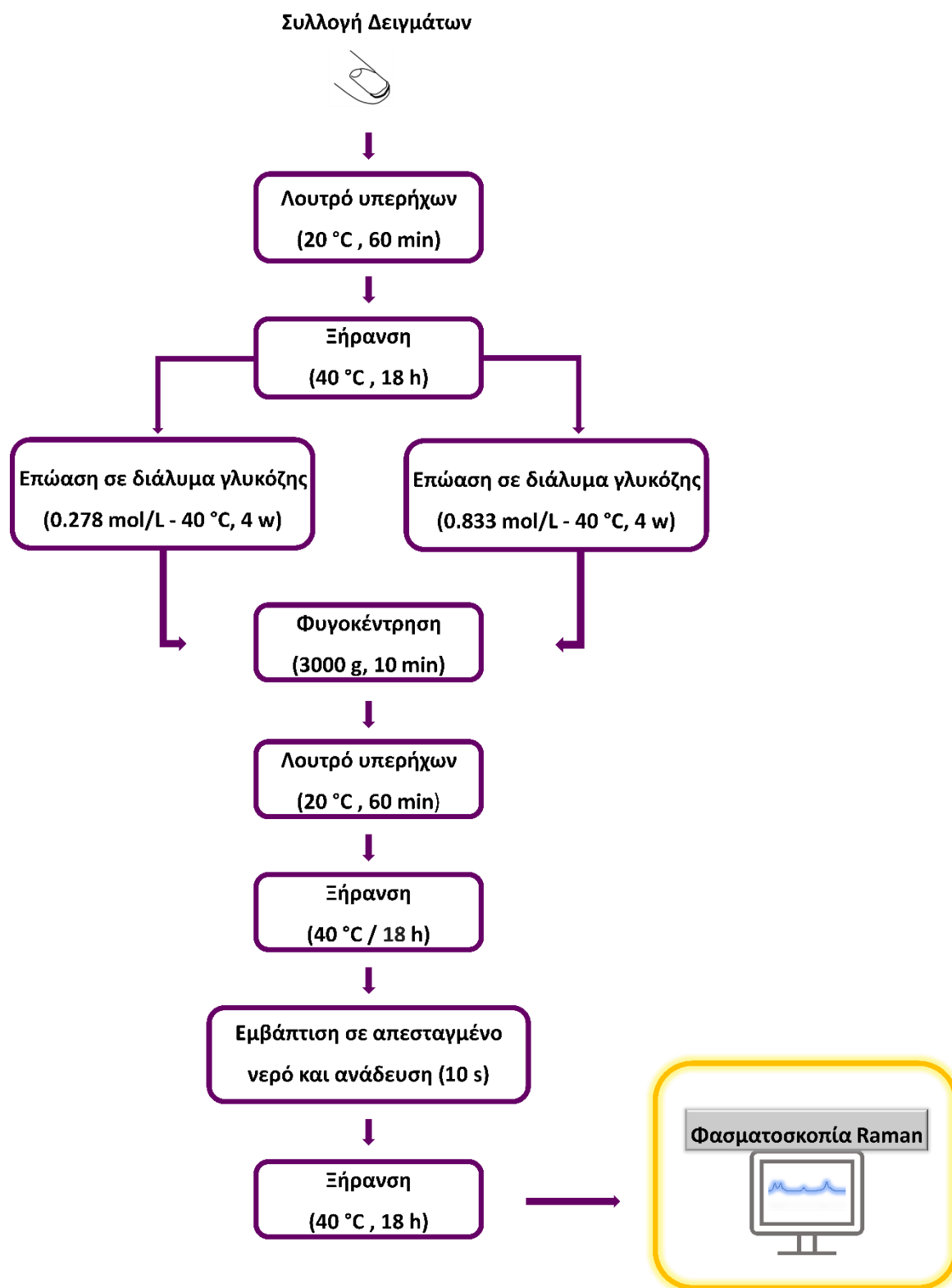
2.4 Γλυκοζυλίωση ονύχων

Ορισμένοι από τους κλινικά υγιείς όνυχες (N=8) υποβλήθηκαν σε γλυκοζυλίωση. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε διαδοχικά στάδια, όπως περιγράφεται παρακάτω (Εικόνα 24):

- (α) Τοποθέτηση των φιαλιδίων Errendorf σε λουτρό υπερήχων στους 20°C για 60 λεπτά
- (β) Επώαση των ονύχων σε φούρνο στους 40°C για 18 ώρες
- (γ) Επώαση σε διαλύματα γλυκόζης στους 40°C για διάστημα 4 εβδομάδων
- (δ) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά
- (ε) Επανατοποθέτηση των φιαλιδίων Errendorf σε λουτρό υπερήχων στους 20°C για 60 λεπτά
- (στ) Επώαση σε φούρνο στους 40°C για 18 ώρες
- (ζ) Πλύση με 1 mL απεσταγμένου νερού, ακολουθούμενη από ανάδευση σε vortex για 10 δευτερόλεπτα
- (η) Τελική επώαση σε φούρνο στους 40°C για 18 ώρες
- (θ) Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε η λήψη φασμάτων Raman.

Οι όνυχες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: η πρώτη επώαστηκε σε διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 0.278 mol/L, ενώ η δεύτερη σε διάλυμα συγκέντρωσης 0.833 mol/L. Κάθε διάλυμα περιείχε τα εξής συστατικά: 1mL διαλύματος χλωριούχου νατρίου (NaCl) 0.9% (Mini-Plasco NaCl B. Braun 0.9%) και 1mL σιροπιού γλυκόζης.

Το πρωτόκολλο της γλυκοζυλίωσης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην προσπάθεια διάγνωσης του σακχαρώδη διαβήτη χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία υπερύθρου (NIR).(124)



Εικόνα 24: Διαδικασία γλυκοζύλιωσης ονύχων.

2.5 Πειραματική διάταξη

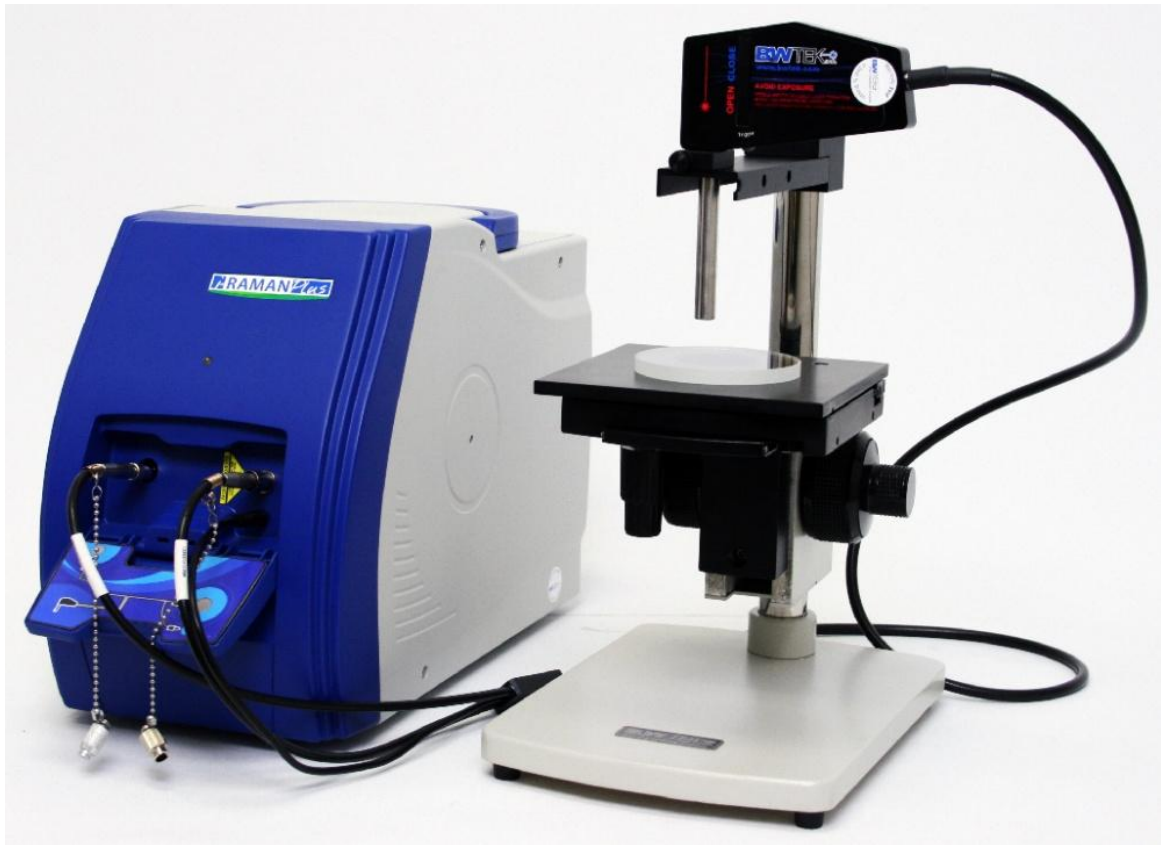
2.5.1 Φασματοσκοπία Raman

Η λήψη φασμάτων Raman πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του φορητού φασματόμετρου B&W Tek i-Raman plus. (Εικόνα 25) Το φασματόμετρο είναι εξοπλισμένο με ενσωματωμένο ανιχνευτή, ο οποίος αποτελείται από ένα σύστημα οπτικών ινών που συνδυάζει τη μεταφορά της δέσμης laser από το φασματόμετρο στο δείγμα και τη συλλογή του ανιχνευθέντος φωτός από το δείγμα στο φασματόμετρο για ανάλυση. Η ακτίνα laser (μήκους κύματος 78 nm, NIR) εστιάζεται στην επιφάνεια του δείγματος μέσω της οπτικής κεφαλής (probe), σε απόσταση εργασίας 8mm, σχηματίζοντας σημείο ακτινοβολίας με ακτίνα περίπου 200 μm . Το συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι κατάλληλο για μετρήσεις Raman σε βιολογικά δείγματα, καθώς ελαχιστοποιεί τον φθορισμό σε σύγκριση με την ακτινοβολία στο ορατό ή υπεριώδες φάσμα. Το ανιχνευθέν σήμα μεταφέρεται μέσω της οπτικής ίνας στον ανιχνευτή CCD του φασματόμετρου, ο οποίος διατηρείται στους -2°C . Ο φασματογράφος καλύπτει φασματικό εύρος έως 3200 cm^{-1} με ονομαστική ανάλυση 4.5 cm^{-1} στα 912 nm.

Για τις μετρήσεις Raman, τα δείγματα ονύχων τοποθετούνταν σε ειδική επιφάνεια από ανοξείδωτο ατσάλι (stainless steel) στην τράπεζα XYZ. Η τράπεζα επέτρεπε την ακριβή μετακίνηση του δείγματος κατά τους άξονες X, Y και Z μέσω μικρομετρικών κοχλίων διασφαλίζοντας την εστίαση της ακτίνας laser στην επιθυμητή περιοχή του δείγματος.

Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό BWSpec, το οποίο παρείχε έλεγχο της ισχύος της ακτίνας laser (0–100%), διαχείριση του χρόνου απόκτησης, αυτόματη αφαίρεση φάσματος σκοτεινού υποβάθρου και βασικά εργαλεία ανάλυσης. Τα φάσματα Raman συλλέχθηκαν με ισχύ εξόδου 30 mW και χρόνο απόκτησης 4 s. Πριν από κάθε μέτρηση, συλλεγόταν ένα φάσμα σκοτεινού υποβάθρου, το οποίο αφαιρούνταν αυτόματα μέσω του λογισμικού. Κάθε φάσμα αποθηκευόταν ως αρχείο src με μοναδικό όνομα που περιλάμβανε την κλινική κατάσταση του δείγματος και τον αριθμό της επανάληψης. Για κάθε δείγμα αποκτήθηκαν 3 φάσματα από διαφορετικά σημεία της επιφάνειας.

Τα φάσματα Raman υποβλήθηκαν σε προ-επεξεργασία και ανάλυση χρησιμοποιώντας το PyFasma, ένα ανοιχτού κώδικα λογισμικό που βασίζεται στην γλώσσα Python.⁽¹²⁵⁾ Οι διαδικασίες προ-επεξεργασίας και ανάλυσης περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.



Εικόνα 25: Φορητό φασματόμετρο B&W Tek i-Raman plus.

2.5.2 Τομογραφία οπτικής συνοχής

Οι απεικονίσεις των ονύχων πραγματοποιήθηκαν με χρήση τομογραφίας οπτικής συνοχής (OCT) μέσω του συστήματος NITID (Dermalumics, Ισπανία). Το σύστημα NITID είναι μια φορητή διαγνωστική συσκευή που συνδυάζει τρεις μεθόδους απεικόνισης: κλινική κάμερα, ψηφιακή δερματοσκόπηση και τομογραφία οπτικής συνοχής (OCT). (Εικόνα 26) Το σύστημα επιτρέπει την μη-επεμβατική διάγνωση δερματικών παθήσεων και αλλοιώσεων των ονύχων, παρέχοντας εικόνες υψηλής ανάλυσης σε πραγματικό χρόνο με διείσδυση ιστού έως 2 mm.

Το φορητό σύστημα NITID διαθέτει έναν εργονομικό βραχίονα απεικόνισης και μια οθόνη αφής που συνδέονται μέσω εύκαμπτου καλωδίου. Ο βραχίονας χρησιμοποιείται στην λήψη των εικόνων, εξασφαλίζοντας ακρίβεια στην απεικόνιση της δομής των ονύχων, ενώ ταυτόχρονα εξασφαλίζει άνεση στην χρήση του συστήματος.

Το OCT του συστήματος NITID λειτουργεί με πηγή φωτός μήκους κύματος 1300 nm, και διαθέτει αξονική διακριτική ικανότητα 11 μm και εγκάρσια διακριτική ικανότητα 12 μm . Η

ταχύτητα σάρωσης φτάνει τα 15000 A-scans/s επιτρέποντας την λήψη απεικόνισης σε πραγματικό χρόνο με εξαιρετική ανάλυση.

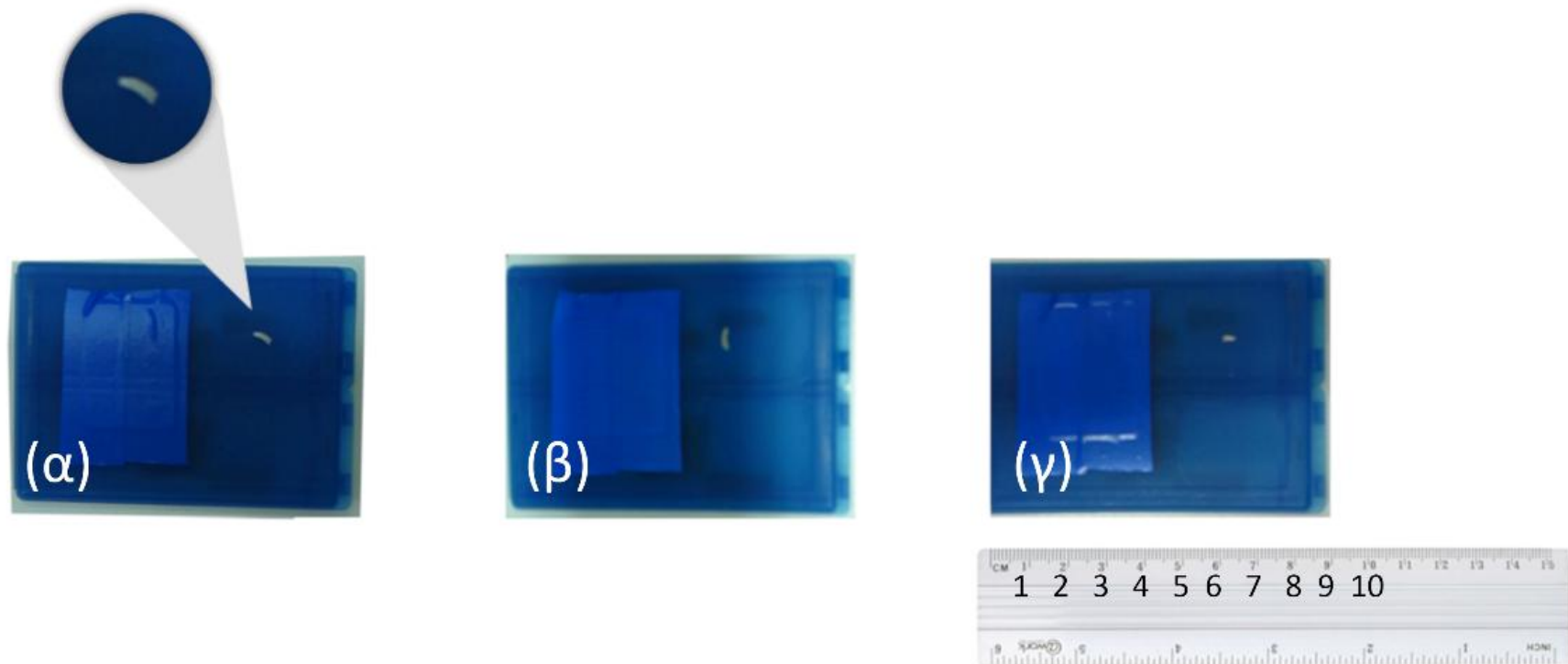
Οι εικόνες των ονύχων ελήφθησαν σε δύο κατευθύνσεις: από την ραχιαία και την κοιλιακή πλευρά κάθε δείγματος, για πλήρη αναπαράσταση της δομής των ονύχων. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδική μπλε επιφάνεια πολυπροπυλενίου (PP), εξασφαλίζοντας σταθερότητα κατά τη διάρκεια της απεικόνισης. (Εικόνα 27)

Η διαδικασία καταγραφής ξεκίνησε με την καταχώρηση των δημογραφικών στοιχείων των εθελοντών και την επιλογή του ανατομικού μέρους του σώματος που απεικονιζόταν. Στην παρούσα μελέτη, επιλέγονταν τα άκρα (άνω και κάτω), καθώς και η πλευρά (αριστερά ή δεξιά). Στην συνέχεια, το λογισμικό του συστήματος επέτρεπε την λήψη φωτογραφίας του δείγματος και απεικόνισης OCT. Το σύστημα αποθηκεύει όλες τις φωτογραφίες και απεικονίσεις δίνοντας την δυνατότητα σύγκρισης εικόνας πριν και μετά από παρεμβάσεις, και εξαγωγής των δεδομένων.

Οι απεικονίσεις OCT υποβλήθηκαν σε επεξεργασία και ανάλυση χρησιμοποιώντας την γλώσσα προγραμματισμού Python. Οι διαδικασίες επεξεργασίας και ανάλυσης περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.



Εικόνα 26: Φορητό σύστημα OCT NITID (Dermalumics, Ισπανία).



Εικόνα 27: Δείγματα ονύχων στην επιφάνεια πολυπροπυλενίου: Στην εικόνα (α) παρουσιάζεται ένας υγιής όνυχας (control), στην εικόνα (β) ένας όνυχας προσβεβλημένος από *T. rubrum*, και στην εικόνα (γ) ένας διαβητικός όνυχας.

2.6 Επεξεργασία και ανάλυση πειραματικών μετρήσεων

2.6.1 Φασματοσκοπία Raman

Επεξεργασία

Τα φάσματα Raman που συλλέχθηκαν επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν με το PyFasma, ένα ανοιχτού κώδικα (Python 3) πακέτο, το οποίο αναπτύχθηκε στο εργαστήριο της Ιατρικής Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από τον Δρ. Ελευθέριο Παύλου στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του.(126) Η επεξεργασία των φασμάτων περιλάμβανε τα εξής βήματα:

- Περιορισμός (crop) του φασματικού εύρους σε $200-2000\text{ cm}^{-1}$. Αφαιρέθηκε η φασματική περιοχή που περιλαμβάνει την κορυφή Rayleigh και η περιοχή των υψηλών κυματάριθμων, καθώς δεν χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση. Επίσης, η περικοπή αυτής της περιοχής διευκολύνει την εφαρμογή του baseline/αφαίρεση του υποβάθρου, καθώς απότομες αλλαγές στο υπόβαθρο μπορούν να προκαλέσουν αποκλίσεις στην εκτίμηση του.
- Εξομάλυνση (smoothing) χρησιμοποιώντας φίλτρο Savitzky-Golay με πολώνυμο δεύτερου βαθμού και παράθυρο 19 σημείων για την αφαίρεση του θορύβου και τη βελτίωση του λόγου σήματος προς θόρυβο (SNR).
- Αφαίρεση του υποβάθρου (baseline) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο SNIP με την παράμετρο `max_half_window=30`.
- Κανονικοποίηση (normalization) των φασμάτων μέσω των μεθόδων SNV (Standard Normal Variate) και Ευκλείδειας κανονικοποίησης (L2).

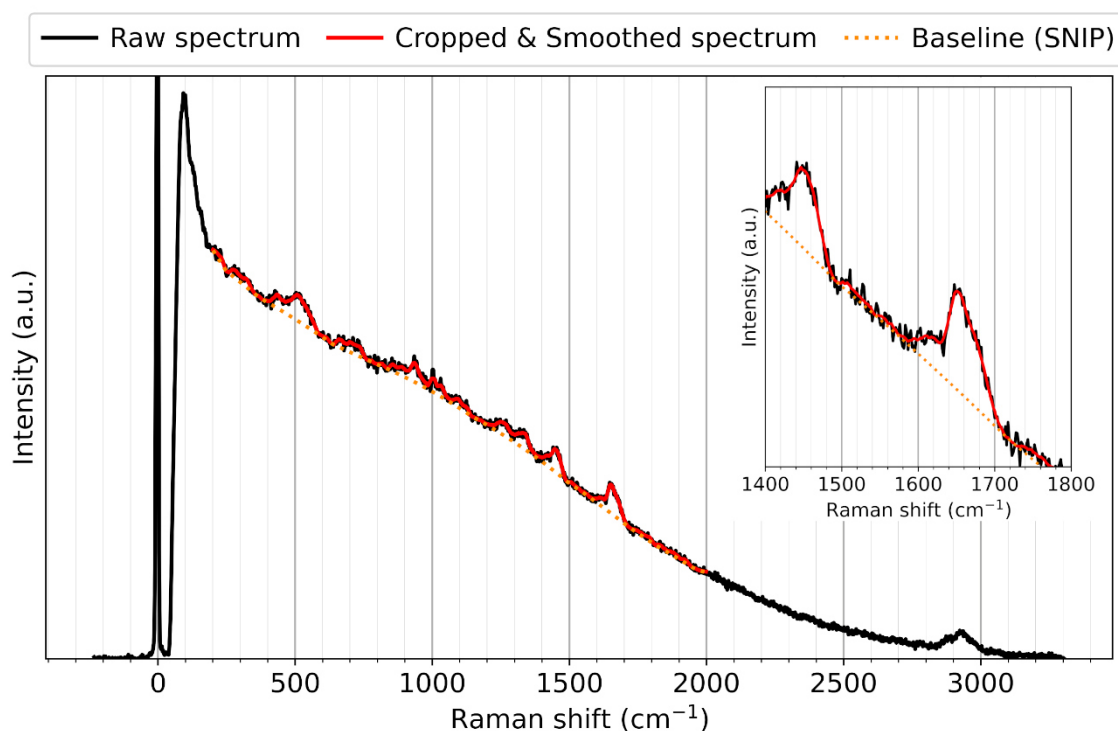
Η μέθοδος SNV εφαρμόστηκε στην ενότητα 3.1, καθώς είχε εφαρμοστεί σε αντίστοιχη μελέτη στην βιβλιογραφία.(103) Στην μέθοδο SNV, τα φάσματα κανονικοποιούνται με την αφαίρεση του μέσου όρου από κάθε φάσμα και την επακόλουθη διαίρεση με την τυπική απόκλιση. Ο κύριος στόχος της μεθόδου αυτής είναι να καταστήσει τα φάσματα συγκρίσιμα ως προς τις εντάσεις ή το επίπεδο απορρόφησης. Η κανονικοποίηση SNV είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την εξάλειψη των επιδράσεων των διαφορών στο μήκος οπτικής διαδρομής και τη διάσπαση του φωτός, καθώς η τυπική απόκλιση των φασμάτων αναπαριστά επαρκώς τις αλλαγές αυτές.

Στην συνέχεια, με τη βελτίωση και ανάπτυξη του πακέτου PyFasma, επιλέχθηκε η Ευκλείδεια κανονικοποίηση (L2). Η μέθοδος L2 επικεντρώνεται στην κανονικοποίηση των φασμάτων, έτσι ώστε η Ευκλείδεια απόσταση από την αρχή (ή το διάνυσμα μηδέν) να είναι

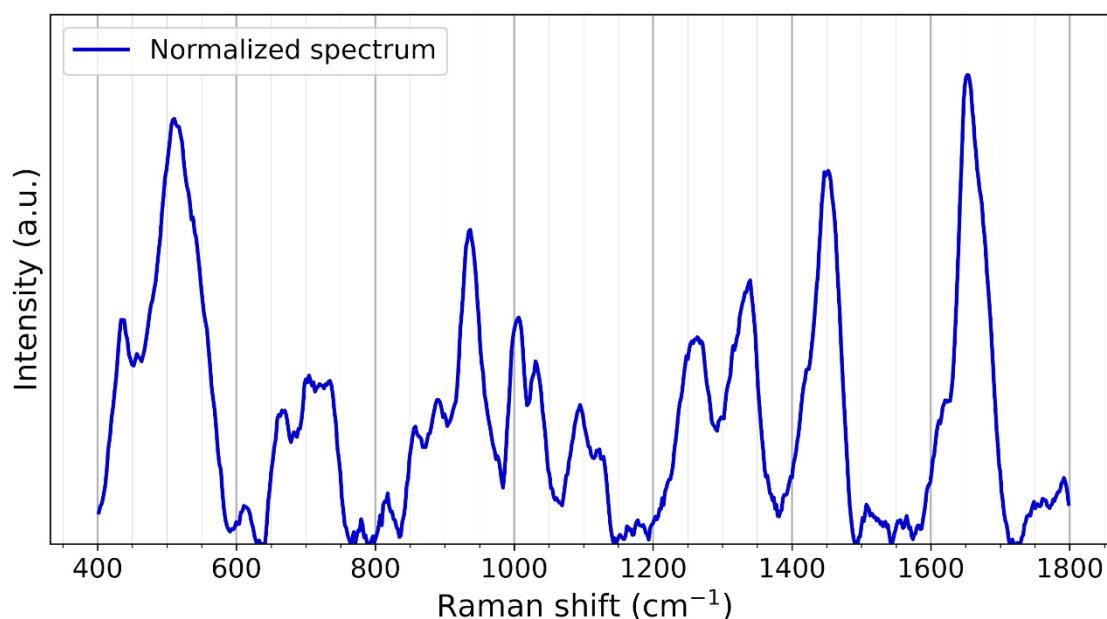
ίση με 1. Η Ευκλείδεια κανονικοποίηση, επηρεάζει τα φάσματα Raman με παρόμοιο τρόπο με την μέθοδο SNV, καθώς είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν τα φάσματα παρουσιάζουν διαφορετικές κλίμακες ή εντάσεις. Η εξάλειψη των επιπτώσεων των διακυμάνσεων στην ένταση, βασίζεται στο σχήμα και στις διαφορές των φασμάτων.

- Τελικός περιορισμός του φασματικού εύρους στην περιοχή ενδιαφέροντος ($400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$, $800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$).

Στην Εικόνα 28 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα αρχικού φάσματος μαζί με την ομαλοποιημένη εκδοχή του, περιορισμένη στο εύρος $200\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$. Αντίστοιχα, στην Εικόνα 29 απεικονίζεται το κανονικοποιημένο φάσμα στο εύρος $400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$.



Εικόνα 28: Αρχικό φάσμα (raw) και ομαλοποιημένο φάσμα περιορισμένο στο εύρος $200\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ (smoothed & cropped) υγιούς όνυχα. Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στην εκτίμηση της βάσης, η οποία υπολογίστηκε με τον αλγόριθμο SNIP. Στην ένθετη εικόνα παρουσιάζεται η μεγέθυνση του ομαλοποιημένου φάσματος και η εκτίμηση της βάσης στην περιοχή $1400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$.



Εικόνα 29: Κανονικοποιημένο φάσμα υγιούς όνυχα στο εύρος 400–1800 cm^{-1} . Κανονικοποίηση με L2.

Ανάλυση

Η ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε μέσω της αποσυνέλιξης των κορυφών και της εφαρμογής των μεθόδων PCA (Principal Component Analysis-Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών) και PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis-Ανάλυση Διακριτών Κλάσεων με την Μέθοδο των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων).

Η αποσυνέλιξη εφαρμόστηκε με καμπύλες Gauss στις φασματικές περιοχές που καταγράφονται στον Πίνακα 2, με σκοπό την ποσοτικοποίηση των διαφοροποιήσεων που προκαλούνται από τον σακχαρώδη διαβήτη.

Πίνακας 2: Φασματικές περιοχές στις οποίες εφαρμόστηκαν καμπύλες Gauss και η αντίστοιχη συσχέτιση τους με βιομόρια.

Φασματικές περιοχές (cm ⁻¹)	Αντιστοίχιση
470-570	Κερατίνη
910-970	Κερατίνη
980-1070	Φαινυλαλανίνη
1060-1140	Τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs)
1380-1490	Κερατίνη
1620-1710	Κερατίνη

Η μέθοδος PCA χρησιμοποιήθηκε στην διερεύνηση του διαχωρισμού μεταξύ των ομάδων δειγμάτων ονύχων: control, πάσχοντες από ονυχομυκητίαση με *T.rubrum*, πάσχοντες από διαβήτη, πάσχοντες από διαβήτη και ονυχομυκητίαση. Η ανάλυση PCA μείωσε τις διαστάσεις του συνόλου των δεδομένων προβάλλοντας το σε ένα μικρότερο σύνολο ορθογώνιων κύριων συνιστωσών (Principal Components-PCs), διατηρώντας παράλληλα όσο το δυνατόν περισσότερη πληροφορία. Οι κύριες συνιστώσες είναι νέοι άξονες που μεγιστοποιούν τη διακύμανση των δεδομένων. Η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) ερμηνεύει πάντα, το μεγαλύτερο ποσοστό της συνολικής διακύμανσης, ενώ κάθε επόμενη κύρια συνιστώσα (PC) εξηγεί προοδευτικά μικρότερη ποσότητα πληροφορίας. Οι τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες είναι οι πιο σημαντικές, καθώς περιγράφουν τη μεγαλύτερη διακύμανση των δεδομένων και προσφέρουν την αντιπροσωπευτικότερη διάκριση μεταξύ των ομάδων (clusters). Τα αποτελέσματα της ταξινόμησης των δειγμάτων παρουσιάστηκαν μέσω των διαγραμμάτων PCA scores, στα οποία κάθε σημείο αντιστοιχεί στο μέσο φάσμα του εκάστοτε δείγματος. Τα διαγράμματα PCA scores συνοδεύονται από τα διαγράμματα loading, τα οποία προβάλλουν την συνεισφορά των αρχικών φασματικών δεδομένων στις κύριες συνιστώσες.

Η μέθοδος PLS-DA χρησιμοποιήθηκε στην ανάπτυξη ενός προγνωστικού μοντέλου ταξινόμησης, με στόχο την διάγνωση του σακχαρώδη διαβήτη. Για την εκπαίδευση και αξιολόγηση του μοντέλου, χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών (PC1 και PC2), που προέκυψαν από την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για τον διαχωρισμό μεταξύ υγιών (control) και διαβητικών ονύχων (αρνητικοί στην ονυχομυκητίαση).

Τα δεδομένα χωρίστηκαν σε δύο υποσύνολα:

- Train set (70%): Χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του μοντέλου.
- Test set (30%): Εφαρμόστηκε στο μοντέλο για την αξιολόγηση της απόδοσής του.

Η αξιολόγηση του μοντέλου πραγματοποιήθηκε μέσω των δεικτών: ακρίβεια (accuracy), ευαισθησία (sensitivity ή True Positive Rate), και ειδικότητα (specificity ή True Negative Rate).

Επιπλέον, για τη συνολική αξιολόγηση της διαγνωστικής ικανότητας του μοντέλου, κατασκευάστηκε η καμπύλη ROC (Receiver Operating Characteristic curve), η οποία απεικονίζει τη σχέση μεταξύ του True Positive Rate και του False Positive Rate (1-specificity) για διαφορετικά κατώφλια πρόβλεψης. Όσο πιο κοντά βρίσκεται η καμπύλη στην άνω αριστερή γωνία του διαγράμματος, τόσο υψηλότερη είναι η απόδοση του μοντέλου. Η τιμή AUC (Area Under the Curve) παρέχει ένα μέτρο ταξινομητικής ικανότητας, καθώς οι τιμές κοντά στο 1 υποδηλώνουν άριστη διαχωριστική ισχύ.

Πραγματοποιήθηκε επίσης ανάλυση VIP (Variable Importance in Projection), με σκοπό την εκτίμηση της συμβολής κάθε μεταβλητής στην διάκριση μεταξύ των ομάδων. Αυτή η ανάλυση χρησιμοποιείται στο πλαίσιο της PLS-DA, για την αξιολόγηση της σημασίας των μεταβλητών στην ταξινόμηση. Μεταβλητές με τιμές $VIP > 1$ θεωρούνται σημαντικές στην διακριτική ικανότητα του μοντέλου.

2.6.2 Τομογραφία οπτικής συνοχής

Ορισμένοι από τους όνυχες που εξετάστηκαν με φασματοσκοπία Raman, απεικονίστηκαν με τομογραφία οπτικής συνοχής (OCT). Οι όνυχες που επιλέχθηκαν για απεικόνιση ταξινομήθηκαν στις εξής κατηγορίες:

(α) Control (n=4)

(β) Προσβεβλημένοι από *T. rubrum* (n=4)

(γ) Πάσχοντες από σακχαρώδη διαβήτη με HbA1c: 8.4–11.0% (n=4)

Η επεξεργασία των απεικονίσεων OCT πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της γλώσσας προγραμματισμού Python, (Κώδικας σε 8.1) η οποία εφαρμόστηκε στα διάφορα στάδια της ανάλυσης. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο non-local means (NLM), μέσω της βιβλιοθήκης scikit-image.(127) Το φίλτρο χρησιμοποιείται συχνά στην επεξεργασία εικόνων OCT, ώστε να ενισχυθεί η αντίθεση των εικόνων και να βελτιωθεί η αναγνώριση λεπτομερειών και δομών. Στην συνέχεια, εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος Canny Edge Detection, με σκοπό την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της υπερ-ανακλαστικής επιφάνειας των ονύχων (profile) (Εικόνα 30). Η προσέγγιση αυτή βελτίωσε την οριοθέτηση των δομών στις εικόνες OCT, διευκολύνοντας:

- (α) τον προσδιορισμό των δεικτών τραχύτητας των ονύχων, και
- (β) τον υπολογισμό του συντελεστή εξασθένησης μ_{OCT} σε επιλεγμένες περιοχές ενδιαφέροντος που ορίστηκαν χειροκίνητα στις επεξεργασμένες εικόνες.

Οι δείκτες τραχύτητας που υπολογίστηκαν περιλαμβάνουν τους R_a , R_q και R_z , οι οποίοι αποτελούν ευρέως χρησιμοποιούμενα μεγέθη στην ποσοτική αξιολόγηση επιφανειών στην βιομηχανία. Παράλληλα, ο συντελεστής μ_{OCT} παρέχει πληροφορίες σχετικές με τις οπτικές και μορφολογικές ιδιότητες των ιστών. Μεταβολές στις τιμές των παραπάνω δεικτών έχουν συσχετιστεί με παθολογικές αλλοιώσεις, καθώς οι παθολογικοί ιστοί εμφανίζουν διαφοροποιημένα μορφολογικά χαρακτηριστικά και διακριτή οπτική συμπεριφορά σε σύγκριση με τους υγιείς. (116,128–130)

Προσδιορισμός επιφανειακής τραχύτητας

Το profile προσαρμόστηκε ώστε να περιλαμβάνει αποκλειστικά την επιφάνεια των ονύχων, εξαιρώντας τα κάθετα άκρα και την επιφάνεια εργασίας. Για την μείωση του θορύβου, εφαρμόστηκε φίλτρο Savitzky-Golay (πολυώνυμο 2ου βαθμού, παράθυρο 19), το οποίο διατηρεί τις αιχμές και τις ταχείες διακυμάνσεις του σήματος. Επιπλέον, το φίλτρο αυτό διευκολύνει το επόμενο στάδιο επεξεργασίας, καθώς εξαλείφει αποκλειστικά τις αργές μεταβολές χωρίς να παραμορφώνει τη δομή του profile.

Ακολουθώντας, στο profile της ονυχιαίας επιφάνειας εφαρμόστηκε αφαίρεση τάσης μέσω παρεμβολής spline (μέθοδος: spline, παράγοντας εξομάλυνσης: 1), με σκοπό την εξάλειψη των αργών μεταβολών του σήματος. Η διαδικασία αφαίρεσης τάσης (detrending) υλοποιήθηκε με την χρήση της συνάρτησης UnivariateSpline της βιβλιοθήκης SciPy (Εικόνα 31).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της τραχύτητας του προσαρμοσμένου (detrended) profile, με τη χρήση των ακόλουθων παραμέτρων:

- R_a (Arithmetic Average Roughness)

Η παράμετρος R_a είναι ο μέσος όρος της απόλυτης τιμής της διαφοράς του ύψους του profile από την επιφάνεια αναφοράς και είναι η πιο διαδεδομένη παράμετρος τραχύτητας. Η μαθηματική έκφραση είναι:

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |Z_i - \bar{Z}|$$

- R_q (Root Mean Square Roughness)

Η παράμετρος R_q είναι η τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγώνου της διαφοράς του ύψους του profile από την επιφάνεια αναφοράς. Αυτή η παράμετρος επηρεάζεται στις μεγάλες αποκλίσεις από τη μέση τιμή. Ο τύπος είναι:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Z_i - \bar{Z})^2}$$

- R_z (Peak-to-Valley Height)

Η παράμετρος R_z είναι η διαφορά μεταξύ της υψηλότερης κορυφής και της βαθύτερης κοιλότητας του profile. Η μαθηματική έκφραση είναι:

$$R_z = Z_{max} - Z_{min}$$

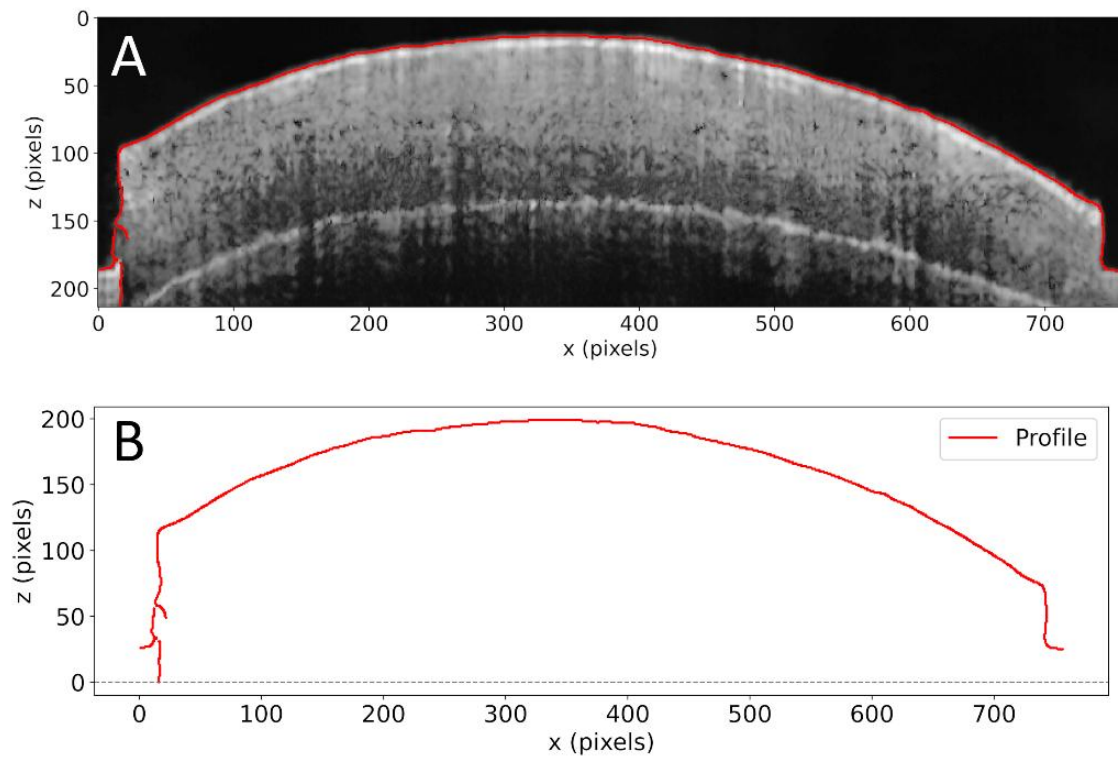
όπου: N : ο αριθμός των σημείων στο σήμα

Z_i : το ύψος του σήματος για κάθε i

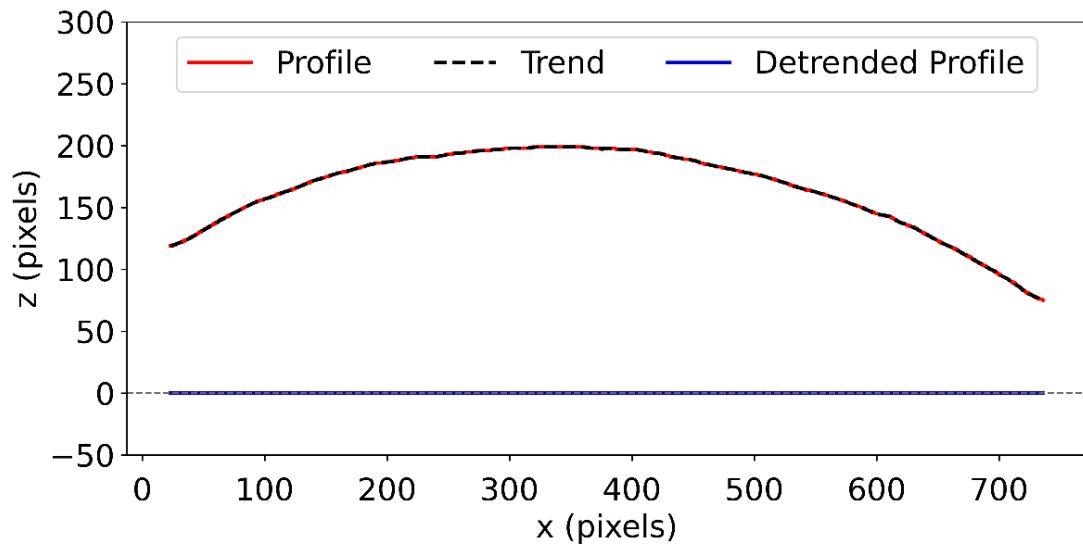
$\bar{Z}$: το μέσο ύψος των σημείων του σήματος

Z_{max} : το ύψος της υψηλότερης κορυφής

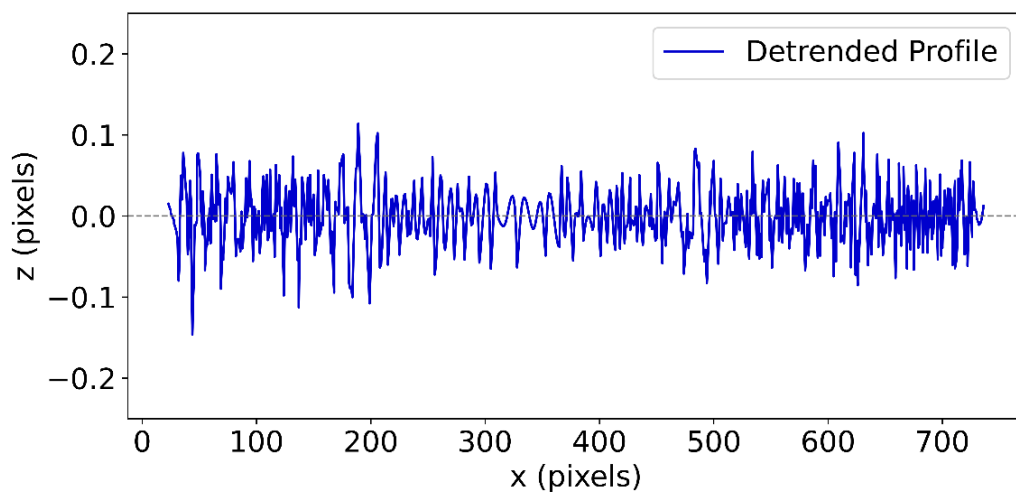
Z_{min} : το βάθος της βαθύτερης κοιλότητας.(131)



Εικόνα 30: Α) Εφαρμογή του αλγόριθμου Canny Edge Detection στην εικόνα του υγιούς ονύχα. Τα σημεία των ανιχνευμένων άκρων σε κόκκινο χρώμα. Β) Τα σημεία που ανιχνεύθηκαν από τον αλγόριθμο αποτυπώθηκαν σε διάγραμμα, δείχνοντας τις ακριβείς θέσεις των άκρων στην εικόνα.



Εικόνα 31: Το διάγραμμα παρουσιάζει το (αρχικό) profile (κόκκινο), την τάση (μαύρη διακεκομμένη γραμμή) και το (τελικό) detrended profile (μπλε). Το (αρχικό) profile δείχνει την αρχική κατανομή των σημείων στην επιφάνεια των ονύχων. Το (τελικό) profile προκύπτει μετά την αφαίρεση της τάσης.



Εικόνα 32: Το (τελικό) profile ενός τυχαίου control.

Υπολογισμός μ_{OCT}

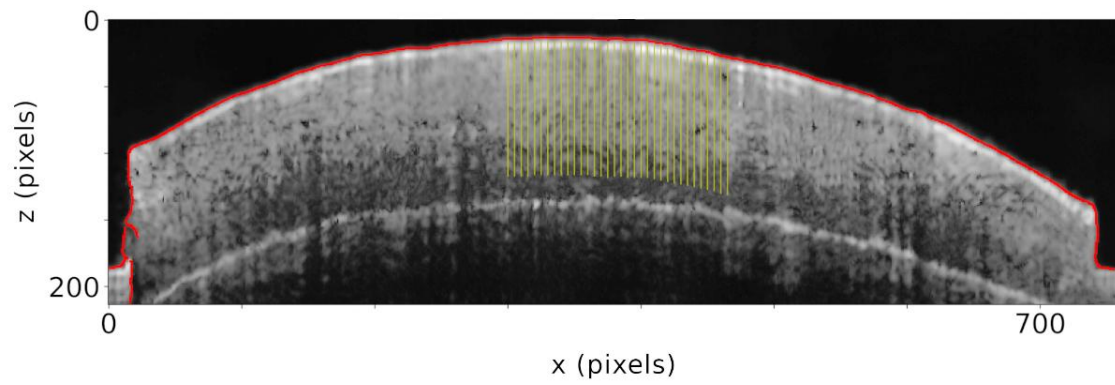
Χρησιμοποιώντας τις εικόνες που προέκυψαν από την επεξεργασία με τον αλγόριθμο Canny Edge Detection υπολογίστηκε ο συντελεστής μ_{OCT} , βάσει του μοντέλου μονής σκέδασης, το οποίο στηρίζεται στην πρώτη προσέγγιση Born και υποθέτει ότι κάθε φωτόνιο που καταλήγει στον ανιχνευτή έχει σκεδαστεί μόνο μία φορά εντός του ιστού. Αποτελεί το πιο απλό μοντέλο περιγραφής της εξασθένησης και ισχύει όταν η εξασθένηση λόγω σκέδασης είναι μικρή ή η ανάλυση περιορίζεται σε μικρά βάθη.

Στο πλαίσιο αυτό, το σήμα OCT περιγράφεται από μία τροποποιημένη μορφή του νόμου Beer-Lambert:

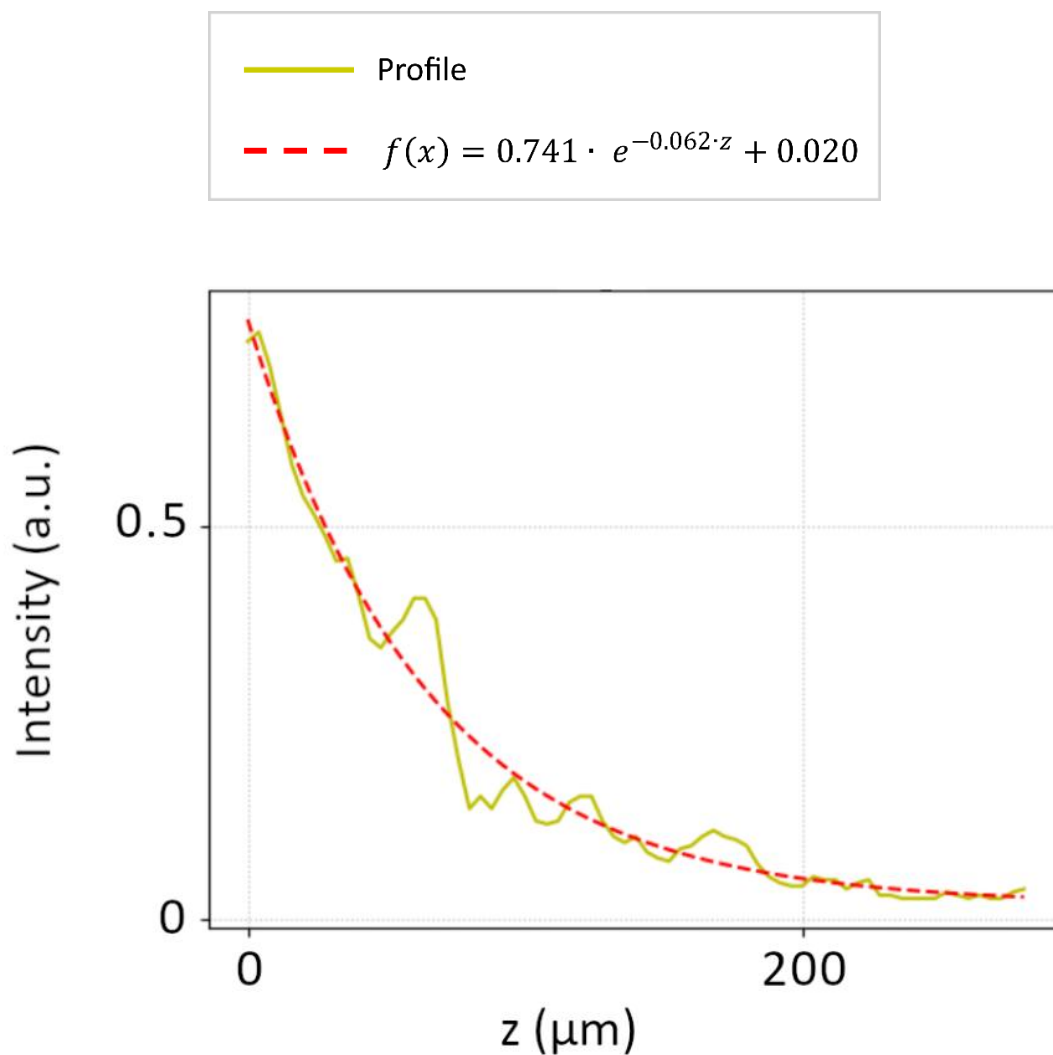
$$I(z) \propto e^{-\mu_{OCT} \cdot z}$$

όπου μ_{OCT} είναι ο συνολικός συντελεστής εξασθένησης και z το βάθος. Η συγκεκριμένη προσέγγιση, χρησιμοποιείται ευρέως για την ποσοτική ανάλυση δεδομένων OCT και την εκτίμηση των οπτικών ιδιοτήτων των ιστών, ως βιοδείκτης των μορφολογικών αλλαγών τους.(132)

Το μοντέλο αυτό συνδέει την μείωση της ισχύος του σήματος OCT με τις τιμές γκρι-κλίμακας εικόνας, εφαρμόζοντας την συνάρτηση εκθετικής εξασθένησης του φωτός όπως περιγράφεται στο νόμο Beer-Lambert.(133) Συγκεκριμένα, οι τιμές του συντελεστή εξασθένησης μ_{OCT} υπολογίζονται κατά μήκος σειράς παράλληλων διαδρομών φωτός, κάθετων προς την επιφάνεια της ονυχιαίας πλάκας. Οι διαδρομές απεικονίζονται ως κίτρινες ισαπέχουσες γραμμές (ανά 5 pixels), οι οποίες ξεκινούν 3 pixels από την υπερανακλαστική επιφάνεια εισόδου του φωτός στο δείγμα. (Εικόνα 33) Η υπερανακλαστική στιβάδα, που σχηματίζεται στο σημείο εισόδου του φωτός στον όνυχα, δεν αντιπροσωπεύει την πραγματική εξασθένηση του φωτός και αν δεν ληφθεί υπόψη, οδηγεί σε συστηματική υπερεκτίμηση του μ_{OCT} . Το μήκος των γραμμών κυμαίνεται από 55 pixels έως 100 pixels (~ 220-400 μm) ανάλογα με το πάχος του κάθε δείγματος, και στόχο τη μέγιστη δυνατή διεύθυνση χωρίς υπέρβαση του κάτω ορίου του ιστού. Για κάθε γραμμή παράγεται διάγραμμα έντασης σήματος ως προς το βάθος, στο οποίο εφαρμόζεται η εκθετική προσαρμογή σύμφωνα με το νόμο Beer-Lambert. (Διάγραμμα 2) Οι τιμές μ_{OCT} συλλέγονται και απεικονίζονται σε violin plot για την στατιστική σύγκριση μεταξύ υγιών, μυκητιασικών και διαβητικών ονύχων (Βλ. Διάγραμμα 8, Ενότητα 3.4.2)



Εικόνα 33: OCT απεικόνιση υγιούς όνυχας. Η επιφάνεια ανιχνεύθηκε με τον αλγόριθμο Canny Edge Detection και επισημάνθηκε με κόκκινο χρώμα, ενώ οι πολλαπλές διαδρομές φωτός ίσου βάθους αποτυπώθηκαν με κίτρινο.



Διάγραμμα 2: Profile έντασης σήματος σε βάθος.

2.6.3 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο ANOVA (Analysis of variance) και επακόλουθο έλεγχο Tukey HSD (Honest Significant Difference) στο λογισμικό Jamovi 2.6.13. Η μέθοδος ANOVA χρησιμοποιείται στην σύγκριση μέσων τιμών περισσότερων από δύο ομάδων. Όταν η τιμή p είναι μικρότερη από το καθορισμένο επίπεδο σημαντικότητας ($\alpha=0.05$), η διαφορά μεταξύ των ομάδων είναι στατιστικά σημαντική. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση, και τα σύμβολα *, ** και *** υποδηλώνουν $p<0.05$, $p<0.01$ και $p<0.001$, αντίστοιχα.

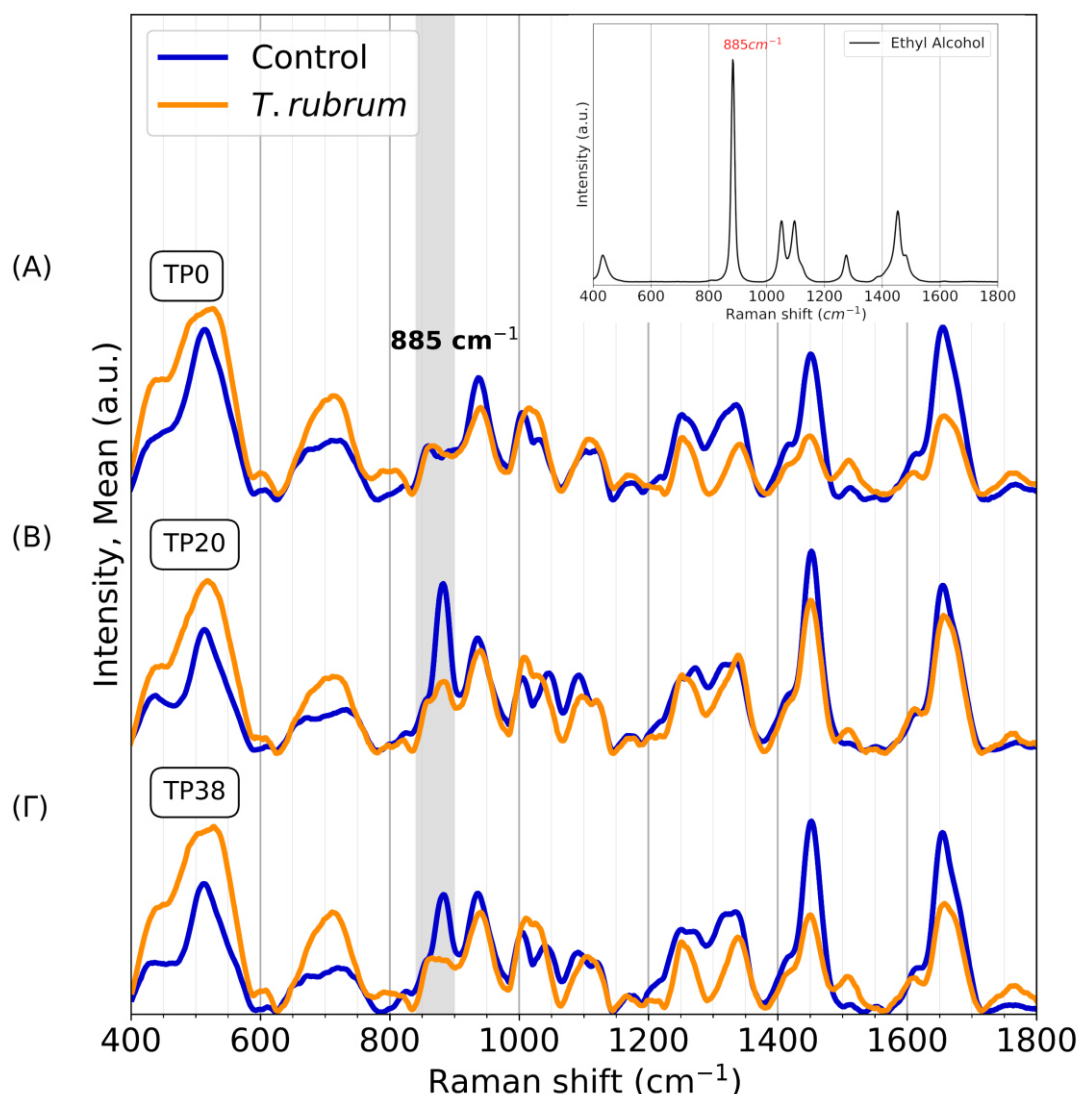
3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1 Όνυχες με λοίμωξη από *Trichophyton rubrum*

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε αρχικά, η δυνατότητα ενίσχυσης της διακριτικής ικανότητας της φασματοσκοπίας Raman στην διάγνωση της ονυχομυκητίασης χρησιμοποιώντας αιθυλική αλκοόλη ως μέσο προεπεξεργασίας των δειγμάτων. Για τον σκοπό αυτό, τα δείγματα ονύχων, που ταξινομήθηκαν ως «control» και «προσβεβλημένα από *Trichophyton rubrum*», (βλ. 2.1) εμβάπτιστηκαν σε αιθυλική αλκοόλη, ενώ πραγματοποιήθηκαν φασματοσκοπικές μετρήσεις πριν (TP0) και μετά την εμβάπτιση (TP20), καθώς και έπειτα από πλήρη ξήρανση (TP38). Η αιθυλική αλκοόλη επιλέχθηκε λόγω της ευρείας χρήσης της σε θεραπείες ονύχων και της ικανότητάς της να αυξάνει την διαπερατότητα της ονυχαίας πλάκας χωρίς να αλλοιώνει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ονύχων, ενισχύοντας έτσι την διείσδυση των δραστικών συστατικών.(134–136) Επιπλέον, η επώαση των ονύχων σε υδρο-αιθανολικά μείγματα αυξάνει την πορώδη φύση τους και επιταχύνει τον ρυθμό διάχυσης και διείσδυσης των σκευασμάτων, χωρίς να επηρεάζει την χημική σύσταση τους.(137) Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι τα σκευάσματα με βάση την αιθυλική αλκοόλη χρησιμοποιούνται ευρέως ως απολυμαντικά χεριών, χωρίς επίδραση στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υγιών ή νοσούντων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών με ονυχομυκητίαση.

Τα μέσα φάσματα των μετρήσεων στο εύρος $400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ απεικονίζονται στην Εικόνα 34. Οι κύριες φασματικές διαφορές μεταξύ των control και των προσβεβλημένων ονύχων από *T. rubrum* εντοπίζονται στα $500\text{--}520\text{ cm}^{-1}$ (Εικόνα 34Α) και αποδίδονται στους δισουλφιδικούς δεσμούς της κερατίνης.(103) Μετά την εμβάπτιση σε αιθυλική αλκοόλη, εμφανίστηκε μια νέα χαρακτηριστική κορυφή Raman στην θέση 885 cm^{-1} (Εικόνα 34Β). Αυτή η κορυφή αποδίδεται στην συμμετρική δόνηση C-C, $\nu_s(\text{CCO})$, και εμφανίζεται ως κορυφή ισχυρής έντασης στα φάσματα Raman των αλκοολών (π.χ., αιθυλική αλκοόλη, μεθυλική αλκοόλη).(138) Ωστόσο, η ισχυρή κορυφή απουσιάζει στα φάσματα των ονύχων με *T. rubrum* που μετρήθηκαν μετά από ημερήσια επώαση στους 40°C (overnight). Αντίθετα, στα control η κορυφή της αιθυλικής αλκοόλης παραμένει εμφανής ακόμα και μετά από παρατεταμένη ξήρανση υπό τις ίδιες συνθήκες (Εικόνα 34Γ). Για να επαληθευτεί περαιτέρω αυτή η παρατήρηση, υπολογίστηκε η αλγεβρική διαφορά (difference spectra) των φασμάτων (Εικόνα 35). Η σχεδόν επίπεδη καμπύλη Raman, ειδικά στο TP38 (Εικόνα 35α), δείχνει ότι η εξάτμιση της αιθυλικής αλκοόλης ολοκληρώθηκε στο ανωτέρω χρονικό διάστημα στους όνυχες με μυκητίαση, ενώ μετρήσιμες ποσότητες του διαλύτη μπορούσαν να εντοπιστούν στα control. Τα φάσματα διαφορών των control, περιείχαν

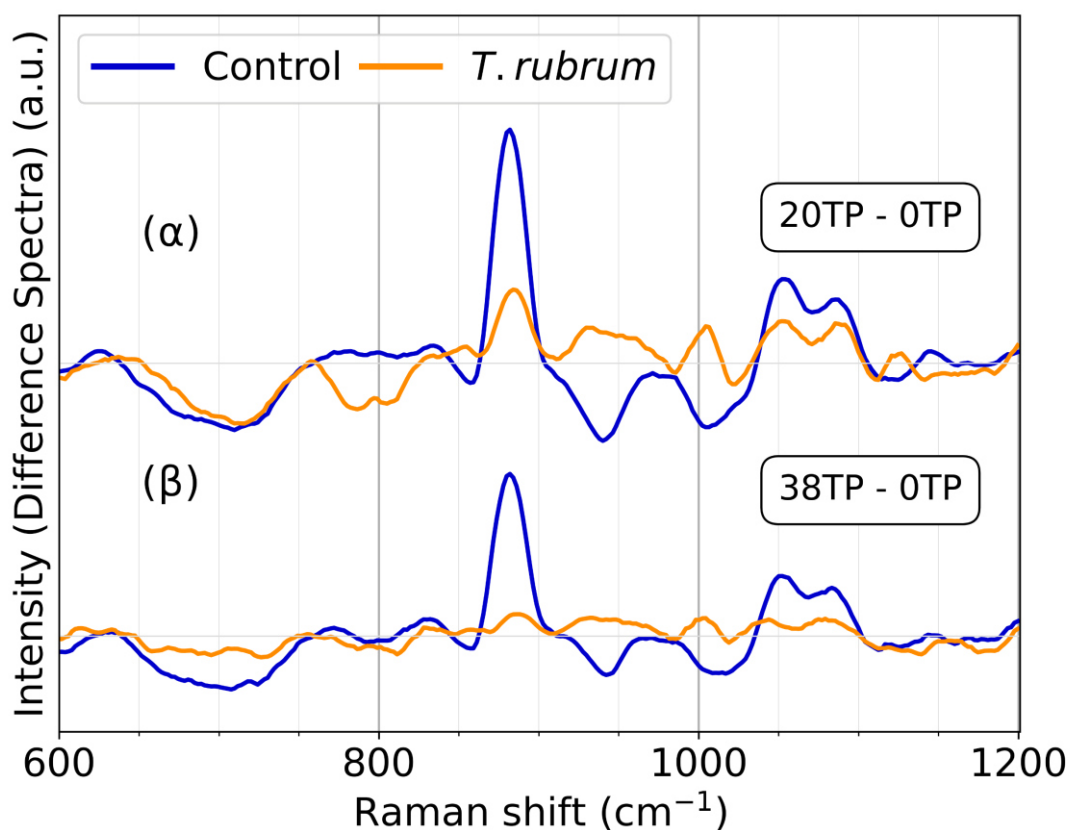
επιπλέον κορυφές Raman που αποδόθηκαν επίσης στην αιθυλική αλκοόλη, όπως η δόνηση C-O, $\nu_a(\text{CCO})$ (1056 cm^{-1}), και η δόνηση $\delta(\text{CH}_3)$ (1090 cm^{-1}).



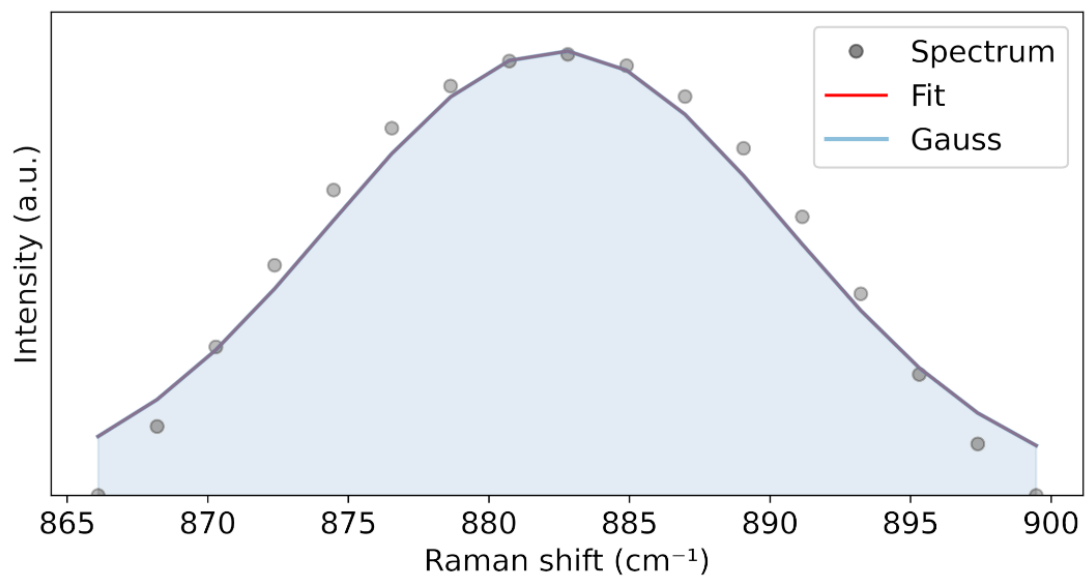
Εικόνα 34: Τα μέσα φάσματα των control ($n=10$) και προσβεβλημένων ονύχων από *T. rubrum* ($n=5$) σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (TP, Time Points). (A) Τα δείγματα ονύχων που εξετάστηκαν με φασματοσκοπία Raman χωρίς να έχουν υποστεί χημική επεξεργασία (TP: 0 ώρες). (B) Τα δείγματα ονύχων που εξετάστηκαν με φασματοσκοπία Raman αμέσως μετά από την εμφάνιση σε αιθυλική αλκοόλη στο χρονική στιγμή TP20. (Γ) Τα φάσματα Raman που μετρήθηκαν μετά από την ξήρανση των ονύχων ολόκληρη την νύχτα (TP: 38 ώρες). Στην ένθετη εικόνα απεικονίζεται το φάσμα της αιθυλικής αλκοόλης.

Μετά την ολοκλήρωση της φασματοσκοπικής ανάλυσης Raman, υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές έντασης των καμπυλών Gauss στο κέντρο της κορυφής στα 885 cm^{-1} για κάθε σύνολο δειγμάτων. Αντί της απλής μέτρησης της μέγιστης τιμής έντασης, εφαρμόστηκε

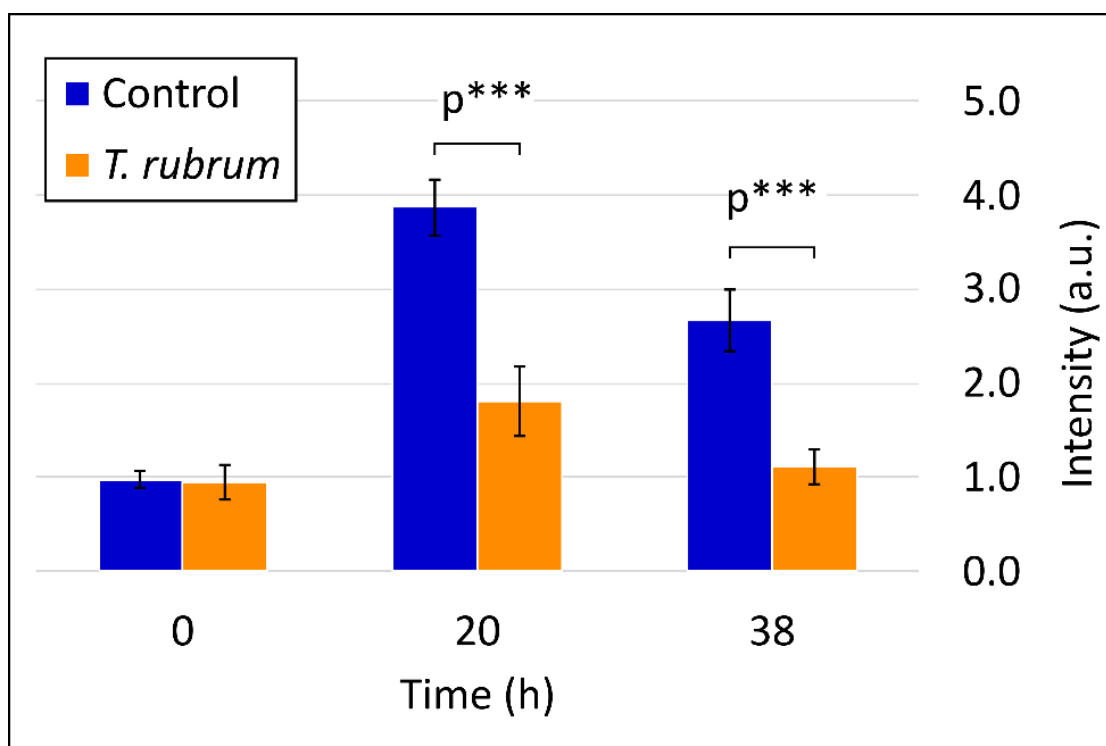
προσαρμογή Gauss, ώστε να ληφθούν πιο αξιόπιστα και συγκρίσιμα αποτελέσματα. Η μέθοδος αυτή μειώνει την επίδραση του υποβάθρου, διαχωρίζει επικαλυπτόμενες κορυφές και βελτιώνει την ποσοτική ακρίβεια σε δεδομένα με θόρυβο. Ενδεικτικό παράδειγμα της ολοκλήρωσης της κορυφής με καμπύλη Gauss παρουσιάζεται στην Εικόνα 36, ενώ τα αποτελέσματα των υπολογισμένων μέσων τιμών απεικονίζονται σε μορφή ιστογράμματος στο Γράφημα 1. Από την ανάλυση προκύπτει ότι η ένταση της χαρακτηριστικής κορυφής της αιθυλικής αλκοόλης στους προσβεβλημένους όνυχες από *T. rubrum* ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με εκείνη των control αμέσως μετά την εμφάνιση σε αιθυλική αλκοόλη στο TP20 (ANOVA, $p < 0.001$). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας ξήρανσης (TP38), η ένταση της ίδιας κορυφής στους προσβεβλημένους όνυχες αποκαταστάθηκε σχεδόν πλήρως. Αντίθετα, στα control παρατηρήθηκε υψηλής έντασης κορυφή στα 885 cm^{-1} τόσο στο TP20 όσο και στο TP38, γεγονός που υποδηλώνει την παραμονή σημαντικών ποσοτήτων αιθυλικής αλκοόλης στην επιφάνεια των δειγμάτων, ακόμα και μετά την ξήρανση. Η φασματική κορυφή που σχετίζεται με την αιθυλική αλκοόλη ήταν σημαντικά υψηλότερη στα control σε σύγκριση με τους προσβεβλημένους όνυχες στο χρονικό σημείο TP38 (ANOVA, $p < 0.001$). Οι μέσες τιμές έντασης της υπό εξέταση κορυφής στους προσβεβλημένους όνυχες από *T. rubrum* δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των χρονικών σημείων TP0 και TP38 (ANOVA, $p = 0.6$).



Εικόνα 35: Διαφορά φασμάτων των ονύχων που μετρήθηκαν πριν την χημική επεξεργασία των δειγμάτων (α) και μετά την εμφύσηση αυτών σε αιθυλική αλκοόλη για 20 ώρες (β) και των ονύχων μετά από την ξήρανση τους την νύχτα (TP38). Η οριζόντια γραμμή αντιστοιχεί σε μηδενική ένταση (δηλαδή τέλεια ομοιότητα μεταξύ των δύο φασμάτων).



Εικόνα 36: Η καμπύλη Gauss κοντά στην θέση 885 cm⁻¹ προσαρμοσμένη στο φάσμα Raman (Spectrum).



Γράφημα 1: Χρονική εξέλιξη της χαρακτηριστικής έντασης της κορυφής Raman της αιθυλικής αλκοόλης. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (ANOVA, $p \leq 0.001$) μεταξύ των control και των προσβεβλημένων ονύχων από *T. rubrum* με όριο 0.05, όπως προκύπτει από την ανάλυση two-way ANOVA και επακόλουθο έλεγχο με Tukey. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση (SD).

3.1.1 Διάκριση μεταξύ των υγιών και μυκητιασικών ονύχων

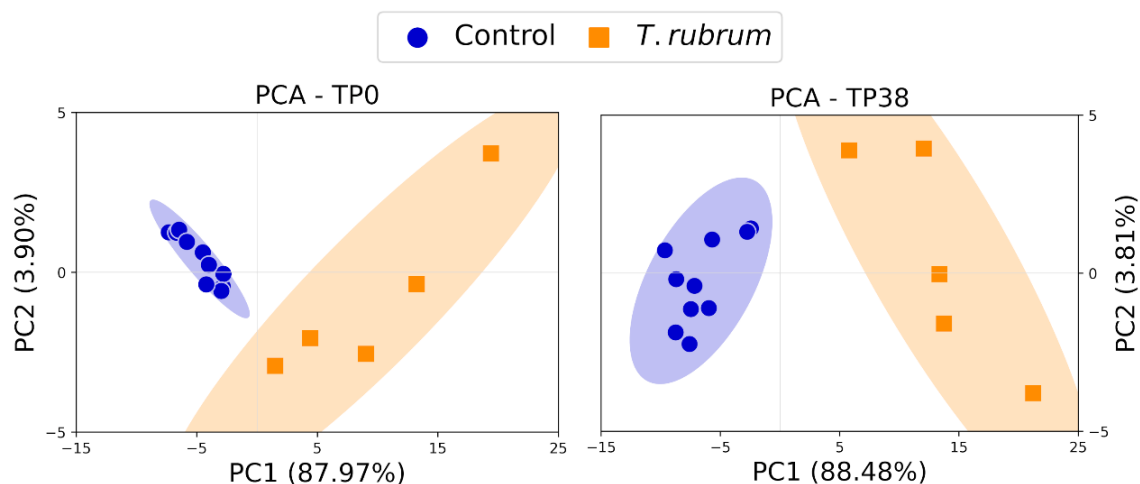
Στην ποσοτικοποίηση της επίδρασης της εμφάνισης σε αιθυλική αλκοόλη στα φάσματα Raman των υγιών ονύχων και των ονύχων με *T. rubrum*, εφαρμόστηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA). Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε μεταξύ δύο χρονικών σημείων μέτρησης (TP0 έναντι TP38). Οι τρεις πρώτες συνιστώσες κάθε ανάλυσης PCA εξήγησαν περισσότερο από το 90% της συνολικής διακύμανσης των δεδομένων. Συγκεκριμένα, η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) ήταν καθοριστική στην διάκριση μεταξύ των control και των ονύχων με μυκητίαση στις δύο αντίστοιχες αναλύσεις (PCA-TP0, PCA-TP38). Η διακύμανση που εξηγείται από την πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) ήταν 87.9% στο PCA-TP0 και 88.5% στο PCA-TP38.

Η Εικόνα 37 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης PCA μέσω των διαγραμμάτων των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών. Η ανάλυση PCA-TP0 (scores plot) απεικονίζει την ανάλυση των φασμάτων Raman των ονύχων πριν από την εμφάνιση σε αιθυλική αλκοόλη

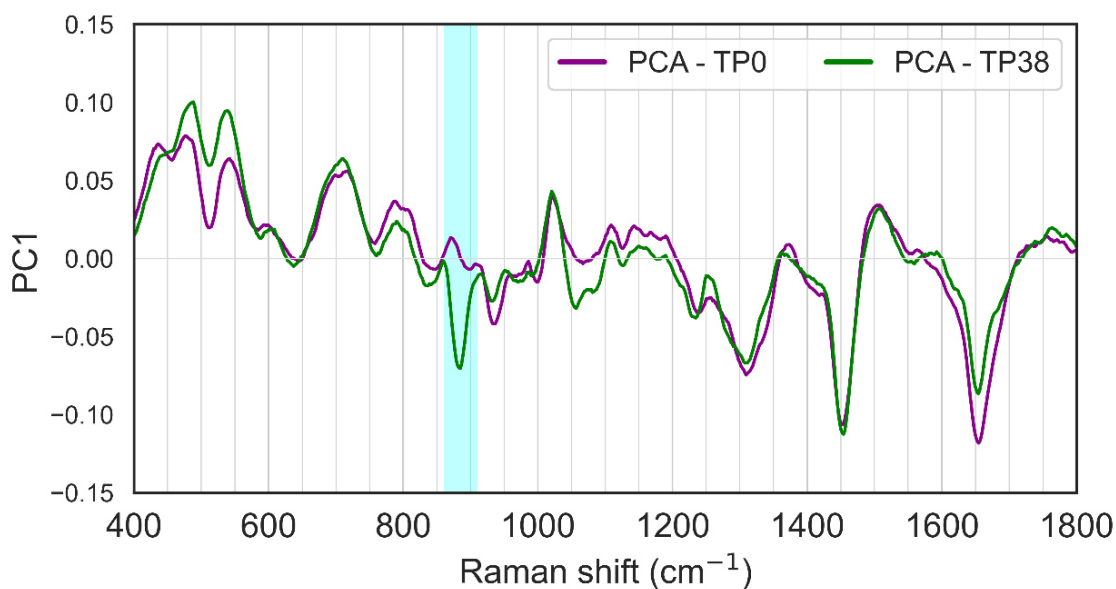
(χρονική στιγμή: TP0), και το PCA-TP38 αποτυπώνει τα αντίστοιχα αποτελέσματα μετά την εμβάπτιση σε αιθυλική αλκοόλη και την επακόλουθη ξήρανση (χρονική στιγμή: TP38).

Παρατηρείται μεγαλύτερη διασπορά των σημείων της ομάδας control στο PCA-TP38 σε σύγκριση με το PCA-TP0. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στις διαφορές του υπολειπόμενου όγκου αιθυλικής αλκοόλης στα δείγματα, οι οποίες επηρεάζουν την ένταση των χαρακτηριστικών κορυφών Raman που σχετίζονται με την αιθυλική αλκοόλη και αποτυπώνονται στην ανάλυση PCA.

Αν και ο διαχωρισμός μεταξύ των δειγμάτων control και των μολυσμένων ονύχων είναι ήδη διακριτός στο TP0, η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ομάδων καθίσταται ακόμη πιο έντονη μετά την εμβάπτιση σε αιθυλική αλκοόλη (Εικόνα 37). Οι φασματικές περιοχές που ευθύνονται για την διαφοροποίηση παρουσιάζονται στο διάγραμμα loadings (Διάγραμμα 3), το οποίο αποτυπώνει την συνεισφορά συγκεκριμένων δομικών χαρακτηριστικών της κερατίνης στην φασματική διαφοροποίηση και στις δύο περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, εντοπίζονται σημαντικές διαφοροποιήσεις στις περιοχές των S-S δεσμών ($500\text{--}520\text{ cm}^{-1}$), της α -έλικας της κερατίνης ($940\text{--}1024\text{ cm}^{-1}$), της φαινυλαλανίνης ($1004/1030\text{ cm}^{-1}$), καθώς και των αμιδικών δεσμών ($1350\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$). Ωστόσο, το γεγονός ότι ο διαχωρισμός των ομάδων καθίσταται ακόμη πιο έντονος μετά την εμβάπτιση σε αιθυλική αλκοόλη, υποδηλώνει τον ρόλο της στην διαφοροποίηση. Η χαρακτηριστική κορυφή του φάσματος της αιθυλικής αλκοόλης εμφανίζει αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των δύο ομάδων, ενισχύοντας την διάκριση και συμβάλλοντας στην βελτιωμένη ταξινόμηση των δειγμάτων.



Εικόνα 37: Ανάλυση PCA των μέσων φασμάτων Raman των control και των μολυσμένων ονύχων από *T. rubrum*. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα δείγμα στο δυσδιάστατο διάγραμμα της πρώτης έναντι της δεύτερης κύριας συνιστώσας (PC1 vs. PC2). Το διάγραμμα PCA-TP0 απεικονίζει τα αποτελέσματα της PCA πριν από την έκθεση των ονύχων σε αιθυλική αλκοόλη, ενώ το PCA-TP38 απεικονίζει την διάκριση των δειγμάτων μετά την εμβάπτιση σε αιθυλική αλκοόλη και την ξήρανση. Οι σκιασμένες περιοχές αντιπροσωπεύουν τις ελλείψεις εμπιστοσύνης 95%.

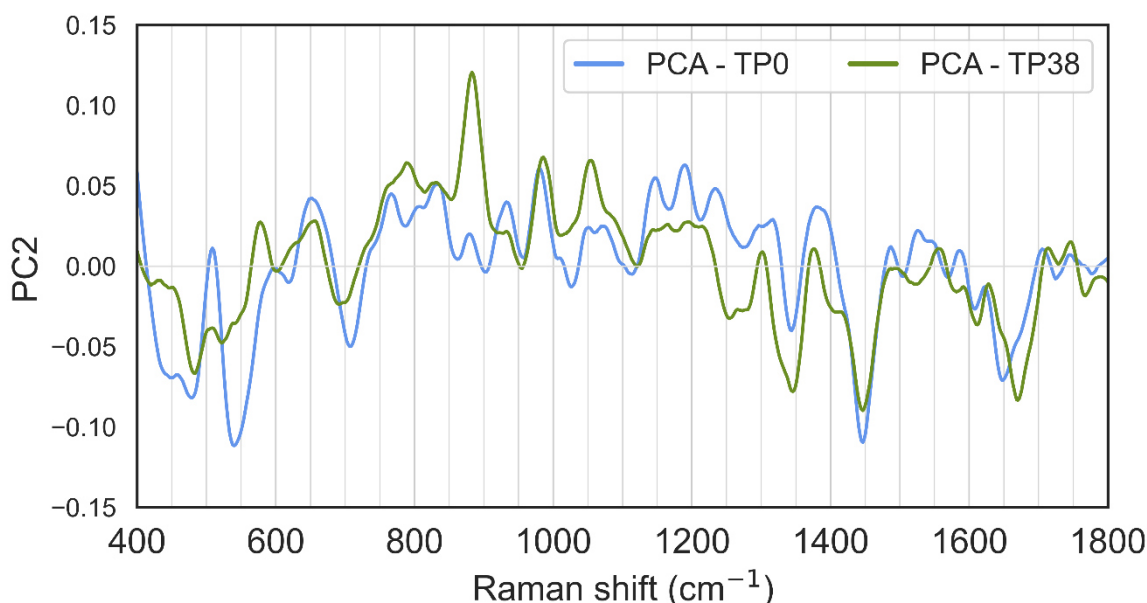


Διάγραμμα 3: Loadings plot της πρώτης κύριας συνιστώσας (PC1), για το PCA-TP0 και το PCA-TP38. Η σκιασμένη περιοχή αντιστοιχεί στην δόνηση $\nu_s(\text{CCO})$ της αιθυλικής αλκοόλης.

Επειδή οι κύριες συνιστώσες είναι παρόμοιας τάξης και συγκρίσιμης ισχύος στην εξήγηση των PCA διακυμάνσεων (δηλαδή, τα στοιχεία που συμβάλλουν στις μεγαλύτερες μεταβολές στα δεδομένα είναι ισχυρά και στις δύο ομάδες), υπολογίστηκε η Ευκλείδεια απόσταση για να μετρηθεί η διαφορά μεταξύ των Raman φασμάτων των δύο ομάδων δειγμάτων. Η Ευκλείδεια απόσταση ορίζεται ως η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών των συνιστωσών των ομάδων (clusters).(139) Οι Ευκλείδειες αποστάσεις στις ομάδες control και *T. rubrum* υπολογίστηκαν ως 14.3 και 19.9 για τα δείγματα στην αρχική μέτρηση (PCA-TP0) και μετά την εμβάπτιση σε αιθυλική αλκοόλη και ξήρανση κατά τη διάρκεια της νύχτας (PCA-TP38), αντίστοιχα.

Η διασπορά των σημείων των ονύχων με *T. rubrum*, εμφανίζεται κυρίως κατά μήκος του δεύτερου κύριου άξονα (PC2), και συνδέεται άμεσα με τον βαθμό αλλοίωσης της ονυχαίας πλάκας λόγω της προοδευτικής φθοράς της κερατίνης. Η μυκητιασική προσβολή από *T. rubrum* οδηγεί στην διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των αμινοξέων κυστεΐνης, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της κερατίνης.(140) Στο φάσμα Raman, η χαρακτηριστική κορυφή των δισουλφιδικών δεσμών εξασθενεί ή εξαφανίζεται επιβεβαιώνοντας την διάσπαση τους. Παράλληλα, παρατηρούνται μεταβολές στις περιοχές που σχετίζονται με C-S και C-C δεσμούς, υποδηλώνοντας την εκτεταμένη αποδόμηση των ινιδίων κερατίνης.(103)

Στο loading plot (Διάγραμμα 4) του PC2 ξεχωρίζουν τα φασματικά χαρακτηριστικά γύρω από τα 500–520 cm^{-1} , τα οποία αντιστοιχούν στους δισουλφιδικούς δεσμούς (S–S) της κερατίνης. Αυτό υποδηλώνει ότι η δεύτερη κύρια συνιστώσα (PC2) αντανακλά τις διαρθρωτικές αλλοιώσεις της κερατίνης που προκαλούνται από τη μυκητιασική προσβολή από *T. rubrum*.



Διάγραμμα 4: Loadings plot του PC2 για το PCA-TP0 και το PCA-TP38. Τα φασματικά χαρακτηριστικά με σημαντική συνεισφορά εντοπίζονται στις δονήσεις $\nu(S-S)$ και $\nu(CCO)$.

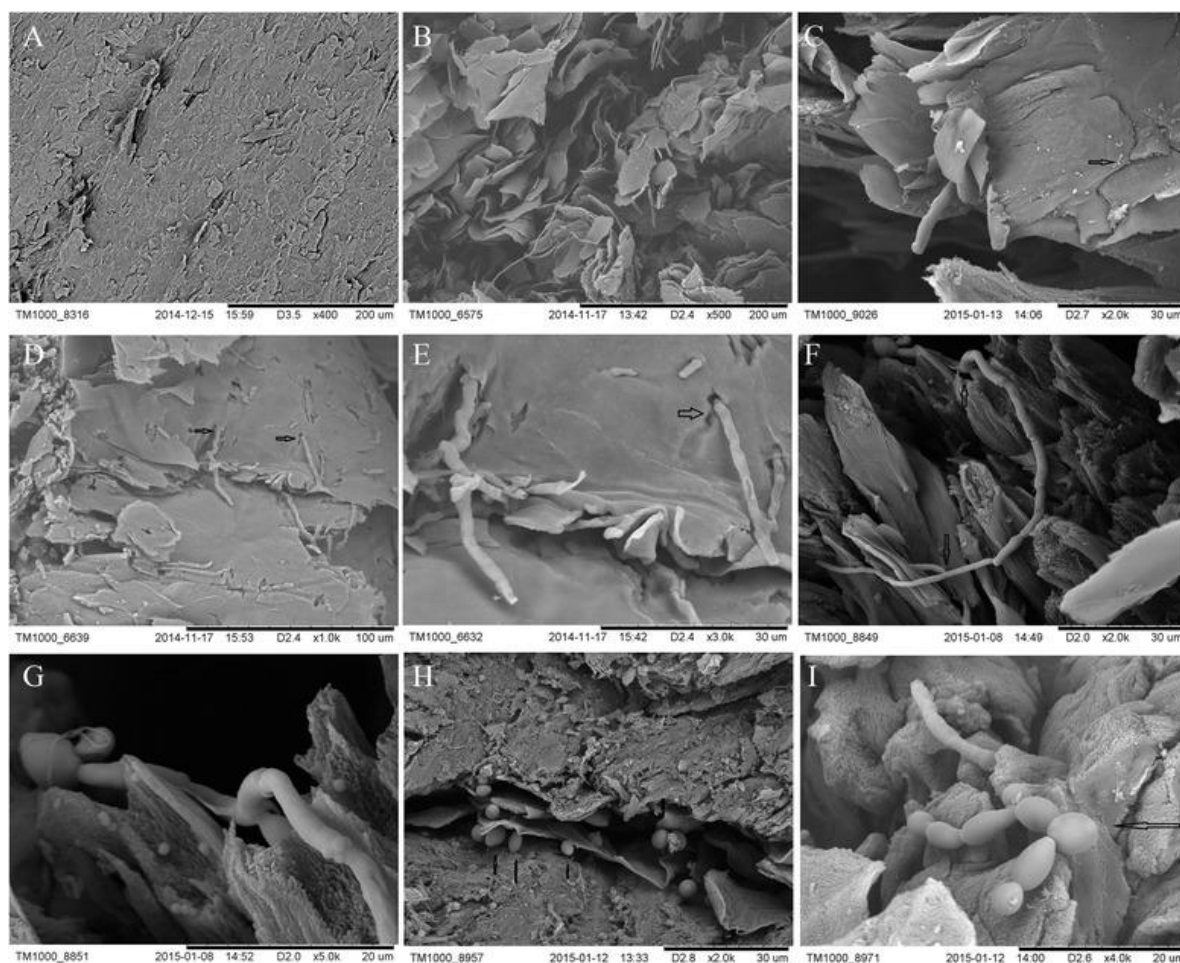
Συνολικά, η βελτιωμένη διάκριση μεταξύ των δειγμάτων control και αυτών που έχουν επιμολυνθεί από *T. rubrum*, αποδίδεται στην εμβάπτιση σε αιθυλική αλκοόλη. Αν και απαιτούνται επιπλέον δεδομένα για να υποστηριχθεί η διαφορά με βάση ένα μοντέλο επαγόμενου φαινομένου εξάτμισης, τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ήδη ότι υπάρχει μια ημι-εμπειρική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού συγκράτησης της αιθυλικής αλκοόλης στα δείγματα ονύχων και των δομικών αλλαγών που προκαλούνται από τον μύκητα στους προσβεβλημένους όνυχες από *T. rubrum*.

Δεδομένου ότι η ταχύτητα εξάτμισης εξαρτάται άμεσα από την επιφάνεια εξάτμισης του υγρού, προτείνουμε ότι η παρουσία του *T. rubrum* μεταβάλλει την πορωσιμότητα των ονύχων, γεγονός που επηρεάζει αφενός την έκτασή τους που εκτίθεται στον αέρα (αυξάνοντας μικροδομές και κοιλότητες μέσω των οποίων διευκολύνεται η εξάτμιση), και αφετέρου τον συνολικό όγκο του διαλύτη που μπορεί να κατακρατηθεί στους ιστούς των ονύχων.

Στην ονυχομυκητίαση, τα δερματόφυτα καταστρέφουν προοδευτικά την συμπαγή δομή της ονυχαίας πλάκας, σχηματίζοντας μικροσκοπικά συρίγγια στους όνυχες. Σε μελέτη που διεξήχθη σε 6 δείγματα ονύχων με επιβεβαιωμένη λοίμωξη (ονυχομυκητίαση) από *T. rubrum*, με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (SEM), παρατηρήθηκαν τα χαρακτηριστικά κανάλια και κοιλότητες στην ονυχαία πλάκα, ως αποτέλεσμα της διείσδυσης των μυκητιακών υφών. Οι υφές, με διάμετρο 1–2 μm , όπως μετρήθηκε με το SEM, εντοπίστηκαν κυρίως στην κοιλιακή επιφάνεια της ονυχαίας πλάκας. Η έκταση της προσβολής ήταν σημαντική, καθώς παρατηρήθηκε μεγάλος αριθμός υφών να διαπερνούν

τα στρώματα της ονυχαίας πλάκας, προκαλώντας διαταραχή της αρχιτεκτονικής των ονύχων. Οι υφές εμφανίστηκαν ευθείες ή διακλαδισμένες, με ομαλή επιφάνεια, ενώ ορισμένες παρουσιάστηκαν καμπυλωτές ή αφυδατωμένες. Παρόλο που ο όγκος και το όριο της βλάβης δεν εκτιμήθηκαν ποσοτικά, από την ανάλυση των φωτογραφιών (Εικόνα 38) φάνηκε ότι η δομική αποδιοργάνωση ήταν εκτεταμένη. Οι υφές διασπούσαν την κερατίνη, προκαλώντας αποκόλληση των κυττάρων και την δημιουργία κοιλοτήτων που προσομοίαζαν μικροσκοπικά συρίγγια. Η παρουσία υφών καταγράφηκε σε πολλαπλές θέσεις μεταξύ διαφορετικών ασθενών, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μοτίβο διείσδυσης ενδέχεται να διαφέρει ανάλογα με την σοβαρότητα και την φάση της λοίμωξης.(61) Κατά την έκθεση των ονύχων στο διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης, η αυξημένη πορωσιμότητα επιτρέπει την κατακράτηση μεγαλύτερων όγκων διαλύτη σε σχέση με τους control όνυχες. Ωστόσο, η επώαση υγιών ονύχων σε υδροαιθυλικά μείγματα αυξάνει την μικροπορώδη δομή τους, δημιουργώντας συνθήκες που ευνοούν την κατακράτηση μεγαλύτερης ποσότητας διαλύτη.(137)

Τα αποτελέσματα μας αντικατοπτρίζουν διαφορές στην κατανομή του εγκλωβισμένου διαλύτη εντός των δειγμάτων ονύχων. Προτείνουμε ότι μετά την διαδικασία ξήρανσης (18 ώρες στους 40°C) που ακολούθησε την εμβάπτιση των δειγμάτων ονύχων στο διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης, οι παρατηρούμενες διαφορές στους ρυθμούς συγκράτησης αιθυλικής αλκοόλης μεταξύ των control και των δειγμάτων με ονυχομυκητίαση αποδίδονται κυρίως σε διαφορές στους ρυθμούς εξάτμισης (λόγω επαγόμενης ξήρανσης) παρά στις αρχικά εναποτιθέμενες ποσότητες αιθυλικής αλκοόλης. Φαίνεται ότι η ανάπτυξη του *T. rubrum* διαταράσσει την μικροσωληνώδη δομή των ονύχων που θα μπορούσε να λειτουργεί ως αποθήκη διαλυτών, διατηρώντας το διαλύτη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα υπό τις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες.



Εικόνα 38: (Α) Η κοιλιακή επιφάνεια της ονυχίας πλάκας από υγιή όνυχα (control). Η ονυχία πλάκα ήταν ακέραια χωρίς ορατές φθορές. (SEM, $\times 400$). (Β) Η κοιλιακή επιφάνεια της ονυχίας πλάκας της περίπτωσης 1. Η ονυχία πλάκα παρουσίαζε σημαντικές φθορές, με χαλαρή στρωματοποίηση και ακανόνιστη μορφή. (SEM, $\times 500$). (C) Η κοιλιακή επιφάνεια της ονυχίας πλάκας της περίπτωσης 1. Υφές διαπερνούσαν το λεπτό στρώμα των κερατινοκυττάρων. Το στρώμα των κερατινοκυττάρων είχε διάσπαρτα βακτήρια (βέλος). (SEM, $\times 2000$). (D) Η ονυχία πλάκα της περίπτωσης 1 έδειξε σημαντική φθορά, δομική αταξία και πολλές υφές που διαπερνούσαν το λεπτό στρώμα των κερατινοκυττάρων (βέλος). (SEM, $\times 1000$). (E) Τοπική μεγέθυνση της Εικόνα 38 (D): ορατές υφές που διαπερνούσαν την ονυχία πλάκα (βέλη). Ορισμένες υφές ήταν μαλακές, άλλες αφυδατωμένες, με λεία επιφάνεια χωρίς τοπική καταστροφή, χωρίς ορατά σπόρια. (SEM, $\times 3000$). (F) Η εικόνα της περίπτωσης 2 έδειχνε υφές με εκβλάστηση και διακλάδωση που διαπερνούσαν τα στρωματοποιημένα κερατινοκύτταρα. (SEM, $\times 2000$) (G) Τοπική μεγέθυνση της Εικόνα 38 (F): Είναι ορατές οι υφές με εκβλάστηση και διακλάδωση. (SEM, $\times 5000$) (H) Η εικόνα της περίπτωσης 3. Ήταν ορατοί υπονύχιοι ζυμομύκητες. (SEM, $\times 2000$). (I) Η εικόνα της περίπτωσης 4. Υπήρχαν υπονύχιοι υφές και ψευδοϋφές. (SEM, $\times 4000$) (61)

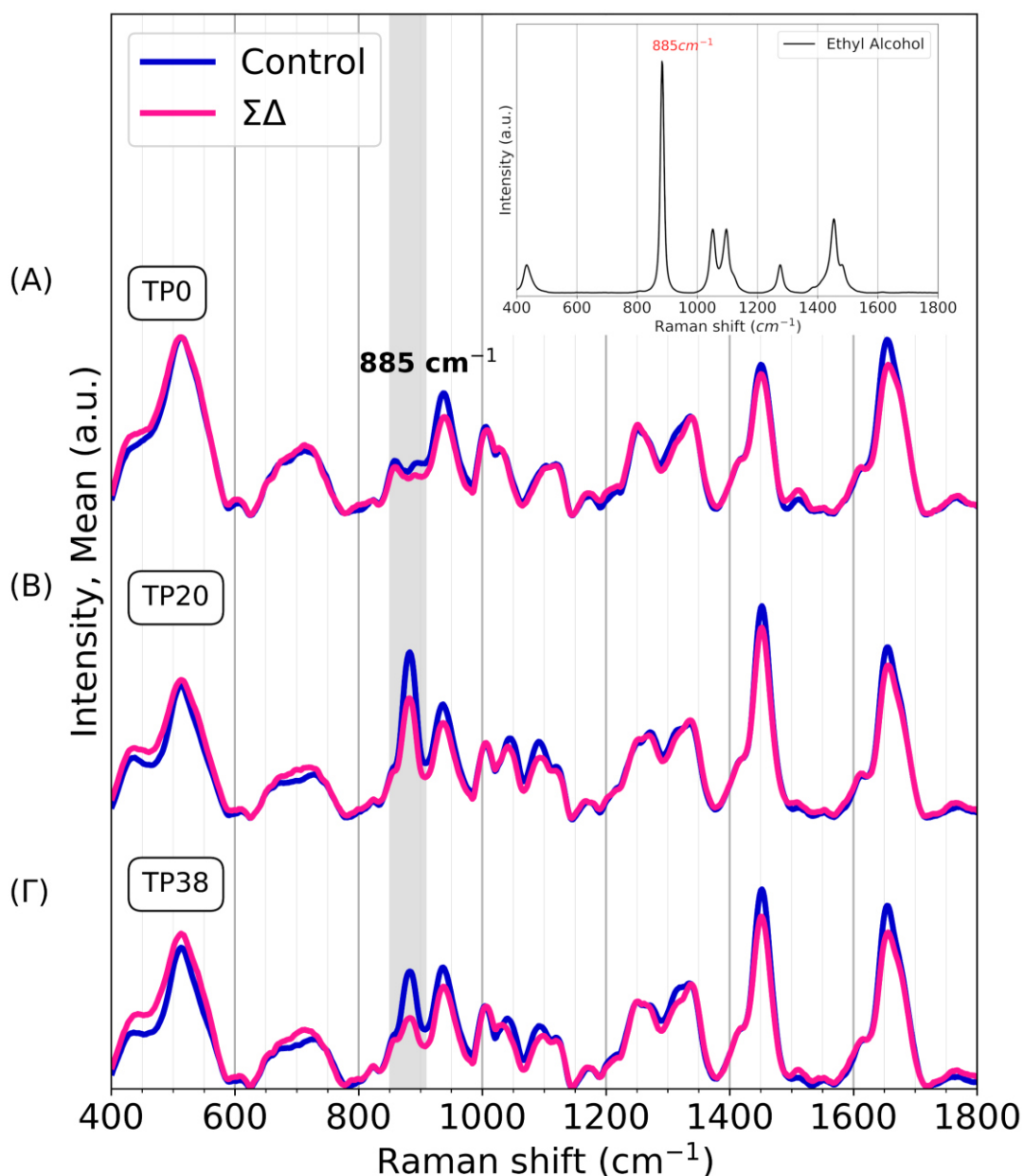
3.2 Παθολογία ονύχων σε διαβητικούς ασθενείς

Στην συνέχεια, διερευνήθηκε η δυνατότητα της φασματοσκοπίας Raman να ανιχνεύει μεταβολές στην χημική σύσταση των ονύχων, που προκλήθηκαν από την μεταβολική νόσο του σακχαρώδη διαβήτη. Τα δείγματα ονύχων που εξετάστηκαν ανήκαν στις κατηγορίες: «control» (n=19) και «Πάσχοντες από σακχαρώδη διαβήτη» (n=16). Η κατηγορία των control περιλάμβανε άνδρες και γυναίκες (αναλογία 12:7) με μέση ηλικία 28 έτη (εύρος:25-30) και επίπεδα HbA1c εντός φυσιολογικών ορίων (<5.7%). Η κατηγορία των διαβητικών αποτελούνταν από 13 άνδρες και 3 γυναίκες (αναλογία 13:3), με μέση ηλικία 67 έτη (29-93 χρονών) και μέσο όρο HbA1c 7.4% (εύρος: 6.5-11%). Κατά την ανάλυση PCA, οι πάσχοντες από σακχαρώδη διαβήτη διαχωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες: ρυθμισμένος διαβήτης (P) και αρρύθμιστος (A) σύμφωνα με την τιμή της γλυκοζυλιωμένης (HbA1c) και την βιβλ. αναφορά (74), με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασης της αύξησης του γλυκαιμικού δείκτη στην διάκριση των δειγμάτων. Το όριο του διαχωρισμού ήταν η τιμή 7.5% (HbA1c). Στην κατηγορία των ασθενών με ρυθμισμένο διαβήτη περιλαμβάνονταν 7 άνδρες και 1 γυναίκα (70.5 χρόνια, 61-93 χρονών) με HbA1c 6.5% (6.5-7.0%), ενώ η αντίστοιχη με αρρύθμιστο διαβήτη περιλάμβανε 6 άνδρες και 2 γυναίκες (59 χρόνια, 29-84 χρονών) με υψηλότερα επίπεδα HbA1c (μέσος όρος: 9.1%, εύρος 7.5-11.0%). (Πίνακας 3) Παρατηρείται ότι σε όλες τις κατηγορίες υπερισχύει το ανδρικό φύλο.

Πίνακας 3: Δημογραφικά στοιχεία και τιμές HbA1c των συμμετεχόντων ανά κατηγορία ονύχων (Control, Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ), Ρυθμισμένος (ΡΣΔ) και Αρρύθμιστος (ΑΣΔ) Σακχαρώδης Διαβήτης). Περιλαμβάνονται φύλο, μέση ηλικία και τιμή HbA1c με εύρος τιμών για κάθε ομάδα.

Κατηγορίες ονύχων	Φύλο		Ηλικία (χρόνια)	HbA1c (%)
	Άνδρας	Γυναίκα	Μέσος όρος	Μέσος όρος
Control	12	7	28 (25-30)	<5.7
ΣΔ	13	3	67 (29-93)	7.4 (6.5-11.0)
ΡΣΔ	7	1	70.5 (61-93)	6.5 (6.5-7.0)
ΑΣΔ	6	2	59 (29-84)	9.1 (7.5-11)

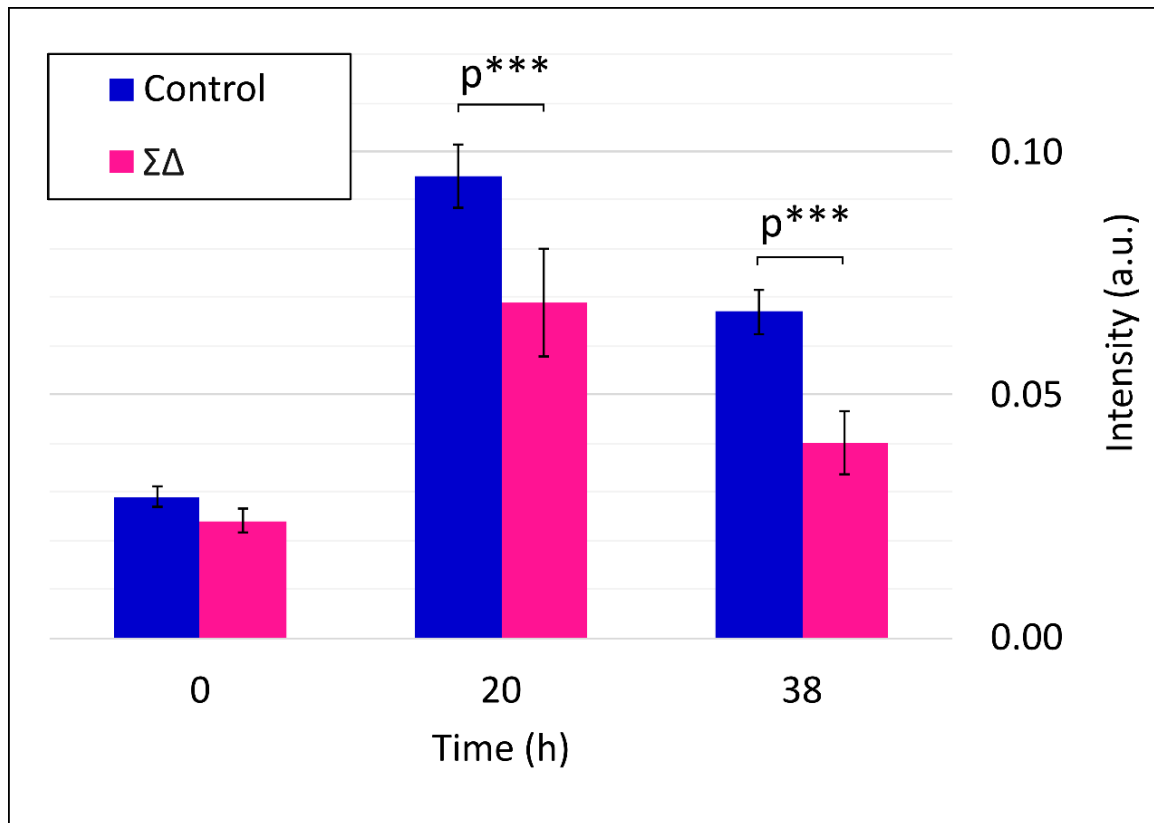
Η φασματοσκοπική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στις χρονικές στιγμές TP0, TP20 και TP38. (Εικόνα 39) Οι κυριότερες διαφοροποιήσεις μεταξύ control και διαβητικών εντοπίστηκαν στους αμιδικούς δεσμούς της κερατίνης.



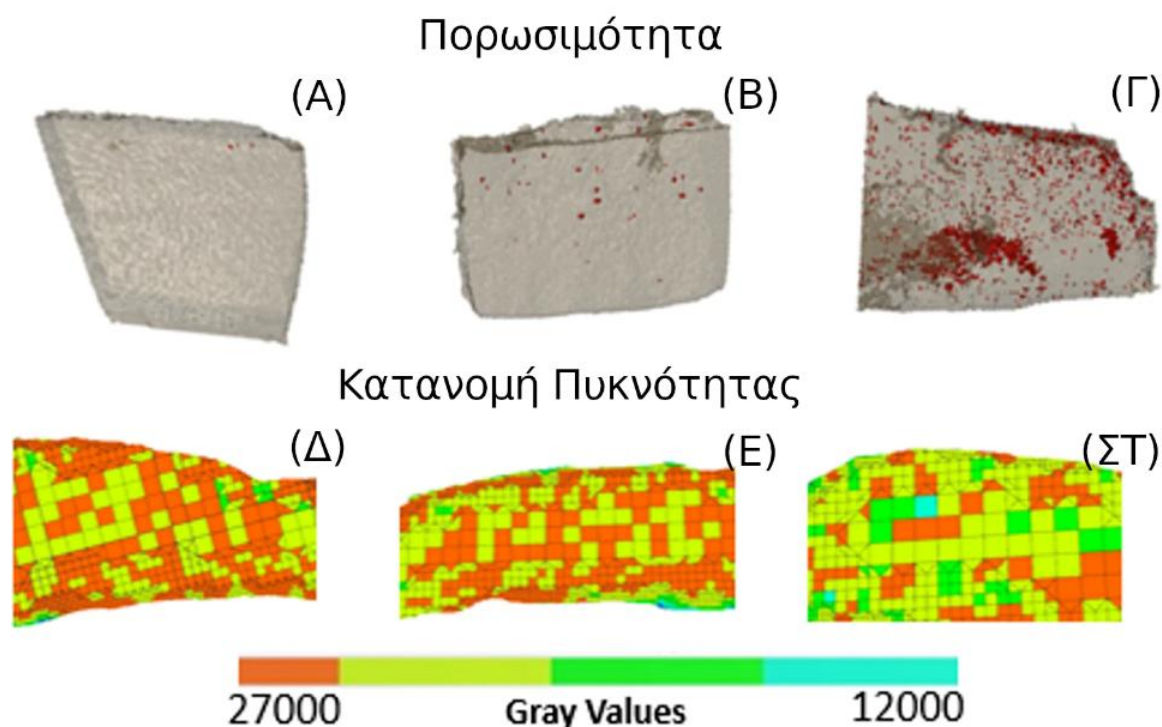
Εικόνα 39: Τα μέσα φάσματα των ονύχων από control και διαβητικούς εξετάστηκαν στο φασματικό εύρος 400-1800 cm^{-1} σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (TPs). (Α) Φάσματα Raman των ονύχων χωρίς χημική επεξεργασία (TP: 0 ώρες). (Β) Φάσματα των ονύχων αμέσως μετά από την εμφάνιση σε αιθυλική αλκοόλη στην χρονική στιγμή TP20. (Γ) Φάσματα των ονύχων μετά από ξήρανση για 38 ώρες (TP: 38 ώρες). Στην ένθετη εικόνα απεικονίζεται το φάσμα της αιθυλικής αλκοόλης.

3.2.1 Επίδραση της εμφάνισης σε αιθυλική αλκοόλη

Με αφορμή το εύρημα της προηγούμενης ενότητας, διερευνήθηκε η επίδραση της εμφάνισης και ξήρανσης στους όνυχες. Η φασματοσκοπική ανάλυση αποκάλυψε παρόμοιο φασματικό μοτίβο. Συγκεκριμένα, η χαρακτηριστική κορυφή στα 885 cm^{-1} ήταν παρούσα, αλλά η έντασή της μειώθηκε σημαντικά στους διαβητικούς όνυχες μετά από την ξήρανση κατά τη διάρκεια της νύχτας. Αντίθετα, στα δείγματα control, η εν λόγω κορυφή παραμένει εμφανής, ακόμη και μετά από παρατεταμένη ξήρανση στους 40°C . (Εικόνα 39B και Εικόνα 39Γ) Η κορυφή στην θέση 885 cm^{-1} αποδίδεται στην συμμετρική δόνηση της αιθανόλης.(138) Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του ρυθμού εξάτμισης της αιθυλικής αλκοόλης παρουσιάζονται στο Γράφημα 2. Στην ομάδα control, η κορυφή στα 885 cm^{-1} εμφάνισε υψηλή ένταση μετά την έκθεση στην αιθυλική αλκοόλη και την επώαση σε φούρνο, στις χρονικές στιγμές μέτρησης TP20 και TP38. Αντίστοιχη τάση παρατηρήθηκε και στους διαβητικούς όνυχες. Ωστόσο, η ένταση της κορυφής ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με των υγιών σε όλες τις χρονικές στιγμές, και ιδιαίτερα στα χρονικά σημεία TP20 και TP38 (20 και 38 ώρες, ANOVA, $p < 0.001$). Η διαφοροποίηση στον ρυθμό εξάτμισης του διαλύτη εντός του ίδιου χρονικού διαστήματος φαίνεται να σχετίζεται με την αλλαγή στην πορωσιμότητα των διαβητικών ονύχων, καθώς πρόσφατη μελέτη πρότεινε ότι αυξάνεται ανάλογα με την σοβαρότητα της νόσου, γεγονός που οδηγεί στην μείωση της πυκνότητας κατανομής των συστατικών της.(74) Η μελέτη είχε διεξαχθεί με σκοπό τον ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτηρισμό της ονυχιαίας πλάκας των ονύχων. Ο προσδιορισμός της πορωσιμότητας και της κατανομής πυκνότητας πραγματοποιήθηκε στα δείγματα ονύχων με τομογραφία ακτίνων Χ υψηλής ανάλυσης (Nano CT) με το σύστημα Phoenix Nanotom S (GE Sensing and Inspection Technologies). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 40. Συγκεκριμένα, οι πόροι της ονυχιαίας πλάκας εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα στην Εικόνα 40Α–Γ για τις ομάδες των υγιών, των ασθενών με ρυθμισμένο σακχαρώδη διαβήτη (ΡΣΔ) και με αρρύθμιστο (ΑΣΔ), αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι η πορωσιμότητα είναι χαμηλή στην ομάδα των υγιών, μέτρια στην ομάδα των ΡΣΔ και σημαντικά αυξημένη στην ομάδα ΑΣΔ. Επιπλέον, η κατανομή πυκνότητας εμφανίζεται στην Εικόνα 40Δ–ΣΤ για τις ομάδες των υγιών, ΡΣΔ και ΑΣΔ, αντίστοιχα. Στις εικόνες αυτές, οι περιοχές με υψηλότερη πυκνότητα εμφανίζονται με πορτοκαλί χρώμα, υποδηλώνοντας την παρουσία του ασβεστίου, το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με EDXS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy). Το ασβέστιο είναι βασικό συστατικό της ονυχιαίας πλάκας και μειώθηκε προοδευτικά από τους υγιείς προς τους αρρύθμιστους διαβητικούς, υποδηλώνοντας μειωμένη δομική ακεραιότητα.



Γράφημα 2: Χρονική εξέλιξη της χαρακτηριστικής έντασης της κορυφής Raman της αιθυλικής αλκοόλης. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (ANOVA, $p \leq 0.001$) μεταξύ των control και των διαβητικών ονύχων βάσει two-way ANOVA και ελέγχου Tukey.



Εικόνα 40: Περιγραφή της πορωσιμότητας και της κατανομής πυκνότητας σε όνυχες υγιών, ασθενών με ρυθμισμένο διαβήτη (ΡΣΔ) και αρρύθμιστο (ΑΣΔ) (Α, Δ: υγιείς, Β, Ε: ΡΣΔ, Γ, ΣΤ: ΑΣΔ).(74)

3.2.2 Διάκριση μεταξύ των υγιών και διαβητικών ονύχων

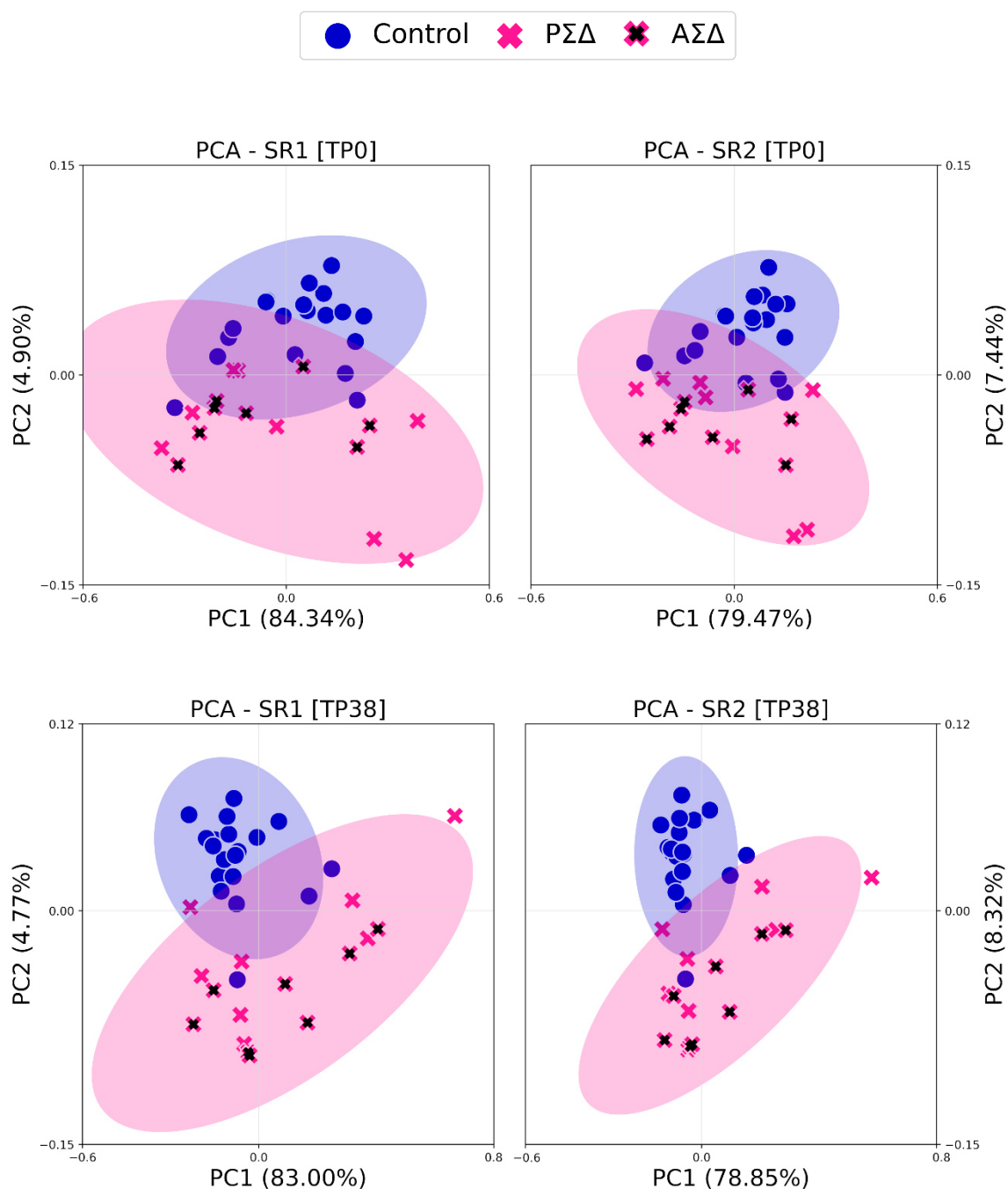
Στην συνέχεια, μελετήθηκε η διάκριση των ονύχων μέσω ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) στο φασματικό εύρος (SR):

SR1: 400–1800 cm^{-1} [PCA-SR1] και SR2: 800–1800 cm^{-1} [PCA-SR2]

για τις δύο χρονικές στιγμές TP0 και TP38, χρησιμοποιώντας την μέση τιμή των μετρήσεων για κάθε δείγμα. Το φασματικό εύρος SR1 αντιστοιχεί στο φασματικό αποτύπωμα (fingerprint region) των ονύχων, ενώ αντίθετα το SR2 συμπίπτει με το φάσμα Raman των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs), ο σχηματισμός των οποίων έχει συνδεθεί με τον σακχαρώδη διαβήτη.(141)

Σε κάθε ανάλυση PCA, οι διαβητικοί ασθενείς χωρίστηκαν στις δύο κατηγορίες που αναφέρθηκαν παραπάνω (Ρ και Α), και κάθε σημείο στις αναλύσεις αντιπροσωπεύει έναν ξεχωριστό όνυχα από το αντίστοιχο δείγμα. Στην απεικόνιση των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών (PC1–PC2), παρατηρήθηκε μερικός διαχωρισμός μεταξύ των control και διαβητικών δειγμάτων κατά μήκος της PC2. (Εικόνα 41) Δεν προέκυψε σαφής

διαφοροποίηση μεταξύ των υποκατηγοριών P και A, γεγονός που πιθανώς αντιστοιχεί σε κοινά μεταβολικά χαρακτηριστικά ή επιρροή μη-ελεγχόμενων παραγόντων, όπως η διατροφή(142,143) και η φαρμακευτική αγωγή.(144)



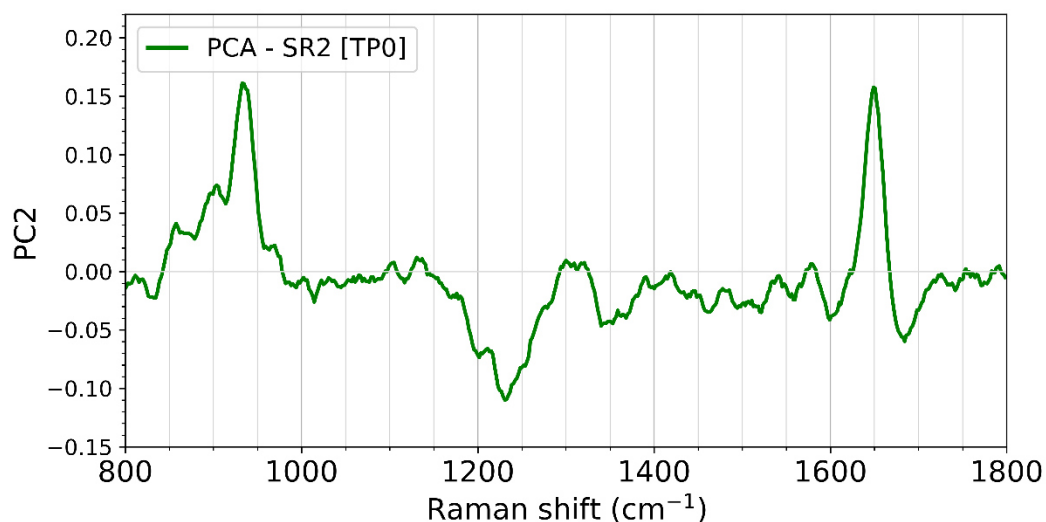
Εικόνα 41: Ανάλυση PCA των φασμάτων Raman από υγιείς και διαβητικούς όνυχες.

Τα ποσοτικά στοιχεία των αναλύσεων PCA, συμπεριλαμβανομένων των ποσοστών διακύμανσης των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών και των υπολογισμένων ευκλείδειων αποστάσεων εντός και μεταξύ ομάδων, παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 4. Τα ποσοστά διακύμανσης που εξηγούνται από την PC1 κυμάνθηκαν από 78.85% έως 84.34%, ενώ η PC2 εξηγεί επιπλέον 4.77% έως 8.32% της διακύμανσης. Οι ευκλείδειες αποστάσεις μεταξύ των ομάδων ήταν χαμηλές (0.1–0.2), επιβεβαιώνοντας την παρατηρούμενη μερική επικάλυψη. Οι ευκλείδειες αποστάσεις εντός ομάδων κυμαίνονται μεταξύ 0.1 ± 0.1 και 0.3 ± 0.1 , με ελαφρώς μεγαλύτερη διασπορά στους διαβητικούς, ιδίως στο SR1-TP0 και SR1-TP38. Η ανάλυση PCA-SR2 [TP0] κρίνεται η καταλληλότερη στην διάκριση, καθώς η PC2 εξηγεί το 7.44% της διακύμανσης, την δεύτερη υψηλότερη τιμή μεταξύ όλων των αναλύσεων, και οι ενδο-ομαδικές αποστάσεις είναι οι χαμηλότερες, στοιχείο που υποδηλώνει υψηλή ομοιογένεια εντός ομάδων και καλή κατανομή των δεδομένων στον χώρο των κύριων συνιστωσών.

Πίνακας 4: Σύνοψη της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) για διαφορετικές φασματικές περιοχές (SR) και χρονικά σημεία (TP). Παρουσιάζεται το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης που αποδίδεται στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες (PC1, PC2), καθώς και οι Ευκλείδειες αποστάσεις μεταξύ των ομάδων (Control, Διαβητικοί (ΣΔ)) και εντός των ομάδων (μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση).

PCA	PCs		Ευκλείδεια απόσταση (μεταξύ ομάδων)	Ευκλείδεια απόσταση (εντός ομάδων)	
	PC1 (%)	PC2 (%)	Control, ΣΔ	Control	ΣΔ
PCA – SR1 [TP0]	84.34	4.90	0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
PCA – SR2 [TP0]	79.47	7.44	0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
PCA – SR1 [TP38]	83.00	4.77	0.1	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1
PCA – SR2 [TP38]	78.85	8.32	0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1

Το αντίστοιχο loading plot ανέδειξε ως σημαντικούς τους κυματάριθμους 938 cm^{-1} και 1654 cm^{-1} , οι οποίοι εξετάζονται αναλυτικά στην επόμενη ενότητα.



Διάγραμμα 5: Η συνεισφορά του φασματικού εύρους SR2 στην ανάλυση PCA στην χρονική στιγμή TP0. Οι φασματικές περιοχές με υψηλή ένταση αντιπροσωπεύουν τους κυματάριθμους που συνεισφέρουν περισσότερο στην διάκριση μεταξύ control και διαβητικών δειγμάτων.

3.2.3 Ανάλυση κορυφών

Η λεπτομερής φασματική ανάλυση των επιμέρους φασμάτων [TP0], πραγματοποιήθηκε με ολοκλήρωση των κορυφών και υπολογισμό των μέσων τιμών της θέσης (Raman shift), της έντασης (Intensity) και του εμβαδού (Band area) στο αποτύπωμα των ονύχων. (Πίνακας 5)

Πίνακας 5: Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις των παραμέτρων των καμπυλών Gauss για τους control και διαβητικούς όνυχες (ΣΔ) στην χρονική στιγμή TPO. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των control και των διαβητικών. Βιβλ. Αναφορές: (103,104,145)

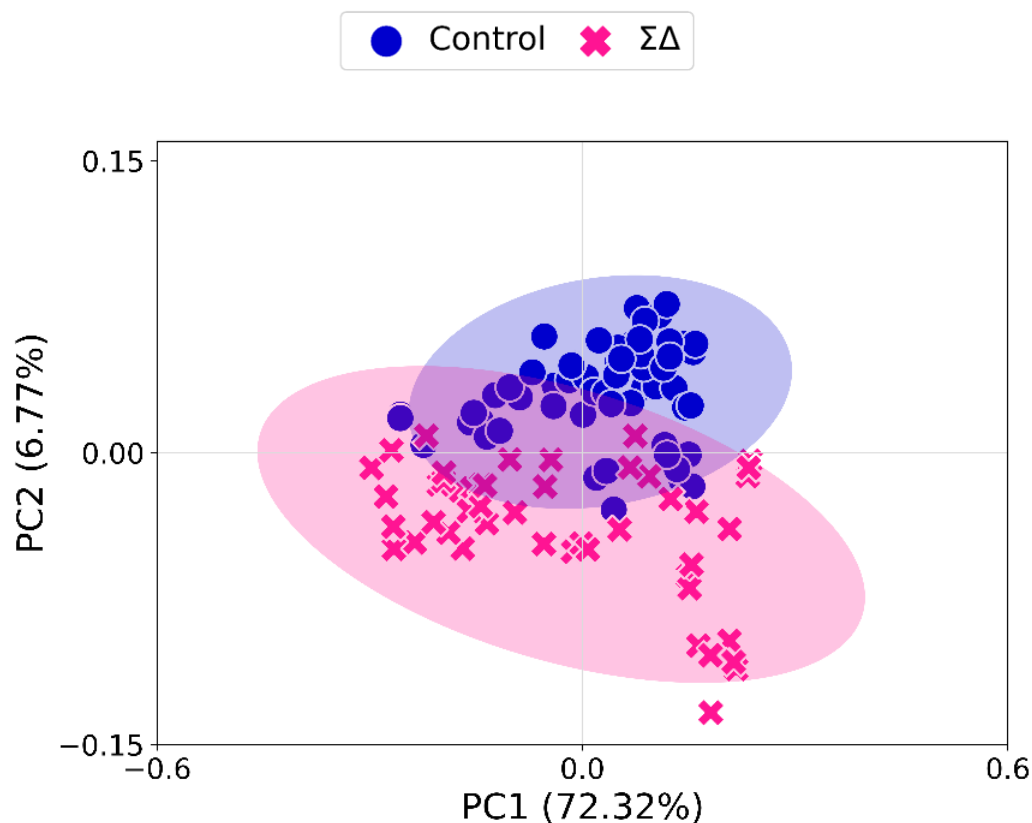
Αντιστοίχιση κορυφών	Raman shift (cm ⁻¹)		Band area (x10)		Intensity (x100 a.u.)	
	Control	ΣΔ	Control	ΣΔ	Control	ΣΔ
$\nu(\text{S-S})$ (g - g - g), Κερατίνη	504 ± 4	504 ± 5	16.0 ± 3.0	17.0 ± 5.0	4.4 ± 0.8	4.5 ± 0.9
$\nu(\text{S-S})$ (g - g - t), Κερατίνη	524 ± 4	525 ± 4	11.0 ± 4.0	9.0 ± 5.0	3.0 ± 1.0	3.0 ± 1.0
$\nu(\text{S-S})$ (t - g - t), Κερατίνη	547 ± 3	546 ± 4	9.0 ± 3.0	10.0 ± 4.0	2.7 ± 0.9	2.9 ± 1.0
$\nu(\text{C-C})$ skeletal, α - έλικα, Κερατίνη	939 ± 1	940 ± 1 ***	12.0 ± 1.0	11.0 ± 1.0 **	4.2 ± 0.5	3.3 ± 0.5 ***
$\nu(\text{C-C})$ aromatic, Φαινυλαλανίνη	1005 ± 1	1005 ± 1	7.8 ± 0.6	7.9 ± 1.3	3.4 ± 0.5	3.2 ± 0.7
$\nu(\text{C-H})$, Φαινυλαλανίνη	1033 ± 2	1032 ± 4	7.0 ± 2.0	9.0 ± 4.0	2.5 ± 0.6	2.8 ± 1.0
$\nu(\text{C-O})$, $\delta(\text{CH}_3)$ rocking, $\nu(\text{C-N})$, Καρβοξυμεθυλλυσίνη	1123 ± 1	1122 ± 2	3.8 ± 0.6	4.2 ± 1.0	1.9 ± 0.3	1.9 ± 0.5
$\delta(\text{CH}_2)$ scissoring, Αμίδιο II	1453 ± 1	1453 ± 1	26.0 ± 6.0	23.0 ± 9.0	8.0 ± 2.0	7.0 ± 2.0
$\nu(\text{C=O})$ α - έλικα, Αμίδιο I	1652 ± 2	1652 ± 2	16.0 ± 3.0	12.0 ± 4.0 *	6.0 ± 1.0	5.0 ± 1.0 ***
$\nu(\text{C=O})$ β - πτυχωτή επιφάνεια, Αμίδιο I	1674 ± 3	1674 ± 3	18.0 ± 4.0	19.0 ± 4.0	5.1 ± 0.8	5.2 ± 0.8

Οι κορυφές που αντιστοιχούν στις διαμορφώσεις των δισουλφιδικών δεσμών (*g-g-g*, *g-g-t*, *t-g-t*) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ control και διαβητικών δειγμάτων (ANOVA, $p \geq 0.5$), επιβεβαιώνοντας ότι δεν συμμετέχουν στην διάκριση. Η θέση της δόνησης της α -έλικας της κερατίνης παρουσίασε σημαντική μετατόπιση (ANOVA, $p < 0.001$), και μείωση της ποσότητας της στους διαβητικούς όνυχες, όπως φάνηκε από τις μικρότερες τιμές έντασης και εμβαδού (ANOVA, εμβαδόν: $p < 0.01$, ένταση: $p < 0.001$). Παρόλο που το αμίδιο II δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων δειγμάτων, το αμίδιο I εμφάνισε αλλοιώσεις. Συγκεκριμένα, η φασματική περιοχή που αποδίδεται στην α -έλικα παρουσίασε σημαντική μείωση τόσο στο εμβαδόν (ANOVA, $p < 0.05$) όσο και στην ένταση (ANOVA, $p < 0.001$) στους διαβητικούς όνυχες. Οι παρατηρούμενες διαφορές υποδεικνύουν πιθανές διαταραχές στην δευτεροταγή δομή της κερατίνης των διαβητικών ονύχων, οι οποίες ενδέχεται να συνδέονται με μεταβολές στην σύσταση ή/και στην οργάνωση των ινιδίων κερατίνης. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με την μελέτη των Veras et al.(104) ως προς τις διαφοροποιήσεις στην δευτεροταγή δομή της κερατίνης σε διαβητικούς όνυχες. Όμως σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της διατριβής, η αποσυνέλιξη των αμιδίων έδειξε αυξημένο εμβαδόν της κορυφής α -έλικας (1654 cm^{-1}) στους διαβητικούς ασθενείς, ενώ στους υγιείς επικρατούσε η β -πτυχωτή επιφάνεια (1622 cm^{-1}). Η αντίθεση των αποτελεσμάτων μπορεί να έγκειται στο μεταβολικό προφίλ, καθώς η μελέτη τους περιλάμβανε άτομα με υψηλότερη μέση τιμή HbA1c (8.3%), ενώ η δική μας μελέτη συμπεριέλαβε πληθυσμό με διαφορετικό βαθμό γλυκαιμικού επιπέδου (HbA1c: 7.4%), γεγονός που πιθανά συνδέεται με διαφορετικό τύπο μεταβολής της δευτεροταγούς δομής της κερατίνης. Για την φαινυλαλανίνη δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ομάδων (ANOVA, $p \geq 0.2$), αν και προηγούμενες μελέτες την έχουν αναδείξει ως πιθανό βιοδείκτη, καταγράφοντας αυξημένα επίπεδα σε διαβητικούς ασθενείς.(146,147) Η απουσία σημαντικής διαφοράς ενδέχεται να σχετίζεται με εξωγενείς παράγοντες, όπως η διατροφή,(148) η φαρμακευτική αγωγή(149) ή η ατομική μεταβολική απόκριση(150,151) των συμμετεχόντων, οι οποίοι ενδέχεται να επηρεάζουν τα επίπεδα των αρωματικών αμινοξέων στους ιστούς. Όσον αφορά στην μελέτη της χαρακτηριστικής κορυφής της καρβοξυμεθυλλυσίνης (CML), εντοπίστηκε στην θέση 1123 cm^{-1} . Η καρβοξυμεθυλλυσίνη (CML) δεν είναι συνήθης δείκτης των ονύχων αλλά πρόσφατα ξεκίνησε να χρησιμοποιείται στην φασματοσκοπία Raman ως ένδειξη της χρόνιας γλυκοζυλίωσης σε όνυχες ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Η σχετική δημοσίευση επικεντρώθηκε κυρίως στον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό της κορυφής της CML στο φάσμα Raman. (104) Ωστόσο, ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζει η μελέτη των Sihota et al.,(74) στην οποία εφαρμόστηκε η φασματοσκοπία FTIR στην μελέτη των ονύχων διαβητικών ασθενών (τύπου 2). Σε αυτή την μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ο λόγος εμβαδού της κορυφής της CML προς την αντίστοιχη του αμιδίου II. Η ερευνητική ομάδα διαπίστωσε ότι οι ασθενείς με επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης $\text{HbA1c} < 7.5\%$ παρουσίασαν αύξηση του λόγου εμβαδού κατά 34.7% σε σύγκριση με υγιή άτομα, ενώ στους ασθενείς με $\text{HbA1c} \geq 7.5\%$, η αύξηση του λόγου έφτασε το 53.1%.(74) Το εύρημα αυτό υπογραμμίζει την δυνητική διαγνωστική

αξία της CML ως φασματοσκοπικού δείκτη μεταβολικών διαταραχών σχετιζόμενων με το διαβήτη. Η ανάλυση της παρούσας διατριβής δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις στα βασικά χαρακτηριστικά της κορυφής, δηλαδή την θέση, την ένταση και το εμβαδόν, μεταξύ των εξεταζόμενων ομάδων. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αυξημένη ένταση της κορυφής στους όνυχες των διαβητικών ατόμων, γεγονός που υποδηλώνει ενισχυμένη συσσώρευση AGEs στους ιστούς. Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της φασματικής ανάλυσης υποδεικνύουν διαφοροποιήσεις στη δευτεροταγή δομή της κερατίνης στους διαβητικούς όνυχες, με κυριότερο χαρακτηριστικό την μείωση της φασματικής ζώνης της α -έλικας.

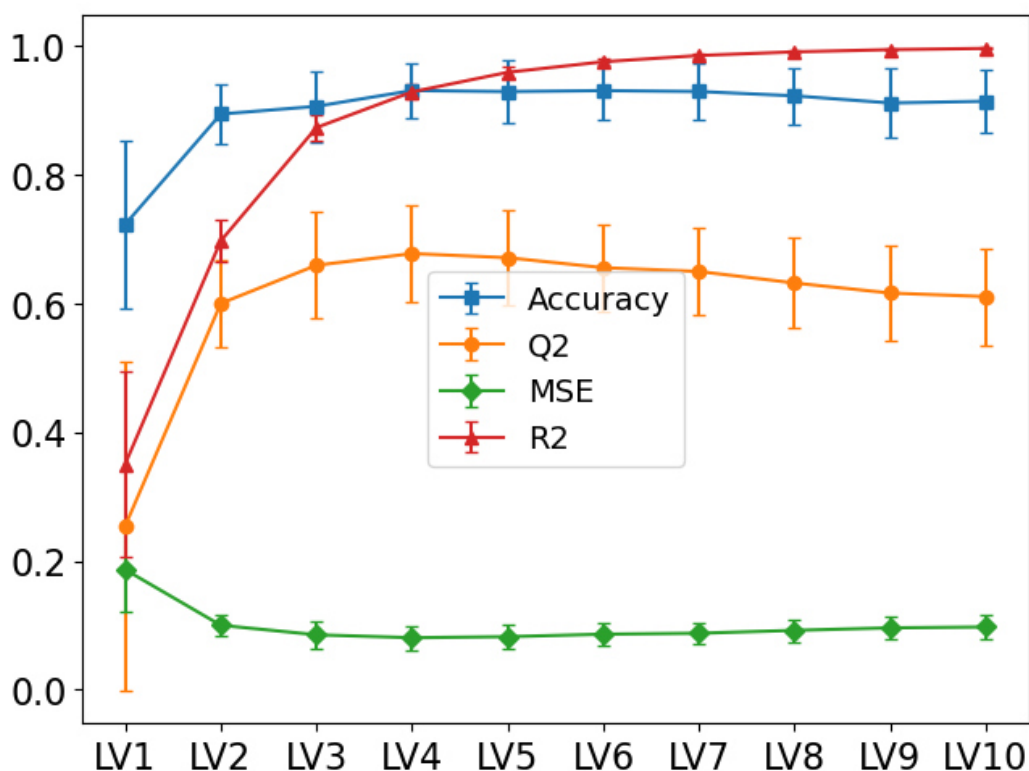
3.2.4 Προγνωστικό μοντέλο διάγνωσης του σακχαρώδη διαβήτη

Με βάση τα ευρήματα μας εφαρμόστηκε η μέθοδος των μερικών ελαχίστων τετραγώνων διακριτής ανάλυσης (PLS-DA) στα δείγματα της ανάλυσης PCA-SR2 [TP0], με στόχο την περαιτέρω διερεύνηση της διάκρισης τους σε υγιή και διαβητικά, και την ανάδειξη κρίσιμων βιοδεικτών. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε η ανάλυση PCA στις τρεις μετρήσεις από κάθε όνυχα (Εικόνα 42) και ακολούθησε PLS-DA.



Εικόνα 42: Ανάλυση PCA των φασμάτων Raman από υγιείς και διαβητικούς εθελοντές χωρίς χημική επεξεργασία στο εύρος $800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$.

Για το PLS-DA, χωρίστηκαν τα αποτελέσματα της ανάλυσης PCA σε δύο υποσύνολα: train set και test set, με αναλογία 70/30, αντίστοιχα. Το train set χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή του μοντέλου, ενώ το test set εφαρμόστηκε στην αξιολόγηση της απόδοσης του και την προσπάθεια ανίχνευσης βιοδεικτών. Ο προσδιορισμός του βέλτιστου αριθμού συνιστωσών που εφαρμόστηκαν στο μοντέλο πραγματοποιήθηκε μέσω του Διάγραμμα 6 το οποίο παρουσιάζει την επίδοση του σε σχέση με τον αριθμό των μεταβλητών (LV1–LV10) με χρήση τεσσάρων βασικών μετρικών: Accuracy, Q^2 , R^2 και MSE. Ο βέλτιστος αριθμός μεταβλητών είναι 3, καθώς σε αυτό το σημείο, παρατηρείται υψηλή ακρίβεια ταξινόμησης (Accuracy), χαμηλό σφάλμα πρόβλεψης (MSE), καθώς και υψηλές τιμές για τους δείκτες R^2 και Q^2 . Η μικρή διαφορά μεταξύ R^2 και Q^2 υποδεικνύει ότι το μοντέλο όχι μόνο εφαρμόζεται καλά στα δεδομένα εκπαίδευσης, αλλά διατηρεί και καλή ικανότητα πρόβλεψης σε άγνωστα δεδομένα, αποφεύγοντας την υπερπροσαρμογή (overfitting). (125)



Διάγραμμα 6: Αξιολόγηση της απόδοσης του μοντέλου PLS-DA ως προς τον αριθμό μεταβλητών (LV1–LV10), με βάση τις μετρικές Accuracy, R^2 , Q^2 και MSE. Το Accuracy εκφράζει το ποσοστό σωστών προβλέψεων, το R^2 δείχνει πόσο καλά το μοντέλο ταιριάζει στα δεδομένα εκπαίδευσης, το Q^2 αποτιμά την ικανότητα πρόβλεψης σε άγνωστα δεδομένα (repeated stratified k-fold cross-validation (3 folds)), ενώ το MSE μετρά το μέσο τετράγωνο σφάλματος πρόβλεψης. Ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών εντοπίζεται στις 3, όπου οι μετρικές δείχνουν υψηλή απόδοση και καλή ισορροπία μεταξύ προσαρμογής και γενίκευσης.

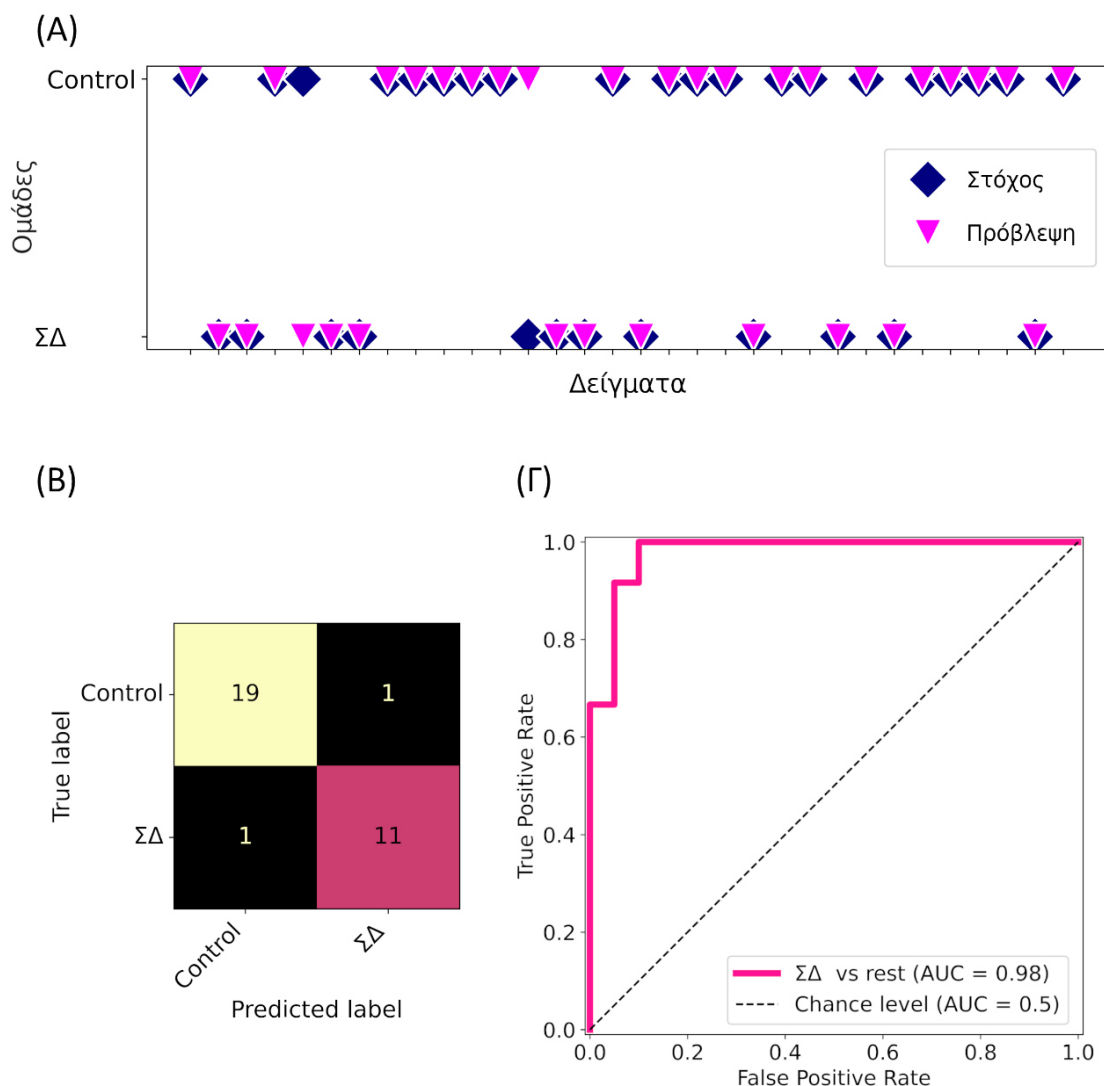
Η ταξινόμηση των ονύχων του test set παρουσιάστηκε ως πρόβλεψη (prediction) και συγκρίθηκε με την προκαθορισμένη κλινική κατηγοριοποίηση των δειγμάτων (στόχος-target) στο διάγραμμα PLS Prediction. (Εικόνα 43) Η απόδοση του μοντέλου αξιολογήθηκε μέσω του πίνακα confusion matrix, ο οποίος αποτελείται από δύο στήλες και δύο γραμμές (2x2), και περιέχει τον αριθμό των δειγμάτων που ταξινομήθηκαν στις αντίστοιχες ομάδες. Συγκεκριμένα, 19 από τα 20 δείγματα control ταξινομήθηκαν ως control (TP–True Positive), ενώ 1 δείγμα ταξινομήθηκε ως διαβητικό (FP–False Positive). Αντίστοιχα, 11 από τους 12 όνυχες διαβητικών αναγνωρίστηκαν ως διαβητικά (TN–True Negative), ενώ 1 δείγμα ταξινομήθηκε ως control (FN–False Negative).

Οι τιμές που προέκυψαν από τον πίνακα confusion matrix καθόρισαν τα εξής ποσοστά απόδοσης του μοντέλου:

❖ ακρίβεια: 94% (accuracy)

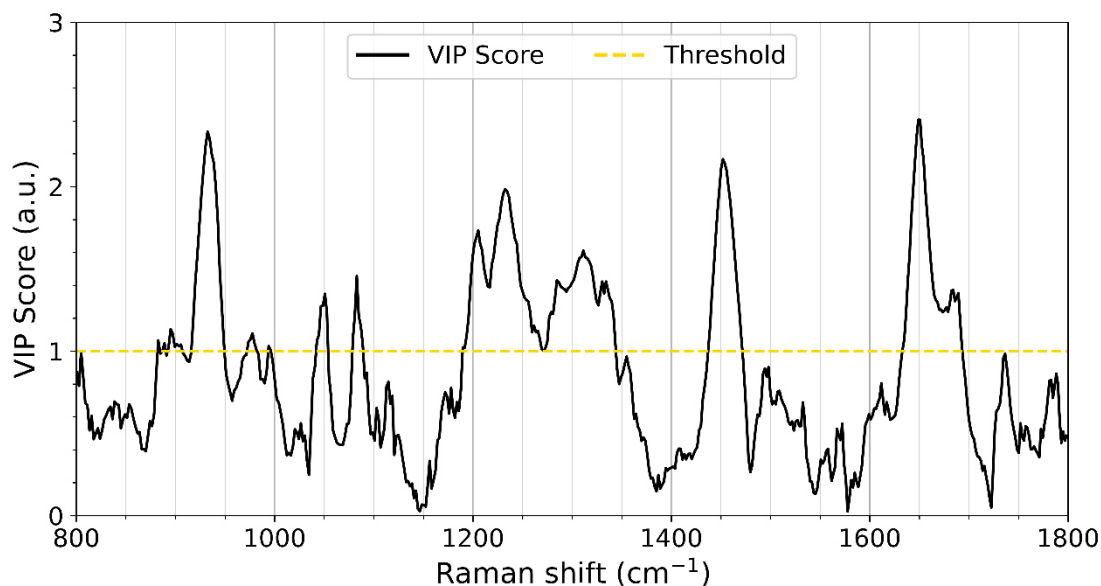
- ❖ ευαισθησία: 95% (sensitivity)
- ❖ ειδικότητα: 92% (specificity)

Η υψηλή ευαισθησία (95%) και η καλή ειδικότητα (92%) υποδεικνύουν ότι το μοντέλο μπορεί να ανιχνεύσει με σχετική ακρίβεια τα διαβητικά δείγματα. Η αξιολόγηση της απόδοσης του μοντέλου μέσω της καμπύλης ROC έδειξε συνολική απόδοση 98%. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) είναι ένα δείκτης της ικανότητας του μοντέλου να διακρίνει τις δύο κατηγορίες. AUC της τάξης του 98% υποδεικνύει ότι το μοντέλο έχει πολύ υψηλή ικανότητα να αναγνωρίζει τους διαβητικούς ασθενείς από τους μη-διαβητικούς. Η τιμή του AUC μπορεί θεωρητικά να φτάσει το 100% υπό ιδανικές συνθήκες· ωστόσο, ποσοστό της τάξης του 98% θεωρείται εξαιρετικά υψηλό και υποδηλώνει την υψηλή αξιοπιστία του προγνωστικού μοντέλου, ενισχύοντας τις προοπτικές μελλοντικής κλινικής του εφαρμογής.



Εικόνα 43: (Α) PLS prediction διάγραμμα και (Β) confusion matrix. (Γ) Η καμπύλη ROC απεικονίζει την απόδοση του προγνωστικού μοντέλου μέσω της σχέσης μεταξύ της ευαισθησίας (True Positive Rate) και της ειδικότητας (False Positive Rate). Η καμπύλη ξεκινά από το σημείο (0,0) και φτάνει στο (1,1), με την περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) να αποτελεί μέτρο της ακρίβειας του μοντέλου. Η τιμή $AUC=0.98$ υποδεικνύει ικανοποιητική διακριτική ικανότητα. Η διαγώνια γραμμή στο διάγραμμα αντιπροσωπεύει το chance level ($AUC=0.5$), που υποδεικνύει τυχαία απόδοση. Μια καμπύλη πάνω από αυτή τη γραμμή δείχνει ότι το μοντέλο έχει καλύτερη απόδοση από την τυχαία πρόβλεψη.

Ο προσδιορισμός των πιθανών βιοδεικτών, πραγματοποιήθηκε με ανάλυση VIP, η οποία εφαρμόστηκε στο test set των δεδομένων, και παρήγαγε έναν δείκτη σημαντικότητας (VIP score) για κάθε κυματάριθμο. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 44, όπου η διακεκομμένη κίτρινη οριζόντια γραμμή αντιπροσωπεύει το κατώφλι στο 1, υποδεικνύοντας τις σημαντικότερες κορυφές στην διαφοροποίηση των ομάδων.

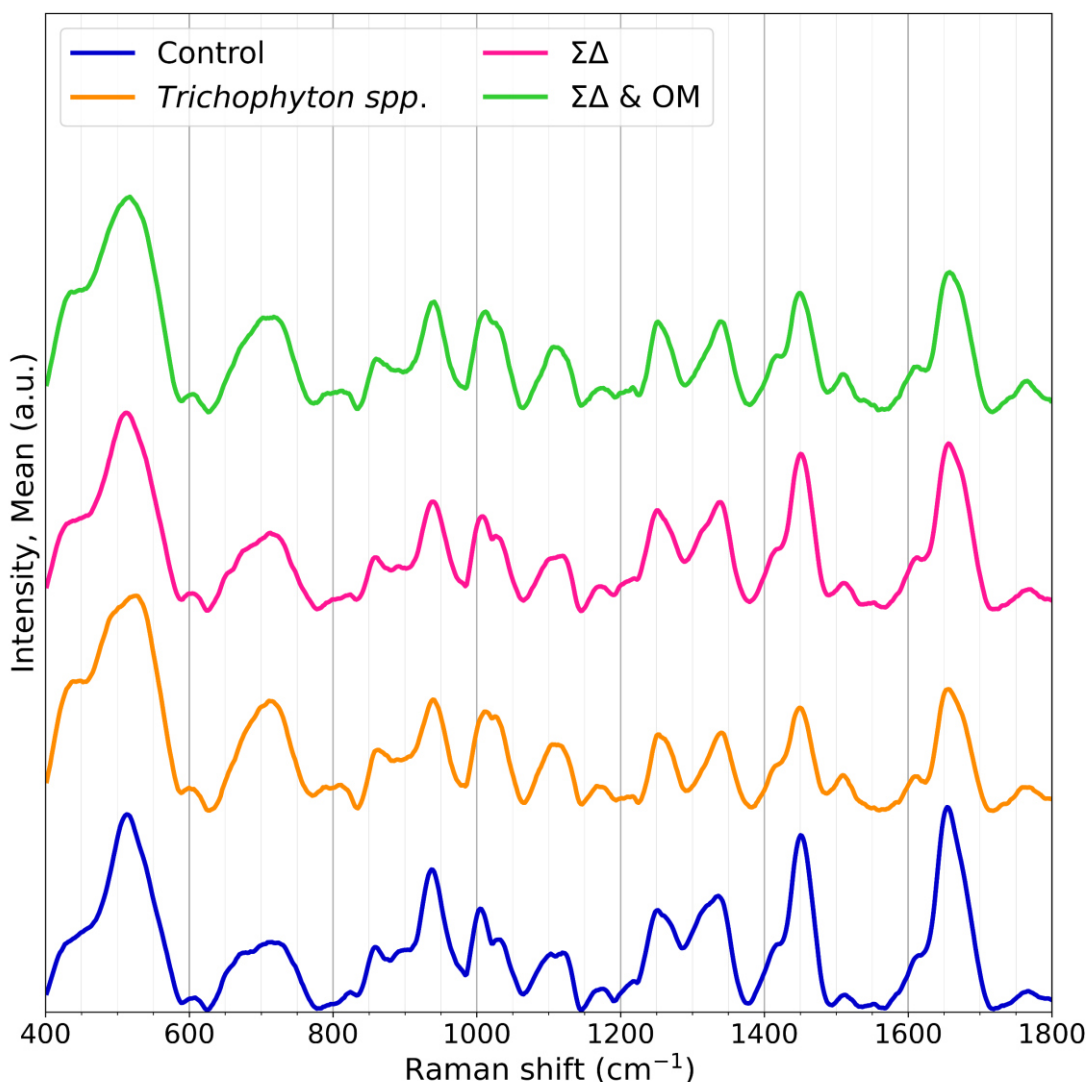


Εικόνα 44: Ανάλυση VIP scores στο προγνωστικό μοντέλο PLS-DA.

Οι δονήσεις $\nu(\text{C}=\text{O})$ της α -έλικας και β -πτυχωτής επιφάνειας εμφανίζουν υψηλές τιμές VIP score υποδεικνύοντας την εμπλοκή της δευτεροταγούς δομής στην διαφοροποίηση των διαβητικών δειγμάτων. Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι όνυχες αποτελούνται κυρίως από α -κερατίνη, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία α -ελίκων (α -helices) που σταθεροποιούνται μέσω δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ κυστεινών, δεσμών υδρογόνου μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων που περιέχουν πεπτιδικούς δεσμούς, και υδρόφοβες και ιοντικές αλληλεπιδράσεις στον περιβάλλοντα ματριξιακό χώρο.(31) Η σταδιακή και χρόνια συσσώρευση AGEs στους διαβητικούς ασθενείς, προκαλεί στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER),(152,153) το οργανίδιο που είναι υπεύθυνο για την «σωστή» αναδίπλωση των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο, οδηγώντας τελικά σε διαταραχή της ομοιόστασης του ER, και λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών λόγω ανεπαρκούς λειτουργίας ή καταστολής της έκφρασης μοριακών συνοδών (chaperones). Η κατάσταση αντιμετωπίζεται με ενεργοποίηση του μηχανισμού UPR (Unfolded Protein Response) μέσω τριών αισθητήρων: IRE1 α , ATF6 και PERK. Στόχος του μηχανισμού είναι η αποφόρτιση του ER και η αποκατάσταση της ισορροπίας. Όμως, στην περίπτωση που η συσσώρευση των AGEs είναι ανεξέλεγκτη, ο μηχανισμός δεν επαρκεί, το ER παραμένει σε κατάσταση στρες, οδηγώντας σε δυσλειτουργία των κυττάρων και τελικά στον θάνατο τους (απόπτωση).(154) Το αποτέλεσμα είναι η αυξανόμενη συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, δηλαδή που μεταβάλλονται ως προς την δευτεροταγή δομή τους, κατάσταση η οποία φτάνει μέχρι την μήτρα των ονύχων,(153) και αντιστοιχεί στην μεταβολή της έντασης και του εμβαδού της φασματικής κορυφής της α -έλικας του αμίδιου I στο φάσμα Raman.

3.3 Διάκριση της ονυχομυκητίασης στον γενικό πληθυσμό

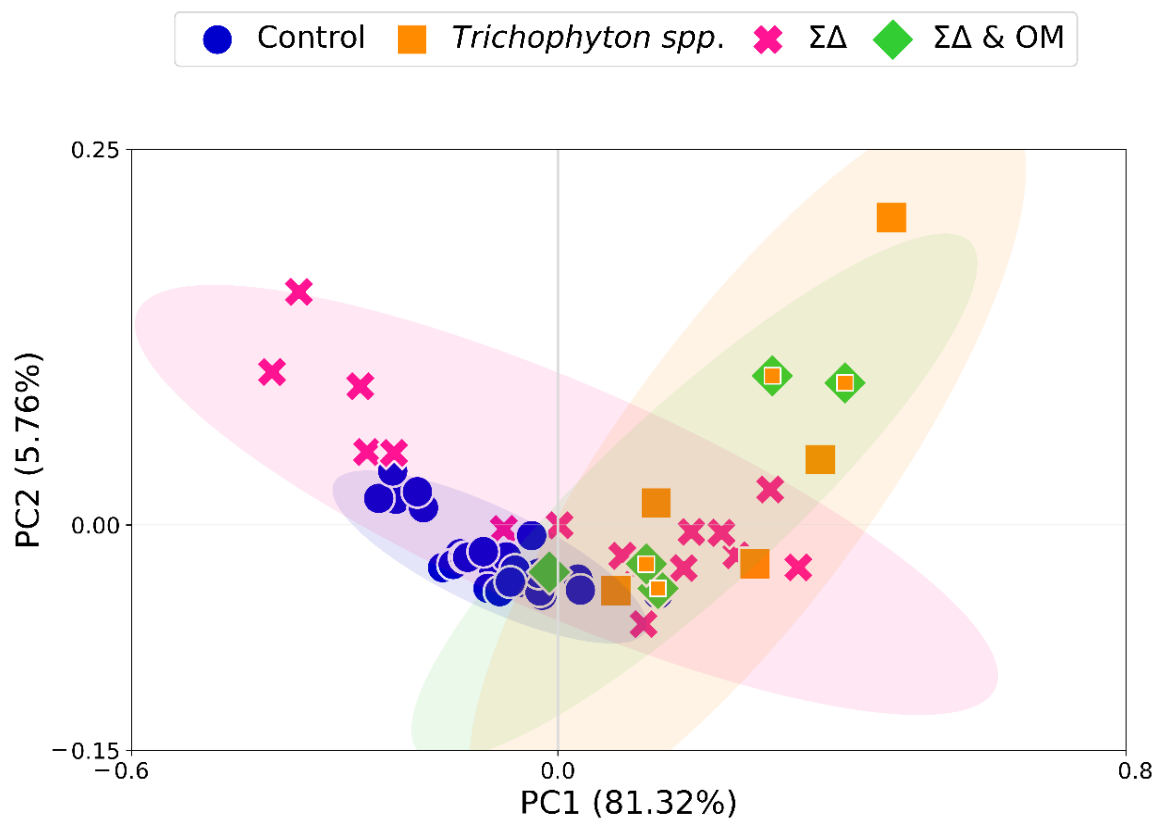
Μελετήθηκε η προσομοίωση κλινικών συνθηκών, με έμφαση στην διάγνωση της ονυχομυκητίασης σε διαβητικούς και μη-διαβητικούς ασθενείς. Σε αντίθεση με τα ελεγχόμενα πειράματα, η παρούσα μελέτη προσομοιώνει την πολυπλοκότητα των πραγματικών κλινικών συνθηκών, όπου οι μεταβλητές είναι πολλαπλές και αλληλεξαρτώμενες. Η ανάλυση περιλάμβανε δείγματα από τις τέσσερις κατηγορίες που περιγράφονται στην 2.1. Οι όνυχες εξετάστηκαν απευθείας, χωρίς χημική επεξεργασία, στο φασματικό εύρος $400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$. Τα μέσα φάσματα αυτών παρουσιάζονται στην Εικόνα 45. Οι κύριες φασματικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων κατηγοριών δειγμάτων εντοπίστηκαν στους δισουλφιδικούς ($500\text{--}520\text{ cm}^{-1}$) και αμιδικούς δεσμούς ($1250\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$).



Εικόνα 45: Μέσα φάσματα ονύχων από τις κατηγορίες: control (n=16), προσβεβλημένοι από *Trichophyton spp.* (n=5), πάσχοντες από σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ: n=16) και από σακχαρώδη διαβήτη και ονυχομυκητίαση (ΣΔ & OM: n=5).

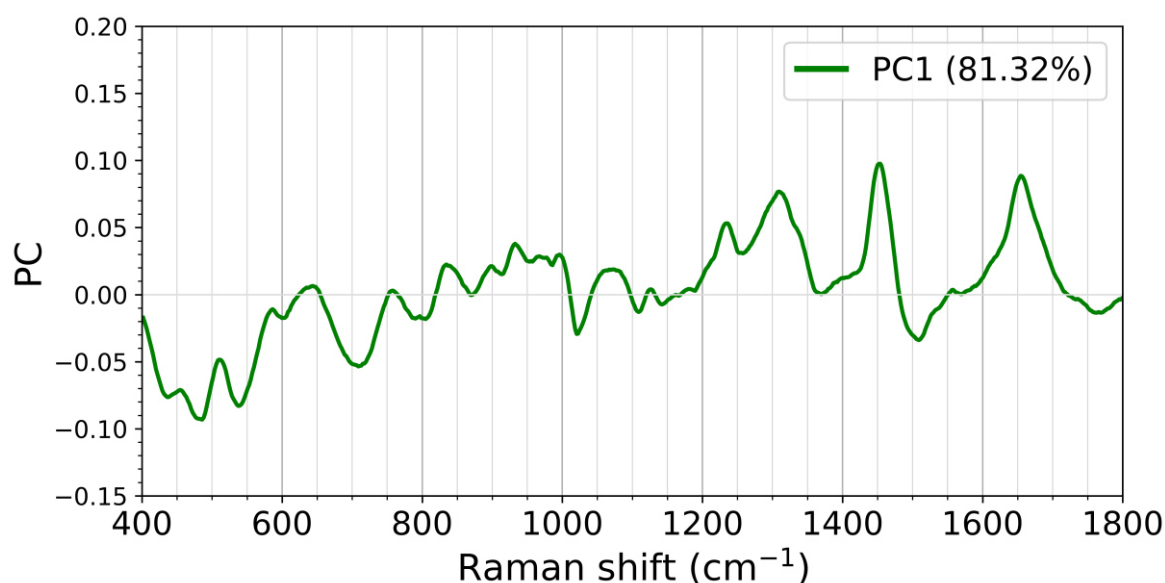
Η διερεύνηση της διάκρισης μεταξύ των ομάδων ονύχων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση PCA χρησιμοποιώντας τις μέσες τιμές των μετρήσεων κάθε δείγματος και παρουσιάζεται στην ανάλυση των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών (PC1 και PC2). (Εικόνα 46) Παρατηρείται ότι οι υγιείς όνυχες σχηματίζουν μία διακριτή ομάδα σημείων, ενώ τα παθολογικά δείγματα εμφανίζουν μεγαλύτερη εσωτερική διαφοροποίηση. Οι ομάδες ονύχων: «Σακχαρώδης Διαβήτης και Ονυχομυκητίαση» και «*Trichophyton spp.*» αλληλοεπικαλύπτονται, και η διάκριση τους από τα control πραγματοποιείται κατά μήκος του άξονα PC1, υποδηλώνοντας ότι η μυκητιασική λοίμωξη επηρεάζει σημαντικά το φασματικό αποτύπωμα των ονύχων ανεξαρτήτως της παρουσίας σακχαρώδη διαβήτη. Ο PC1 εξηγεί το μεγαλύτερο ποσοστό της συνολικής διακύμανσης (81.32%), γεγονός που

υποδεικνύει ότι οι μεταβολές είναι κυρίαρχες στην διαφοροποίηση των ομάδων δειγμάτων. Τα δερματοφύτα προκαλούν μη-αναστρέψιμες φθορές στην κερατίνη των ονύχων μέσω της παραγωγής υφών και κερατινολυτικών ενζύμων. Συγκεκριμένα, οι υφές εκκρίνουν ένζυμα,(56) τα οποία αποδομούν τους πεπτιδικούς και δισουλφιδικούς δεσμούς με απώτερο στόχο την θρέψη και τον πολλαπλασιασμό τους.(57,58) Όπως προαναφέρθηκε, οι ενζυματικές αυτές αλλοιώσεις εντοπίζονται φασματοσκοπικά ως μείωση της έντασης στις κορυφές $500\text{--}520\text{ cm}^{-1}$ (δισουλφιδικοί δεσμοί) και $1250\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ (αμιδικοί δεσμοί) (βλ. Φασματοσκοπικοί δείκτες). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι ο όνυχας που επιμολύνθηκε με *Penicillium spp.* εντοπίζεται εντός της περιοχής των control δειγμάτων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη μυκητιασική λοίμωξη δεν προκάλεσε σημαντικές φασματικές διαφοροποιήσεις στο φάσμα Raman των ονύχων. Το είδος *Penicillium spp.*, θεωρείται κατά βάση περιβαλλοντικός μικροοργανισμός, αλλά έχει καταγραφεί ως δυνητικός ευκαιριακός παθογόνος ειδικά σε διαβητικούς ασθενείς.(155) (Εικόνα 46).



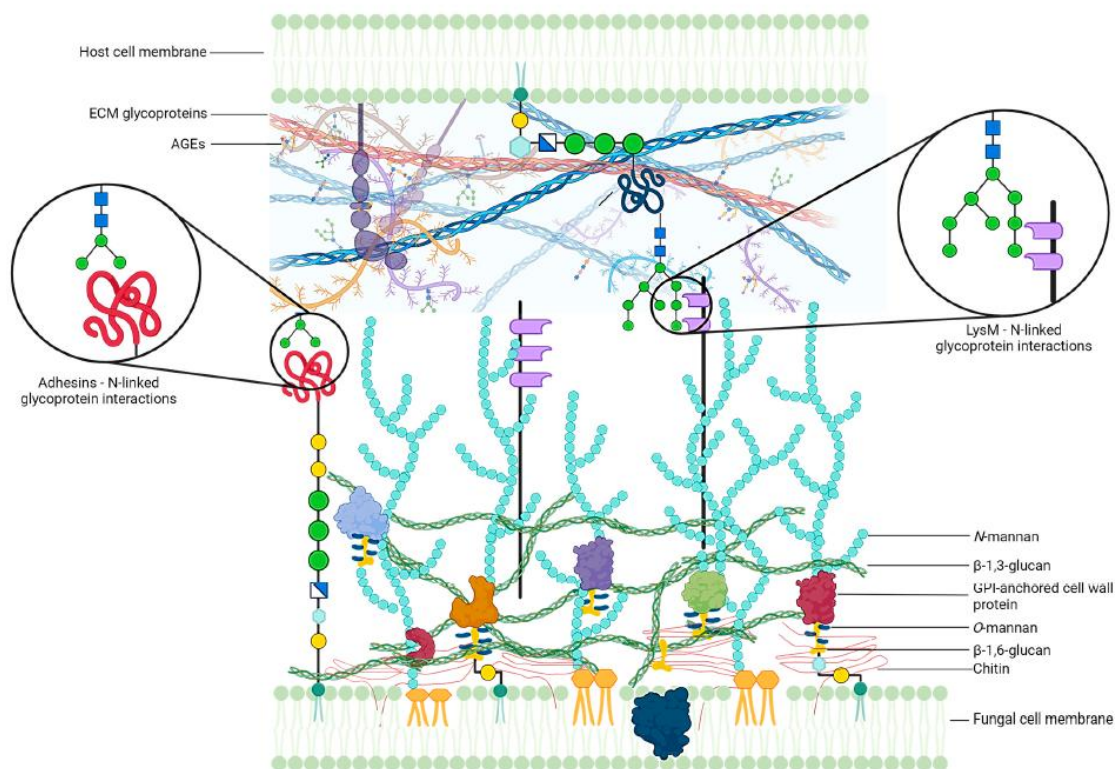
Εικόνα 46: Ανάλυση PCA των μέσων φασμάτων Raman [TP0]. Οι πάσχοντες από σακχ. διαβήτη και ονυχομυκητίαση απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, ενώ τα ίδια δείγματα που έχουν προσβληθεί από *Trichophyton spp.* επισημαίνονται με πορτοκαλί τετράγωνο.

Σύμφωνα με το loading plot του PC1 (Διάγραμμα 7) οι περιοχές $500\text{--}520\text{ cm}^{-1}$, 1453 cm^{-1} και 1650 cm^{-1} , που αντιστοιχούν σε δισουλφιδικούς και αμιδικούς δεσμούς, αποτελούν καθοριστικούς δείκτες για τη διάκριση παθολογικών δειγμάτων, επιβεβαιώνοντας την επίδραση της μυκητιασικής προσβολής στην δομή της κερατίνης.



Διάγραμμα 7: Loading plot του PC1.

Παράλληλα, οι όνυχες ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη (αρνητικοί σε μυκητίαση) αλληλοεπικαλύπτονται με τους μυκητιασικούς όνυχες. Η επικάλυψη πιθανά υποδηλώνει την συσχέτιση τους καθώς όπως γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία οι ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη κατέχουν αυξημένο κίνδυνο αλλοίωσης της βιοχημικής σύστασης των ονύχων τους, και την ανάπτυξη ονυχομυκητίασης.(156) Η υπεργλυκαιμία που είναι γνωστό σύμπτωμα του σακχαρώδη διαβήτη, οδηγεί στον σχηματισμό των ενώσεων AGEs, που συσσωρεύονται στους ιστούς και στο εξωκυττάριο (ECM) μεταβάλλοντας τις ιδιότητες του. Οι AGEs μπορούν να συνδέονται με τις λυσίνες της κερατίνης, οδηγώντας στον σχηματισμό N-γλυκοπρωτεϊνών που φέρουν μαννόζη και γαλακτόζη. Οι δομές αυτές λειτουργούν ως μόρια-στόχοι για τα δερματοφύτα, ενισχύοντας την πρόσφυσή τους και διευκολύνοντας την μυκητιασική εγκατάσταση. Συγκεκριμένα, τα κονίδια των μυκήτων εκφράζουν πρωτεΐνες που τους επιτρέπουν να συνδέονται με τις γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες και τις μεμβράνες των κερατινοκυττάρων. Γνωστή είναι η προσκόλληση και η διείσδυση των *T. rubrum* και *T. mentagrophytes* στους όνυχες, μέσω αυτών των μοριακών αλληλεπιδράσεων.(157) (Εικόνα 47)



Εικόνα 47: Πιθανές αλληλεπιδράσεις μυκήτων με τα ανθρώπινα κύτταρα ξενιστές ή με τον εξωκυττάριο χώρο (ECM). (157)

Η περαιτέρω ανάλυση της περίπτωσης πραγματοποιήθηκε με προσαρμογή καμπυλών Gauss σε συγκεκριμένους φασματοσκοπικούς δείκτες. (Βλ. Φασματοσκοπικοί δείκτες) Οι μέσες τιμές αυτών συνοδευόμενες από τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις καταγράφονται στον Πίνακα 6. Η ανάλυση του αμιδίου I κατέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στο εμβαδόν της δόνησης $\nu(C=O)$ μεταξύ των ομάδων ($p < 0.01$, ANOVA), ενώ αντίθετα, η αντίστοιχη της μέσης έντασης έδειξε ότι ήταν στα ίδια επίπεδα. Αντίστοιχα, η ανάλυση του αμιδίου II, κατέδειξε διαφοροποιήσεις στα χαρακτηριστικά της δόνησης $\delta(CH_2)$ *scissoring*. (ένταση, εμβαδόν, ANOVA, $p < 0.05$). Στις τιμές του λόγου έντασης $S-S/\alpha$ μίδιο II, παρουσιάστηκε υψηλότερη τιμή για τους διαβητικούς με σημαντική διαφορά (ANOVA, $p < 0.05$) σε σύγκριση με τους προσβεβλημένους. Ο λόγος αυτός είναι δείκτης της επίδρασης του σακχαρώδη διαβήτη στην δομή των πρωτεϊνών της κερατίνης των ονύχων. Ο δείκτης χρησιμοποιήθηκε σε μελέτη για τον διαβήτη τύπου 2 με φασματοσκοπία FTIR, και βρέθηκε ότι μειώνεται αναλογικά με την σοβαρότητα της νόσου, όπως αυτή εκφράζεται από τα επίπεδα HbA1c. Η μείωση του λόγου σημαίνει διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών, πιθανώς ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης γλυκοπροϊόντων (AGEs) και του ενδοπλασματικού στρες (ER stress). Αυτό το γεγονός οδηγεί σε απώλεια της δομικής σταθερότητας της κερατίνης, προκαλώντας μικροδομικές αλλοιώσεις, όπως

αυξημένη τραχύτητα της επιφάνειας των ονύχων, καθώς και μείωση της σκληρότητας και της ελαστικότητάς τους, δηλαδή οι ονύχες γίνονται πιο εύθραυστοι.

Πίνακας 6: Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις των παραμέτρων των καμπυλών Gauss στους control και στους παθολογικούς ονύχες. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων με *Trichophyton spp.* και ονύχων διαβητικών

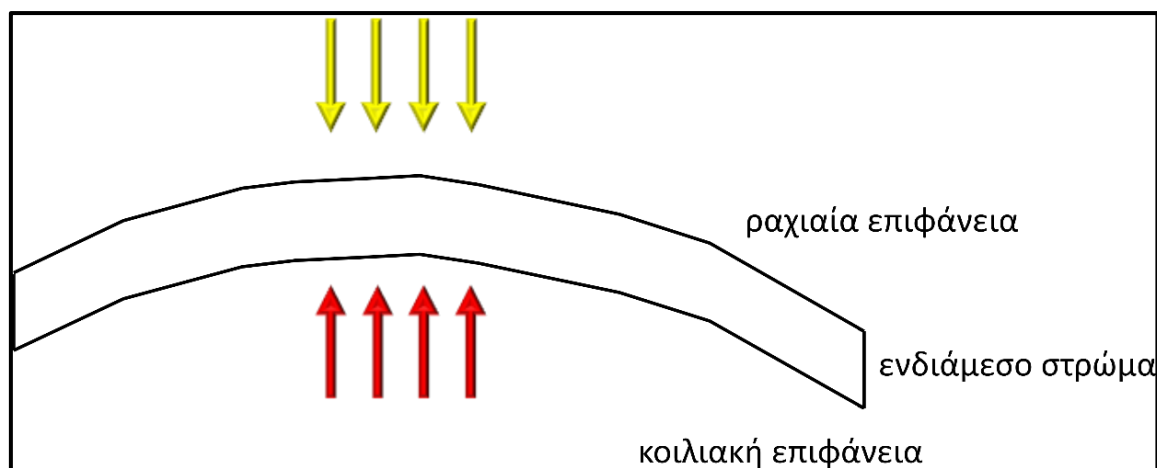
Αντιστοίχιση κορυφών	Intensity (a.u.)	
	<i>Trichophyton spp.</i>	ΣΔ
$\nu(\text{C=O})$ α - έλικα, Αμίδιο I	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
$\delta(\text{CH}_2)$ scissoring, Αμίδιο II	0.05 ± 0.03	0.07 ± 0.02 *
S-S/Αμίδιο II	0.7 ± 0.4	0.8 ± 6.0 *

	Band area	
$\nu(\text{C=O})$ α - έλικα, Αμίδιο I	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.4 **
$\delta(\text{CH}_2)$ scissoring, Αμίδιο II	1.6 ± 1.0	2.3 ± 0.9 *

Παρατηρούμε ότι η φασματοσκοπία Raman προσφέρει την δυνατότητα διάγνωσης της ονυχομυκητίασης, ακόμη και σε συνθήκες αυξημένης πολυπλοκότητας, όπως αυτές που προκύπτουν από την συνύπαρξη μεταβολικών νοσημάτων όπως ο σακχαρώδης διαβήτης.

3.4 Τομογραφία οπτικής συνοχής (OCT)

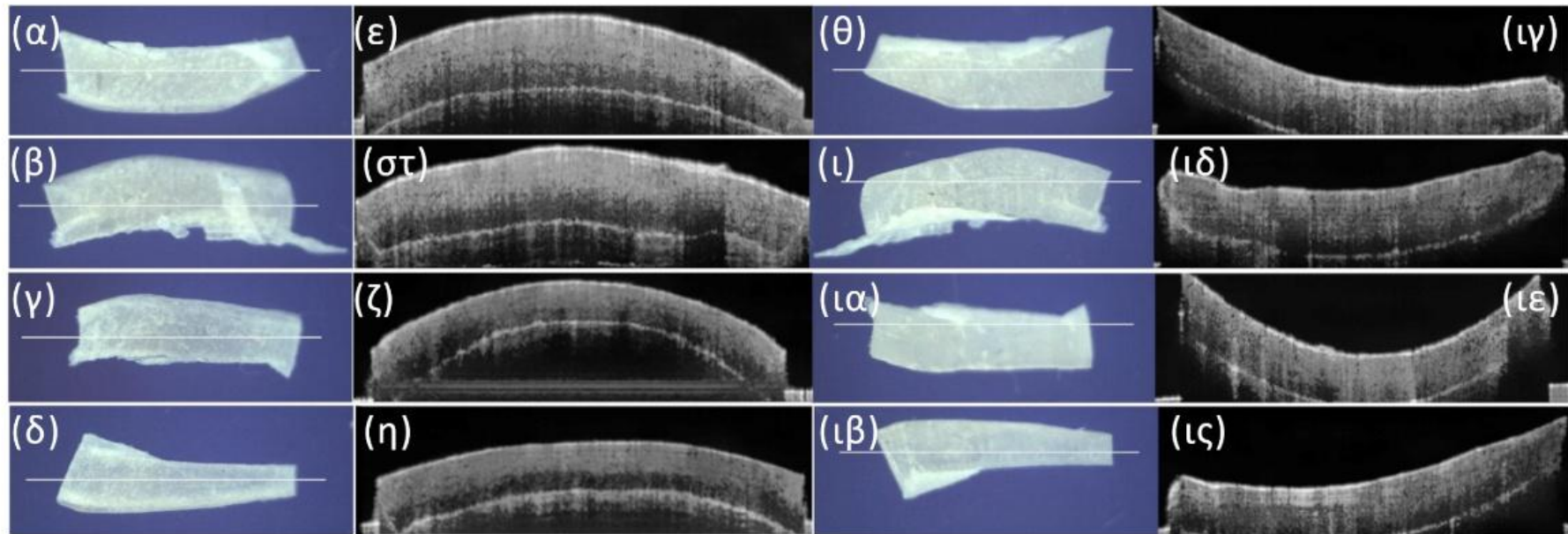
Μέρος δειγμάτων ονύχων που εξετάστηκαν με φασματοσκοπία Raman, επιλέχθηκαν για απεικόνιση με τομογραφία οπτικής συνοχής (OCT). Τα δείγματα ανήκαν στις κατηγορίες: (α), (β), (γ) που περιγράφονται στην 2.6.2, με σκοπό την ανάλυση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών. Επιλέχθηκαν δείγματα που διέθεταν ικανό μήκος και πλάτος ($\sim 2 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$), ώστε να είναι δυνατή η καταγραφή αντιπροσωπευτικών απεικονίσεων. Η εφαρμογή της OCT πραγματοποιήθηκε σε δύο οπτικούς άξονες: από την ραχιαία επιφάνεια προς το εσωτερικό της ονυχιαίας πλάκας και από την αντίστοιχη κοιλιακή επιφάνεια προς τα ανώτερα στρώματα κάθε δείγματος. (Εικόνα 48)



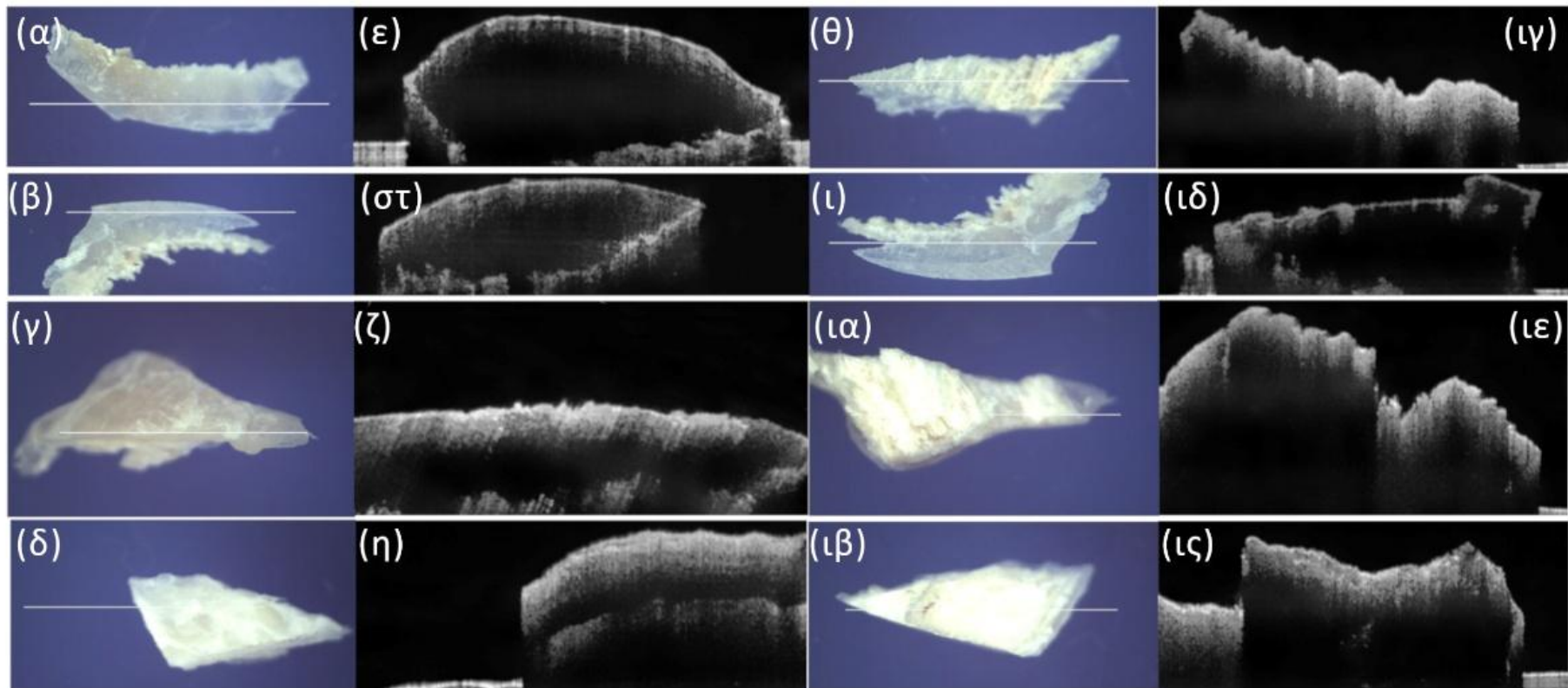
Εικόνα 48: Σχηματική απεικόνιση της εξέτασης υγιούς όνυχα με τομογραφία οπτικής συνοχής (OCT). Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση της δέσμης φωτός κατά τη διάρκεια της εξέτασης. Τα κίτρινα βέλη αντιστοιχούν στην σάρωση από τη ραχιαία επιφάνεια του όνυχα, ενώ τα κόκκινα απεικονίζουν την σάρωση από την κοιλιακή επιφάνεια.

Στις εικόνες: Εικόνα 49, Εικόνα 50, Εικόνα 51 παρουσιάζονται φωτογραφίες δειγμάτων ονύχων μαζί με τις αντίστοιχες OCT λήψεις. Στις δυο πρώτες στήλες απεικονίζεται η ραχιαία επιφάνεια κάθε δείγματος, ενώ στις τρίτες και τέταρτες αποτυπώνεται η κοιλιακή επιφάνεια. Η λευκή οριζόντια γραμμή υποδεικνύει την περιοχή λήψης εικόνας. Η Εικόνα 49 περιλαμβάνει δείγματα από υγιείς όνυχες (controls), ενώ η Εικόνα 50 αφορά δείγματα ονύχων με μυκητιασική προσβολή από *T. rubrum*. Στην Εικόνα 51 παρουσιάζονται δείγματα από όνυχες διαβητικών ασθενών.

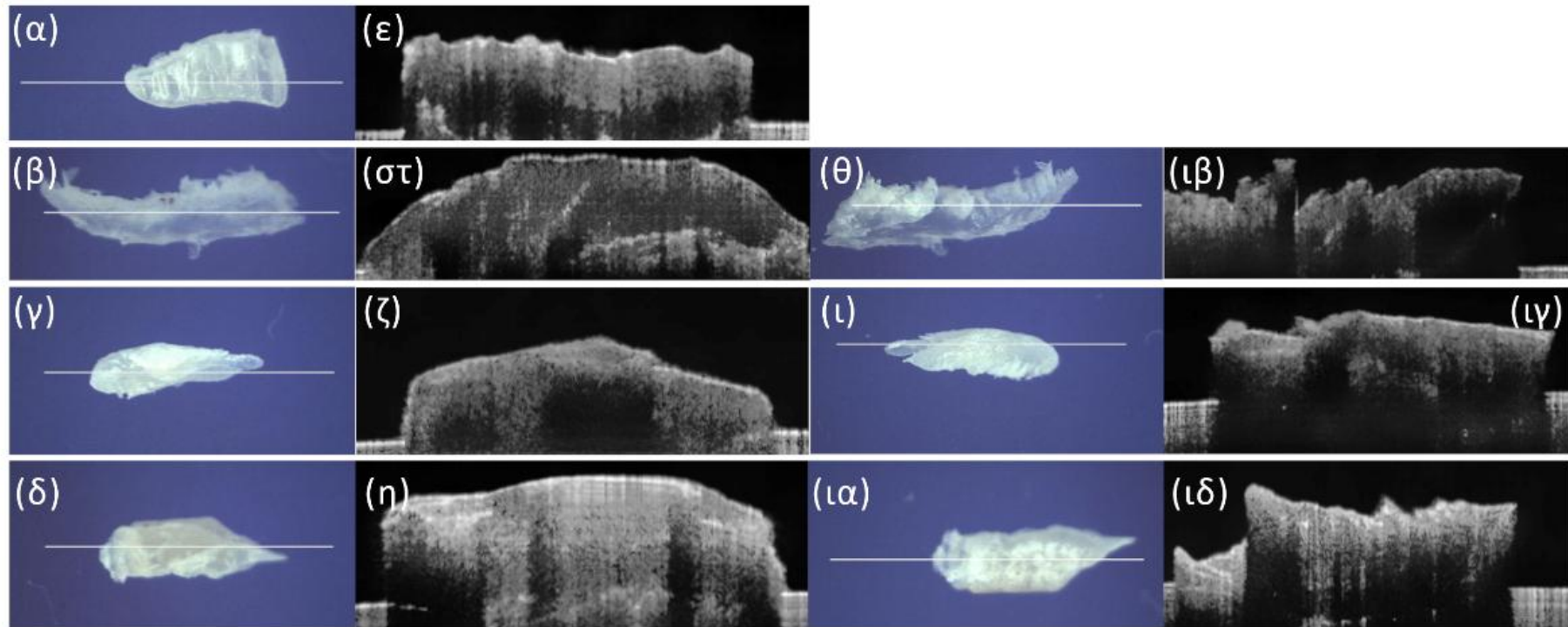
Στις απεικονίσεις που ελήφθησαν από την ραχιαία επιφάνεια, οι υγιείς όνυχες παρουσίαζαν διακριτή δομή με τρία χαρακτηριστικά στρώματα: ραχιαίο, ενδιάμεσο και κοιλιακό, τα οποία διακρίνονταν λόγω διαφοράς στην ένταση της σκέδασης. (Εικόνα 49 (ε)–(η)) Στις εικόνες ήταν επίσης εμφανές το χαρακτηριστικό καμπυλωτό σχήμα τους.



Εικόνα 49: Φωτογραφίες και OCT απεικονίσεις υγιών ονύχων (n=4).



Εικόνα 50: Φωτογραφίες και OCT απεικονίσεις όνυχων με μυκητιασική προσβολή από *T. rubrum* (n=4).



Εικόνα 51: Φωτογραφίες και OCT απεικονίσεις ονύχων διαβητικών ασθενών (n=4). Οι ασθενείς έπασχαν από αρρύθμιστο διαβήτη και συγκεκριμένα έφεραν επίπεδα HbA1c από 8.4% έως 11.0%.

Οι παθολογικοί όνυχες παρουσίαζαν σημαντική ανομοιογένεια. Στους μολυσμένους από *T. rubrum*, η ραχιαία επιφάνεια είτε δεν διακρινόταν καθαρά από τα κατώτερα στρώματα, (Εικόνα 50 (ε)–(στ)), είτε εμφάνιζε πάχυνση και ακανόνιστη μορφολογία (Εικόνα 50 (ζ)–(η)). Στις απεικονίσεις OCT καταγράφηκαν εκτεταμένες περιοχές μειωμένου σήματος, οι οποίες αποκλίνουν από την φυσιολογική απεικόνιση και υποδηλώνουν δομικές αλλοιώσεις. Η προχωρημένη μυκητιασική λοίμωξη προκαλεί διάσπαση της κερατίνης και συσσώρευση κερατινοκυττάρων (υπερκεράτωση), οδηγώντας σε ανωμαλίες στην επιφάνεια και ενδοπλακικές κοιλότητες.(158) Η ύπαρξη των ανωμαλιών δημιουργεί αυξημένη ανακλαστικότητα, η οποία παρεμποδίζει την διείσδυση του φωτός στις βαθύτερες στοιβάδες.(116,159) Παράλληλα, οι κοιλότητες λειτουργούν ως φραγμοί στην διάδοση της δέσμης.(160) Αξίζει να σημειωθεί πως η ύπαρξη αυτών των κοιλοτήτων δεν συνεπάγεται απαραίτητα παρουσία υλικού στο εσωτερικό τους.(121,122)

Στους διαβητικούς ασθενείς η ονυχιαία πλάκα παρουσίαζε χαρακτηριστικές αλλοιώσεις, πιθανό αποτέλεσμα της διαβητικής νευροπάθειας και μειωμένης αιμάτωσης, αλλά και της αυξημένης συσσώρευσης AGEs. Η γλυκοζυλίωση της κερατίνης τροποποιεί την μοριακή τους δομή, μειώνοντας την ακεραιότητα της ονυχιαίας πλάκας.(70) Επιπλέον, η ενεργοποίηση των υποδοχέων RAGE προάγει την παραγωγή οξειδωτικών ριζών (Reactive Oxygen Species–ROS) και τη φλεγμονώδη απόκριση, επιδεινώνοντας τις βλάβες στο υπονύχιο, την κοίτη και τα τριχοειδή αγγεία.(161) Αυτοί οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί οδηγούν σε ανομοιογένεια της ονυχιαίας πλάκας, με χαρακτηριστικές ενδοπλακικές κοιλότητες και διαταραχή της δομής της. Στις περισσότερες απεικονίσεις, η ραχιαία επιφάνεια των ονύχων διαχωρίζεται σαφώς από το ενδιάμεσο στρώμα, με εξαίρεση ορισμένα δείγματα, όπως αυτό που απεικονίζεται στην Εικόνα 51 (ζ). Η ανομοιογενής δομή και η σταδιακή εξασθένηση του σήματος υποδηλώνουν μεταβολές στην κερατίνη, ενώ οι μικρές σκοτεινές περιοχές, όπως σε Εικόνα 51 (ε)–(ζ), ενδέχεται να συνδέονται με ανεπαρκή αιμάτωση της κοίτης και δυσλειτουργία των τριχοειδών αγγείων.(162)

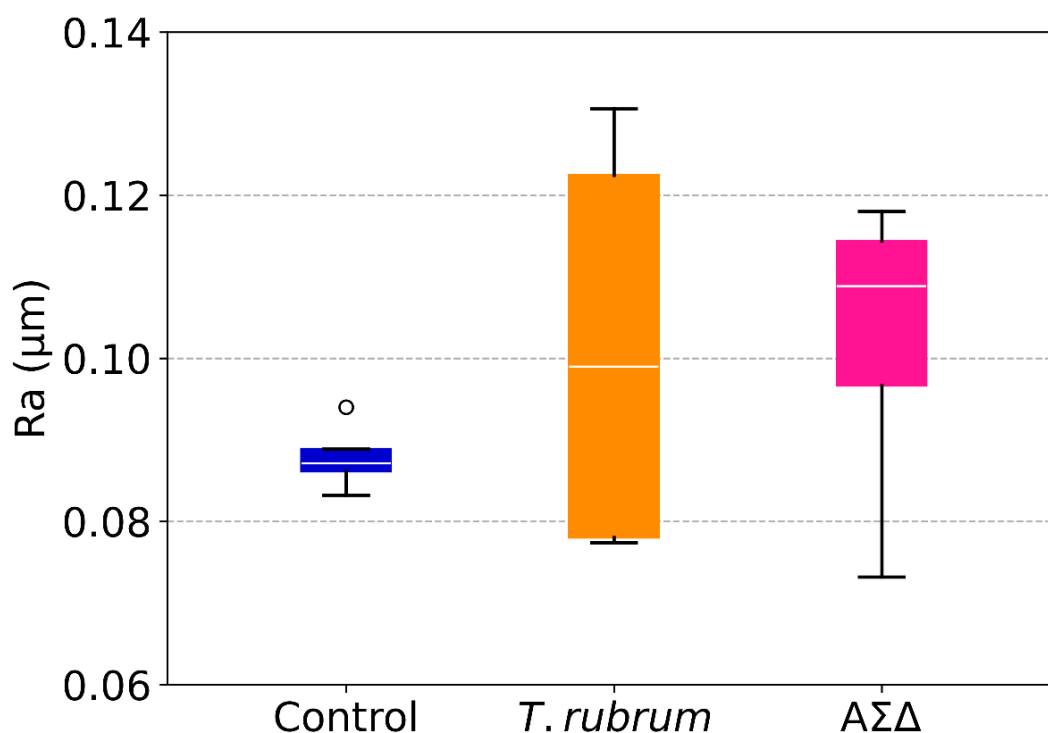
Η απεικόνιση από την κοιλιακή επιφάνεια των υγιών ονύχων παρουσίαζε στρωματοποιημένα δείγματα. Στους παθολογικούς όνυχες, η ραχιαία επιφάνεια δεν διακρινόταν από το ενδιάμεσο στρώμα. Παράλληλα, παρατηρήθηκαν σημεία υψηλού σήματος στην επιφάνεια και σε ορισμένες περιοχές κοντά σε αυτήν (Εικόνα 50 (ιγ), (ις) και Εικόνα 51 (ιγ)). Στους όνυχες με μυκητίαση, ήταν εμφανείς οι σκοτεινές περιοχές, που είχαν παρατηρηθεί και στην απεικόνιση από την ραχιαία πλευρά. Στους όνυχες των διαβητικών, παρατηρήθηκαν περισσότερες λευκές περιοχές και λίγα σκοτεινά σημεία, με τη ραχιαία επιφάνεια να μην διακρίνεται.

Η ανάλυση των απεικονίσεων πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό της επιφανειακής τραχύτητας των δειγμάτων και του συντελεστή μ_{OCT} . Οι διαφοροποιήσεις τους έχουν συνδεθεί με παθολογικές καταστάσεις, καθώς οι παθολογικοί ιστοί διαθέτουν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και διαφορετικές οπτικές ιδιότητες από τους φυσιολογικούς.(128–130,133)

3.4.1 Προσδιορισμός επιφανειακής τραχύτητας

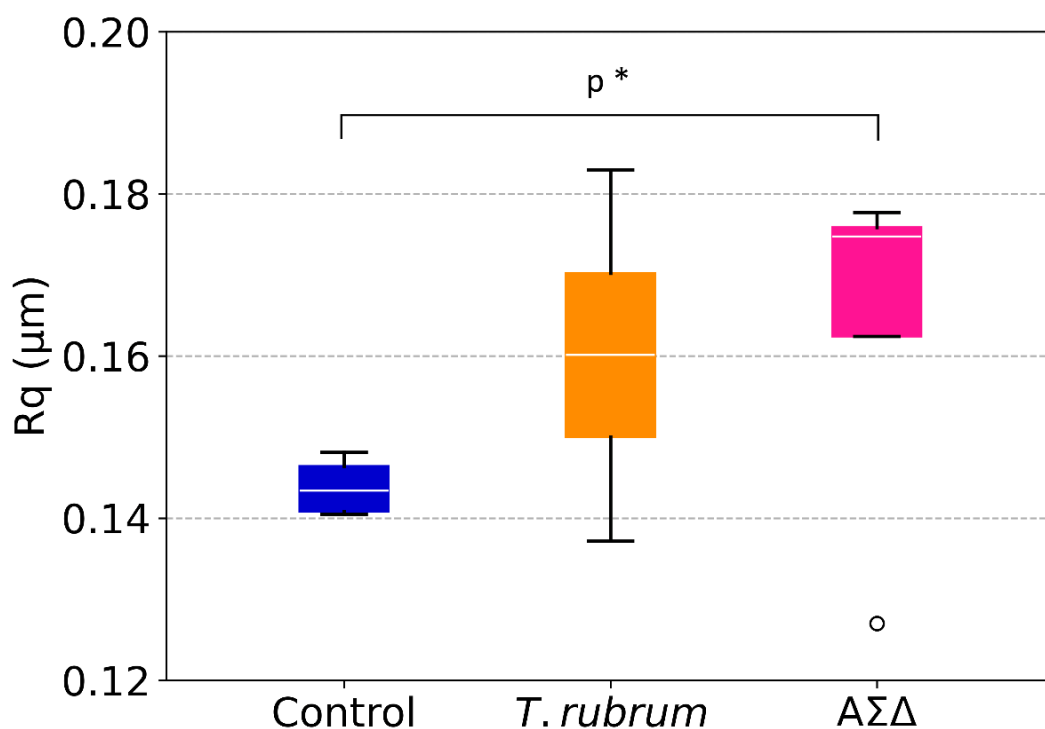
Η επιφανειακή τραχύτητα υπολογίστηκε στην ραχιαία επιφάνεια, η οποία επιλέχθηκε ώστε να προσομοιωθούν οι *in vivo* συνθήκες. Η επιφανειακή τραχύτητα αναφέρεται στις ανωμαλίες της επιφάνειας, και συνήθως υπολογίζεται με μέτρηση του profile της επιφάνειας με ειδική οργανολογία (profilometer), η οποία μπορεί να εξάγει τις παραμέτρους τραχύτητας: Ra, Rq, Rz. Οι παράμετροι τραχύτητας περιλαμβάνονται στο πρότυπο ISO 21920-2:2021 που καθορίζει τις γεωμετρικές προδιαγραφές διάφορων βιομηχανικών προϊόντων για την κατασκευή, την μέτρηση και την ποιότητα επιφανειών.(163) Στην παρούσα διατριβή, οι παράμετροι (Ra, Rq, Rz) υπολογίστηκαν με χρήση Python, όπου προσδιορίστηκε και οριοθετήθηκε το profile της επιφάνειας. Οι υπολογισμένες τιμές των παραμέτρων για κάθε δείγμα όνυχα απεικονίστηκαν σε boxplots (Γράφημα 3, Γράφημα 4, Γράφημα 5). Ο άξονας y αντιπροσωπεύει τις τιμές των δεικτών τραχύτητας (μm) για τις τρεις διαφορετικές ομάδες: υγιείς όνυχες (control), όνυχες προσβεβλημένοι από *T. rubrum* και όνυχες διαβητικών ατόμων. Τα κουτιά (boxes) αποτυπώνουν την κατανομή των δεδομένων για κάθε ομάδα, ενώ οι γραμμές διακύμανσης (whiskers) υποδεικνύουν τις ακραίες τιμές.

Για την οπτική διάκριση των ομάδων, τα boxplots παρουσιάστηκαν σε διαφορετικούς χρωματισμούς, αντίστοιχους με εκείνους που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση φασματοσκοπίας Raman. Οι λευκές γραμμές εντός των κουτιών αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή κάθε κατηγορίας. Η ομάδα control παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές Ra, με μικρή διακύμανση και την εμφάνιση outlier. Αντίθετα, η ομάδα *T. rubrum* εμφάνισε μεγαλύτερη διακύμανση, με υψηλότερες τιμές Ra σε σύγκριση με την ομάδα control. Η ομάδα διαβητικών ονύχων παρουσίασε επίσης, αυξημένες τιμές Ra, αν και με μικρότερη διακύμανση από την ομάδα *T. rubrum*.(Γράφημα 3)



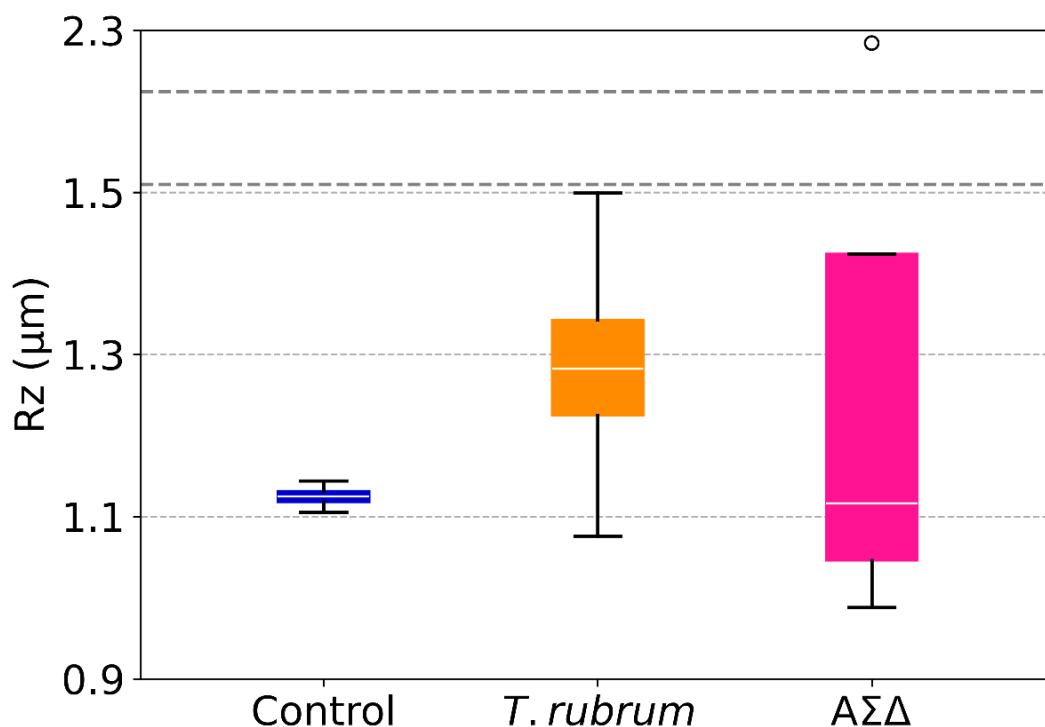
Γράφημα 3: Boxplot της επιφανειακής τραχύτητας Ra.

Η παράμετρος τραχύτητας R_q των control ονύχων ήταν $0.143\mu\text{m}$, με μικρή διακύμανση και σχετικά μικρές γραμμές διακύμανσης γεγονός που υποδηλώνει χαμηλή μεταβλητότητα στα δεδομένα. (Γράφημα 4) Αντίθετα, οι τιμές της τραχύτητας των ονύχων με *T. rubrum* εμφάνισαν μεγαλύτερη διασπορά, κυμαινόμενες από περίπου $0.14\mu\text{m}$ έως $0.18\mu\text{m}$, υποδηλώνοντας αυξημένη μεταβλητότητα. Η ομάδα των διαβητικών ονύχων είχε τιμές συγκεντρωμένες ανάμεσα σε $0.16\text{--}0.18\mu\text{m}$, με μικρότερη διασπορά συγκριτικά με την ομάδα *T. rubrum*, ενώ παρατηρήθηκε ένα outlier κάτω από το κύριο εύρος τιμών της.



Γράφημα 4: Boxplot της παραμέτρου R_q της επιφανειακής τραχύτητας. Ο αστερίσκος υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά (ANOVA, $p \leq 0.05$) μεταξύ των control και των ονύχων από διαβητικά άτομα, βάσει ανάλυσης two-way ANOVA και επακόλουθο έλεγχο με Tukey.

Αντίστοιχα, η παράμετρος τραχύτητας R_z εμφάνισε παρόμοια συμπεριφορά. (Γράφημα 5) Η ομάδα των control (μπλε κουτί) παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές R_z , περίπου στα 1.1 μm , με μικρή διακύμανση και στενά όρια κατανομής. Η ομάδα των ονύχων με *T. rubrum* εμφάνισε αυξημένες τιμές R_z και μεγαλύτερη διασπορά. Η ομάδα των διαβητικών ονύχων εμφάνισε την ευρύτερη κατανομή, καθώς και την παρουσία ενός ακραίου outlier κοντά στα 2.3 μm . Παρά τη μεγάλη διακύμανση, η μέση τιμή του R_z των διαβητικών ονύχων ήταν ίση με εκείνη της ομάδας των control.



Γράφημα 5: Boxplot της παραμέτρου Rz της επιφανειακής τραχύτητας. Ο άξονας y (Rz) έχει διακοπεί (ένδειξη με γκρι διακεκομμένες γραμμές) για να παρουσιαστεί το outlier πιο κοντά στο υπόλοιπο σύνολο δεδομένων.

Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές, εκτός αν αποκλείσουμε τα outliers από την ανάλυση. Στην περίπτωση αυτή, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην παράμετρο Rq μεταξύ των ομάδων control και διαβητικών (AΣΔ) (ANOVA, $p < 0.05$).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παράμετρος Ra για τους υγιείς όνυχες (μέση τιμή: 87 ± 4 nm) ήταν αρκετά χαμηλότερη σε σύγκριση με τις τιμές της βιβλιογραφίας: 308 ± 52 nm(164) και 1280 ± 870 nm(108). Η απόκλιση αποδίδεται στις διαφορετικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς η OCT διαθέτει χαμηλότερη αξονική ανάλυση της τάξης 11 μ m συγκριτικά με τα profilometers που έχουν κάτω από 1 nm. Στους προσβεβλημένους παρατηρήθηκε αύξηση ($Ra = 99 \pm 28$ nm), εύρημα που δικαιολογείται από βιβλιογραφικά δεδομένα από μικροσκοπία SEM: η μυκητιασική προσβολή προκαλεί αποδόμηση της κερατίνης, οδηγώντας σε ανομοιογένεια, ρωγμές και επιφανειακές αυλακώσεις.(108) Αξιοσημείωτο είναι ότι η βιβλιογραφία αναφέρει μείωση της τιμής Ra, αν και μη-στατιστικά σημαντική. Η συγγραφέας ερμηνεύει το αποτέλεσμα σημειώνοντας ότι η Ra καταγράφει τοπικές μικρο-αποκλίσεις και όχι μεγάλες δομικές αλλοιώσεις. Επίσης, η μόλυνση ξεκινά από τη μήτρα ή το υπονύχιο, περιοχές που δεν επηρεάζουν απαραίτητα άμεσα την επιφανειακή τραχύτητα.(108) Όσον αφορά στους διαβητικούς

ασθενείς, η τιμή Ra ανήλθε σε 109 ± 20 nm (μέση τιμή). Δεν εντοπίστηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα για την συγκεκριμένη παράμετρο, αλλά υπάρχουν αναφορές αλλοιωμένης μορφολογίας με χρήση SEM, ιδίως στην κοιλιακή πλευρά λόγω αυξημένης γλυκοζυλίωσης.(74) Επιπλέον, μετρήσεις της Rq με χρήση AFM (Atomic Force Microscopy), κατέδειξαν σημαντική αύξηση στους διαβητικούς (81.03 nm έναντι 48.93 nm στους υγιείς, αύξηση 39.6%, $p=0.04$),(74) αποτέλεσμα που συμφωνεί με την παρούσα μελέτη ($Rq = 143$ nm στους υγιείς και 17 nm στους διαβητικούς), παρά τις διαφορές στις τεχνικές. Τέλος, η τιμή Rz παρουσίασε επίσης αύξηση στους μυκητιασμένους όνυχες (1.28 μ m) σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες (1.12 μ m), αν και δεν εντοπίστηκαν συγκρίσιμες βιβλιογραφικές αναφορές για την παράμετρο αυτή. Οι μέσες τιμές της υπολογισμένης επιφανειακής τραχύτητας, καθώς και οι αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές, συνοδευόμενες από τις τυπικές τους αποκλίσεις, καταγράφονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Μέσες τιμές των παραμέτρων τραχύτητας. Στην γραμμή με γκρι σκίαση, καταγράφονται οι υπολογισμοί της διατριβής, ενώ στις επόμενες τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας.

Παράμετρος τραχύτητας Ra (μέση τιμή σε nm)

Ομάδες ονύχων	Control	Δερματοφύτα	ΑΣΔ
Υπολογισμός διατριβής	87 ± 4	99 ± 28	109 ± 20
Βιβλιογραφία	308 ± 52 (164)		
Βιβλιογραφία	1280 ± 870 (108)	1100 ± 380 (108)	

Παράμετρος τραχύτητας Rq (μέση τιμή σε nm)

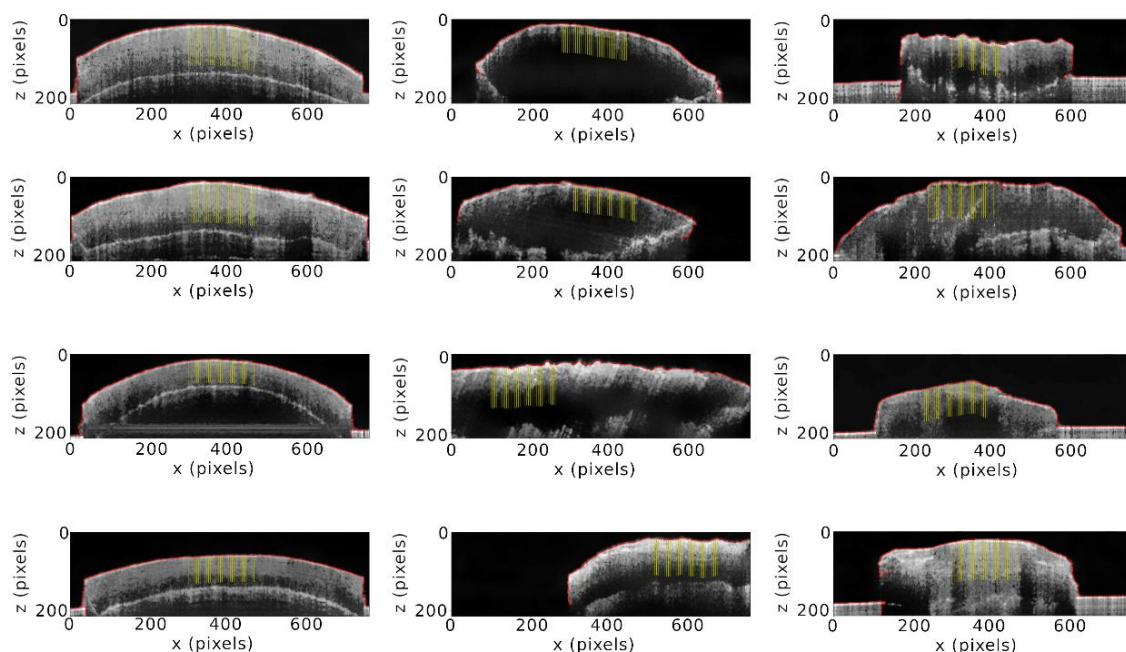
Υπολογισμός διατριβής	143 ± 3	160 ± 19	175 ± 24
Βιβλιογραφία	48.93 ± 4.12 (74)	81.03 ± 4.31 * (74)	

Παράμετρος τραχύτητας Rz (μέση τιμή σε μ m)

Υπολογισμός διατριβής	1.12 ± 0.02	1.28 ± 0.17	1.12 ± 0.57
-----------------------	-----------------	-----------------	-----------------

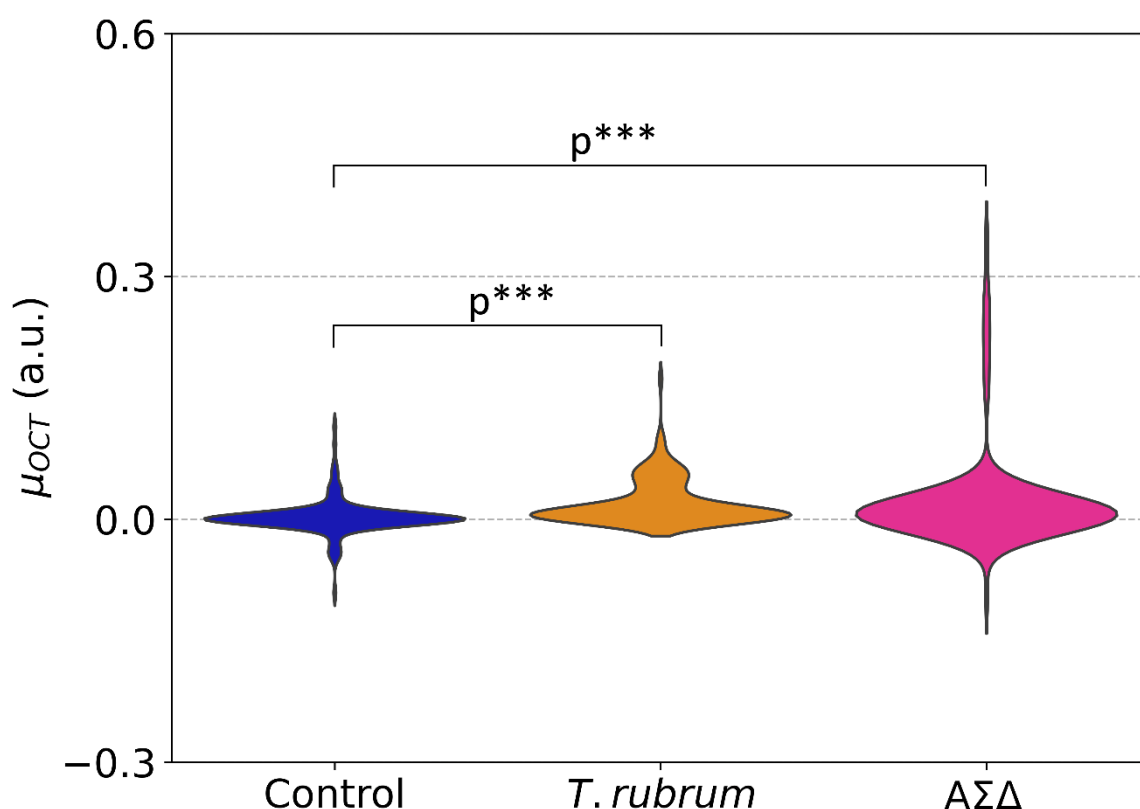
3.4.2 Υπολογισμός μ_{OCT}

Ο συντελεστής εξασθένησης μ_{OCT} , υπολογίστηκε με βάση το μοντέλο μονής σκέδασης. Ο συντελεστής αντικατοπτρίζει τον βαθμό απορρόφησης και σκέδασης του φωτός κατά τη διέλευσή του από τον ιστό, παρέχοντας πληροφορίες για την οπτική διαπερατότητα, την πυκνότητα του υλικού και πιθανές δομικές ανωμαλίες. Σε ομοιογενή και διαφανή υλικά, ο μ_{OCT} λαμβάνει χαμηλές τιμές, ενώ αυξάνεται σε αδιαφανή ή ετερογενή δείγματα. Η διαφάνεια της ονυχίας πλάκας θεωρείται βασικό χαρακτηριστικό υγιούς ιστού, ενώ η αυξημένη αδιαφάνεια μπορεί να σχετίζεται με παθολογικές αλλοιώσεις. (116) Οι τιμές του συντελεστή μ_{OCT} προσδιορίστηκαν μέσω της ανάλυσης της εξασθένησης του φωτός σε πολλαπλές, παράλληλες διαδρομές ίσου βάθους, κάθετες σε επιλεγμένες περιοχές κοντά στο κέντρο της επιφάνειας των ονύχων. (Εικόνα 52)



Εικόνα 52: Απεικονίσεις OCT από υγιείς (1η στήλη), μυκητιακούς (2η στήλη) και διαβητικούς όνυχες (3η στήλη). Οι κίτρινες γραμμές υποδεικνύουν τις περιοχές υπολογισμού του μ_{OCT} .

Η κατανομή των τιμών μ_{OCT} για κάθε ομάδα παρουσιάστηκε σε violin plots. Οι υγιείς όνυχες (ομάδα control) εμφάνισαν συγκεντρωμένες τιμές κοντά στο μηδέν, υποδεικνύοντας χαμηλή μεταβλητότητα. Αντιθέτως, οι όνυχες με *T. rubrum* έδειξαν μετατόπιση προς υψηλότερες τιμές, ενώ οι διαβητικοί εμφάνισαν τη μεγαλύτερη διασπορά.



Διάγραμμα 8: Violin plot των τιμών μ_{OCT} για τις τρεις ομάδες. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (ANOVA, $p \leq 0.001$) μεταξύ της ομάδας control και των παθολογικών ομάδων, βάσει two-way ANOVA και ελέγχου Tukey.

Πίνακας 8: Μέση τιμή του μ_{OCT} για κάθε ομάδα ονύχων. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν την στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0.001$) σε σύγκριση με την ομάδα control.

Κατηγορίες ονύχων	Control	<i>T. rubrum</i>	ΑΣΔ
μ_{OCT} (μm^{-1})	$0.003 \cdot 10^{-3}$	0.010 ***	0.006 ***

Συμπερασματικά, οι υγιείς όνυχες χαρακτηρίζονται από ομοιογενή και διαφανή δομή, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες που βασίστηκαν σε μικρο-υπολογιστική τομογραφία (micro-CT), όπως αυτή του Sihota et al.,(74) μέσω του συστήματος Phoenix Nanotom S. (Εικόνα 40) Η χαμηλή τιμή του μ_{OCT} αντικατοπτρίζει την υψηλή πυκνότητα και χαμηλή πορωσιμότητα της ονυχιαίας πλάκας. Αντίθετα, οι όνυχες ασθενών με αρρύθμιστο σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζουν μειωμένη πυκνότητα και αυξημένη πορωσιμότητα, γεγονός που οδηγεί στην δημιουργία μικρο-κενών και ανομοιογενούς δομής.(74) Ως αποτέλεσμα, η δέσμη φωτός της OCT συναντά μεταβολές στον δείκτη διάθλασης (στα όρια μεταξύ αέρα-κερατίνης ή ασβεστίου-κερατίνης), προκαλώντας έντονη σκέδαση σε

πολλαπλές κατευθύνσεις με κυρίαρχη την οπισθοσκέδαση. Η μειωμένη επιστροφή του οπτικού σήματος προς τον ανιχνευτή οδηγεί σε αύξηση του συντελεστή εξασθένησης μ_{OCT} , όπως καταγράφεται από το σύστημα OCT.(165) Ακόμη μεγαλύτερη αύξηση του συντελεστή εξασθένησης παρατηρείται σε προσβεβλημένους όνυχες, καθώς, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μυκητιασική προσβολή διαταράσσει την φυσιολογική διαδικασία κερατινοποίησης και οδηγεί στον σχηματισμό συριγγίων και μικροδομικών αλλοιώσεων εντός της ονυχαίας πλάκας. Οι αλλοιώσεις αυτές ενισχύουν την σκέδαση του φωτός, συμβάλλοντας σε μεγαλύτερη μείωση του επιστρεφόμενου σήματος και, συνεπώς, την περαιτέρω αύξηση του συντελεστή εξασθένησης.

3.5 Γλυκοζυλίωση ονύχων

Τέλος, αξιολογήθηκε η φασματοσκοπία Raman στην εκτίμηση της γλυκοζυλίωσης πρωτεϊνών, στο πλαίσιο της διάγνωσης του σακχαρώδη διαβήτη. Ο οδηγός για την συγκεκριμένη μελέτη προήλθε από το άρθρο των Monteyne et al.,(166) οι οποίοι χρησιμοποίησαν φασματοσκοπία υπερύθρου (NIR) για την εκτίμηση της γλυκοζυλίωσης της κερατίνης σε όνυχες ανθρώπων, προτείνοντας την μέθοδο ως μια υποσχόμενη μη-επεμβατική και οικονομικά αποδοτική τεχνική διάγνωσης.

Η μελέτη τους περιλάμβανε θρυμματισμένα και μη-θρυμματισμένα δείγματα ονύχων από υγιή άτομα και διαβητικούς ασθενείς. Υγιείς όνυχες (και των δύο τύπων) επώαστηκαν *in vitro* σε διαλύματα γλυκόζης συγκέντρωσης: 0.278 mol/L, 0.556 mol/L και 0.833 mol/L, ώστε να διερευνηθούν οι σταδιακές επιδράσεις της γλυκοζυλίωσης. Οι φασματικές διαφορές παρατηρήθηκαν κυρίως στις περιοχές 4150–5700 cm^{-1} και 6600–7500 cm^{-1} . Για τους θρυμματισμένους όνυχες παρατηρήθηκαν οι εξής διαφορές:

- Η κορυφή 4666 cm^{-1} (σχετίζεται με την απορρόφηση του CONH_2) έγινε ευρύτερη με την αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης
- Η ζώνη RCO_2H μετακινήθηκε από τα 5253 cm^{-1} (0.278 mol/L) στα 5272 cm^{-1} (0.556 mol/L).

Για τους μη-θρυμματισμένους όνυχες οι διαφοροποιήσεις περιλάμβαναν αλλαγές στην θέση και στην ένταση των κορυφών. Συγκεκριμένα:

- Οξύτερη κορυφή στα 4280 cm^{-1}
- Μετατόπιση της κορυφής 5071 cm^{-1} προς 5077 cm^{-1} και 5081 cm^{-1} ανάλογα με τα επίπεδα γλυκόζης,
- Επέκταση της ζώνης RCO_2H , με εμφάνιση νέων κορυφών στα 5384 cm^{-1} και 5415 cm^{-1}
- Μεταβολές σε ένταση και θέση των κορυφών 7190 cm^{-1} και 7420 cm^{-1} .

Η αντιστοίχιση φασματικών περιοχών μεταξύ NIR και Raman (Πίνακας 9) ανέδειξε συσχετισμούς μεταξύ των κορυφών γλυκόζης και των δονήσεων πρωτεϊνών, ιδίως στις περιοχές 1125, 1375, 1550 και 1650 cm^{-1} , που αντιστοιχούν στις δονήσεις $\nu(\text{C}-\text{O})$, $\nu(\text{C}-\text{H})$ και αμιδίων I και II. Αντίθετα, οι υπερτονικές δονήσεις του NIR είναι εξασθενημένες ή απύσες στο Raman.

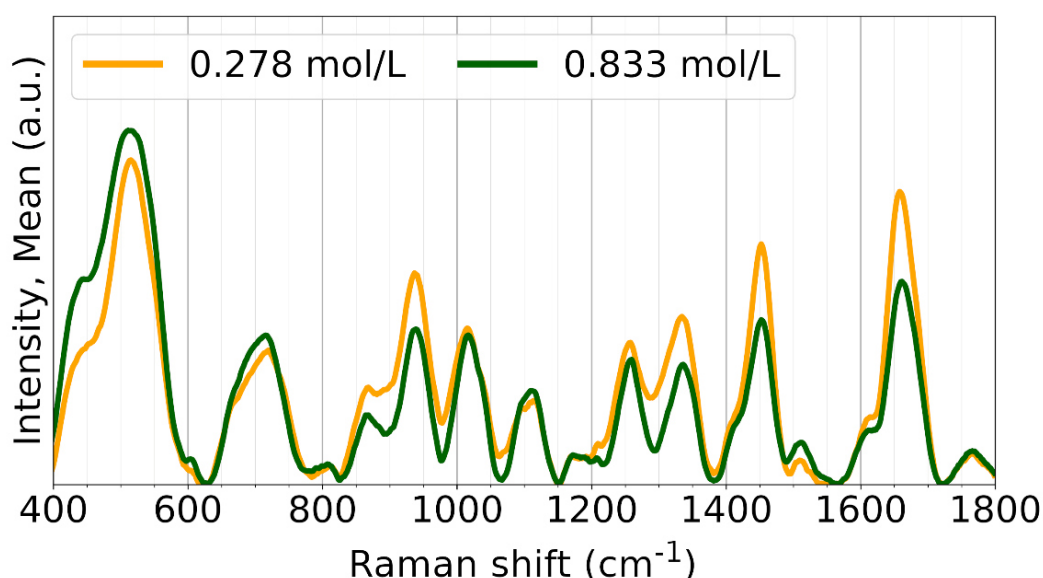
Πίνακας 9: Αντιστοίχιση κορυφών σε δονήσεις NIR και RS. Βιβλ. αναφορές: (102,164,165)

Near-infrared spectroscopy (NIRS)		Raman spectroscopy (RS)	
Wavenumber (cm^{-1})	Αντιστοίχιση κορυφών	Shift (cm^{-1})	Αντιστοίχιση κορυφών
4280	$\nu(\text{C}-\text{H})$	2900 – 2950	$\nu(\text{C}-\text{H})$, Γλυκόζη
4321	$\nu(\text{C}-\text{H})$, $\nu(\text{C}-\text{H})$, $\delta(\text{O}-\text{H})$, Γλυκόζη	1050 – 1150 1340 – 1460 2900	$\nu(\text{C}-\text{O})$, $\nu(\text{C}-\text{H})$, Γλυκόζη
4435	$\nu(\text{CH})$, $\nu(\text{OH})$, Γλυκόζη	1375 1125 2900	$\nu(\text{C}-\text{O})$, $\nu(\text{C}-\text{H})$, $\nu(\text{O}-\text{H})$, Υδατάνθρακες
4666	$\nu(\text{CONH}_2)$	1650 (Αμίδιο I) 1550 (Αμίδιο II)	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{N}-\text{H})$, $\delta(\text{N}-\text{H})$, Πρωτεΐνες, Κερατίνη
5071 – 5253	$\nu(\text{RCO}_2\text{H})$	–	–
6900 – 7420	$\nu(\text{OH})$ overtone	–	–

Στην παρούσα *in vitro* μελέτη, δείγματα μη-θρυμματισμένων ονύχων από 8 κλινικά υγιή άτομα επωάστηκαν σε διαλύματα γλυκόζης συγκέντρωσης 0.278 mol/L (n=4) και 0.833 mol/L (n=4). Τα μέσα φάσματα (Εικόνα 53), αποκάλυψαν αξιοσημείωτη αντιστροφή έντασης γύρω στα 800 cm^{-1} , με τα δείγματα σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης να εμφανίζουν υψηλότερη ένταση στην περιοχή κάτω από τα 800 cm^{-1} , σε σύγκριση με τα δείγματα σε χαμηλή συγκέντρωση. Ωστόσο, γνωρίζουμε ότι η αύξηση της γλυκοζυλίωσης,

προκαλεί μείωση της έντασης των κορυφών τόσο των δισουλφιδικών δεσμών όσο και των αμιδικών.(74) Η γλυκοζυλίωση προκαλεί μεταβολές στο τοπικό περιβάλλον των S–S δεσμών, όπως μερική αποδιοργάνωση της δευτεροταγούς δομής και μετατόπιση άλλων ομάδων, γεγονός που αυξάνει την φασματοσκοπική "ορατότητα" αυτών. Έτσι, υποθέτουμε ότι η φασματική αντιστροφή αποτελεί ένδειξη μεταβολής της ενεργότητας στο Raman και όχι ποσοτικής μεταβολής των δεσμών, αναδεικνύοντας την δομική επίδραση της γλυκόζης στο μόριο της πρωτεΐνης.

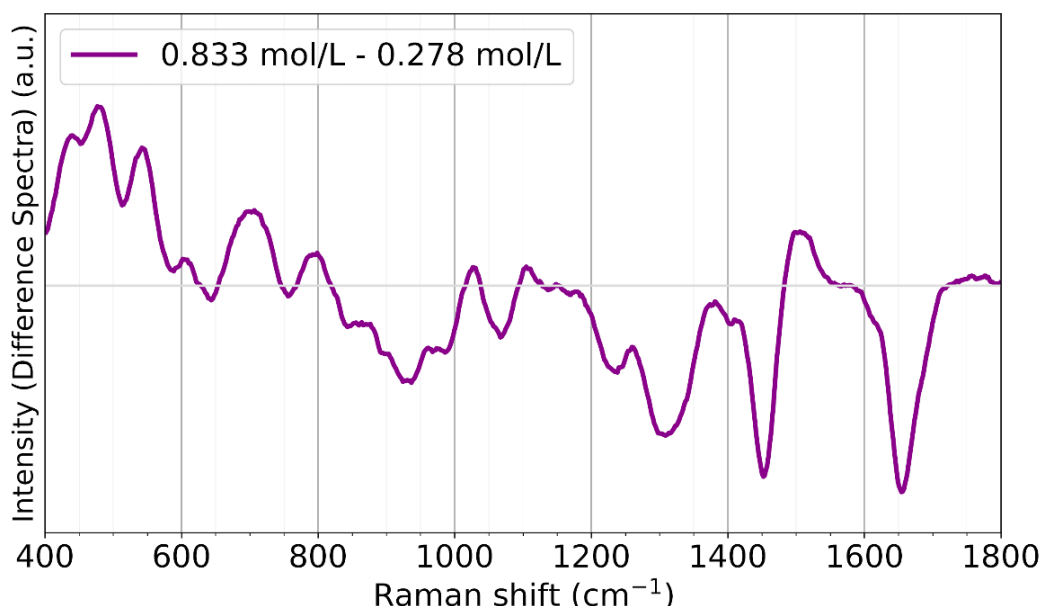
Επιπλέον, παρατηρήθηκε συγχώνευση της κορυφής στα 1115 cm^{-1} με την γειτονική στα 1091 cm^{-1} , δημιουργώντας πλατύτερο σήμα με αυξημένη ένταση στα δείγματα υψηλής συγκέντρωσης. Παρότι αναμένονται αλλαγές και στην περιοχή $1340\text{--}1460\text{ cm}^{-1}$, η επικάλυψη των κορυφών γλυκόζης από τις δονήσεις των αμιδίων καθιστά δύσκολη την απομόνωση καθαρών σημάτων.



Εικόνα 53: Τα μέσα φάσματα Raman των *in vitro* γλυκοζυλιωμένων ονύχων σε διαλύματα γλυκόζης με συγκεντρώσεις 0.278 mol/L και 0.833 mol/L.

Η ανάλυση του φάσματος διαφοράς μεταξύ των δύο ομάδων γλυκοζυλίωσης (Εικόνα 54) ανέδειξε σημαντικές κορυφές στις περιοχές $500\text{--}550\text{ cm}^{-1}$ και $1250\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$, υποδηλώνοντας αναδιαμόρφωση της δευτεροταγούς δομής και μεταβολή των δισουλφιδικών δεσμών. Αν και η κερατίνη είναι μια σταθερή πρωτεΐνη, σε συνθήκες παρατεταμένης υπεργλυκαιμίας, οι ελεύθερες αμινομάδες της υπόκεινται σε μη-ενζυματική γλυκοζυλίωση οδηγώντας στον σχηματισμό συμπλόκων με AGEs.(70) Αντίθετα, οι χαρακτηριστικές κορυφές της γλυκόζης ($1050\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$) δεν

παρατηρήθηκαν, υποδηλώνοντας ότι είτε η συγκέντρωσή της ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) (ή λόγω χρόνου), είτε η γλυκόζη είχε πλήρως ενσωματωθεί στην δομή της κερατίνης.



Εικόνα 54: Διαφορά φασμάτων των *in vitro* γλυκοζυλιωμένων ονύχων στα διαλύματα γλυκόζης. Η οριζόντια γραμμή αντιπροσωπεύει την μηδενική ένταση, η οποία αντιστοιχεί σε τέλεια ομοιότητα μεταξύ των δύο φασμάτων που συγκρίνονται.

Η μέθοδος, στο παρόν στάδιο ανάπτυξης, παραμένει ποιοτική, χωρίς να παρέχει άμεση ποσοτική εκτίμηση του βαθμού γλυκαιμικού ελέγχου. Επιπλέον, η σημαντική εξάρτηση από τη σωστή επιλογή φασματικών παραμέτρων και μεθόδων προεπεξεργασίας υποδεικνύει ότι απαιτείται περαιτέρω τυποποίηση πριν από την κλινική εφαρμογή. Τέλος, η ανάγκη για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων σε μεγαλύτερους, πολυπληθέστερους και δημογραφικά ετερογενείς πληθυσμούς είναι απαραίτητη προκειμένου να αυξηθεί η αξιοπιστία της τεχνικής.

4 Συμπεράσματα

Η παρούσα διδακτορική διατριβή ανέδειξε τη χρησιμότητα της φασματοσκοπίας Raman και της τομογραφία οπτικής συνοχής, για την *ex vivo* μελέτη μοριακών και μικρομορφολογικών χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την ονυχομυκητίαση στο γενικό πληθυσμό και σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Μελετήθηκαν οι αλλοιώσεις στη δευτεροταγή δομή της κερατίνης και στην μικρο-αρχιτεκτονική των ονύχων, οι οποίες σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση για μυκητιασικές λοιμώξεις σε διαβητικούς ασθενείς.

Συγκεκριμένα, η χρόνια γλυκοζυλίωση των ονύχων επηρεάζει την ένταση και το εμβαδόν της κορυφής Raman της α -έλικας του αμιδίου I, ενώ το *ex vivo* πειραματικό μοντέλο τεχνητής γλυκοζυλίωσης, επιβεβαίωσε την επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης στην ένταση των αμιδικών δεσμών. Παράλληλα, η τομογραφία οπτικής συνοχής αποκάλυψε μεταβολές στην επιφανειακή τραχύτητα και στην μορφολογία των ονύχων, οι οποίες ποσοτικοποιήθηκαν μέσω των δεικτών Ra, Rq, Rz και του συντελεστή εξασθένησης μ_{opt} . Πέραν των επιδράσεων του σακχαρώδη διαβήτη, η παρουσία *Trichophyton spp.* προκαλεί χαρακτηριστικές φασματοσκοπικές μεταβολές, επιτρέποντας τη διάγνωση της ονυχομυκητίασης ακόμη και σε συνθήκες μεταβολικής συννοσηρότητας. Η ανάλυση των κορυφών των αμιδίων του φάσματος, όπως και ο λόγος δισουλφικών προς αμιδικών δεσμών, αναδεικνύονται ως δυνητικοί βιοδείκτες της λοίμωξης. Επιπλέον, η εμβάπτιση των δειγμάτων σε αιθυλική αλκοόλη ενίσχυσε τη διαγνωστική ακρίβεια σε περιπτώσεις ονυχομυκητίασης από *T. rubrum*, λόγω της διαφοροποιημένης ικανότητας κατακράτησης και εξάτμισης του διαλύτη μεταξύ υγιών και παθολογικών δειγμάτων. Η ταχύτερη απομάκρυνση της αιθυλικής αλκοόλης στους παθολογικούς όνυχες αντικατοπτρίζει αλλοιώσεις στην μικροδομή της ονυχαίας πλάκας, οι οποίες επηρεάζουν την φυσιολογική ενυδάτωση και υποστηρίζουν την ύπαρξη λοίμωξης.

Συνολικά, τα ευρήματα της διατριβής αναδεικνύουν τη φασματοσκοπία Raman και την τομογραφία οπτικής συνοχής ως μη-επεμβατικά εργαλεία υψηλής διαγνωστικής αξίας, με ικανότητα να προσφέρουν γρήγορη και χωρίς ειδική προετοιμασία αξιολόγηση της κατάστασης των κερατινικών ιστών. Η παρούσα μελέτη θέτει τις βάσεις για την *in vivo* εφαρμογή τους, με στόχο την δημιουργία διαγνωστικών πρωτοκόλλων, ικανών να ανιχνεύσουν πρώιμες δομικές ή μοριακές αλλοιώσεις στο πλαίσιο της κλινικής πράξης.

5 Περίληψη

Η ονυχομυκητίαση, η συχνότερη λοίμωξη των ονύχων, προσβάλλει κυρίως τους όνυχες των κάτω άκρων και μπορεί να επηρεάσει όλα τα ανατομικά τους μέρη. Αν και δεν αποτελεί απειλή για την γενική κατάσταση του ασθενούς, συχνά προκαλεί παραμόρφωση των ονύχων και πόνο, επηρεάζοντας σημαντικά την ποιότητα ζωής. Σημαντικό πρόβλημα προκύπτει στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, καθώς η παθοφυσιολογική αλληλεπίδραση των δύο καταστάσεων μπορεί να συμβάλει στην εμφάνιση σοβαρών επιπλοκών, όπως το διαβητικό πόδι. Η διάγνωση βασίζεται κυρίως στην άμεση μικροσκόπηση ρινισμάτων και στην καλλιέργεια δειγμάτων ονύχων σε καλλιεργητικά υποστρώματα, τεχνικές που απαιτούν χρόνο και εξειδικευμένο προσωπικό. Ο ακριβής προσδιορισμός του παθολογικού αιτίου είναι αναγκαία προϋπόθεση για την ορθολογική επιλογή της θεραπείας και την επιτυχή αποφυγή μίας υποτροπής. Τεχνικές φασματοσκοπίας, όπως η φασματοσκοπία Raman και μη-καταστρεπτικές απεικονιστικές τεχνικές, όπως η τομογραφία οπτικής συνοχής, προσφέρουν μη-επεμβατική, άμεση και υψηλής διακριτικής ικανότητας απεικόνιση των ιστών.

Η παρούσα διατριβή μελέτησε *ex vivo* την μοριακή σύσταση και την μικρομορφολογία της ονυχίας πλάκας υγιών και παθολογικών ονύχων, με την χρήση φασματοσκοπίας Raman και τομογραφίας οπτικής συνοχής, εστιάζοντας στην διάγνωση της ονυχομυκητίασης, ιδίως σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Επιπλέον, διερευνήθηκε πειραματικά η ανίχνευση τροποποιήσεων στην γλυκοζυλίωση της ονυχίας πλάκας (σχετιζόμενες με τον διαβήτη), και κατά πόσο επηρεάζουν την ευαισθησία στην ανάπτυξη ονυχομυκητίασης.

Κατά την διάρκεια της μελέτης εξετάστηκαν ρινίσματα ονύχων από τέσσερις διακριτές ομάδες εθελοντών (υγιείς, πάσχοντες από ονυχομυκητίαση, πάσχοντες από σακχαρώδη διαβήτη, πάσχοντες από ονυχομυκητίαση και σακχαρώδη διαβήτη), τα οποία ταξινομήθηκαν με βάση τις τιμές HbA1c και τα αποτελέσματα των μυκητολογικών εξετάσεων. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπική (Raman) και απεικονιστική (OCT) ανάλυση, σε ορισμένα στάδια προεπεξεργασίας. Η επεξεργασία των φασματικών δεδομένων περιλάμβανε μεθόδους πολυπαραμετρικής ανάλυσης (PCA και PLS-DA), καθώς και αποσυνέλιξη χαρακτηριστικών κορυφών που σχετίζονται με γνωστούς δείκτες, όπως οι δισουλφιδικοί και οι αμιδικοί δεσμοί. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της μορφολογίας με δείκτες επιφανειακής τραχύτητας (R_a , R_q , R_z) και υπολογισμός του συντελεστή εξασθένησης (μ_{OCT}) των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν σημαντικές μεταβολές στην δευτεροταγή δομή της κερατίνης και στην μορφολογία της ονυχίας πλάκας, ενισχύοντας την υπόθεση ότι οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη εμφανίζουν αυξημένη προδιάθεση για ανάπτυξη ονυχομυκητίασης. Ο συνδυασμός της φασματοσκοπίας Raman και της τομογραφίας

οπτικής συνοχής αναδεικνύεται ως καινοτόμος προσέγγιση για την ανίχνευση μοριακών και δομικών αλλοιώσεων, θέτοντας τις βάσεις για μελλοντική *in vivo* εφαρμογή στην κλινική διάγνωση.

Λέξεις-κλειδιά: Ονυχομυκητίαση, Σακχαρώδης διαβήτης, Ονυχαία πλάκα, Φασματοσκοπία Raman, Τομογραφία οπτικής συνοχής

6 Abstract

Onychomycosis is the most common nail infection, mainly affecting toenails and potentially involving all anatomical parts of the nail unit. Although it is not life-threatening, it often leads to nail deformation and pain, significantly impacting quality of life. In patients with diabetes mellitus, the condition is of clinical concern, as it can contribute to serious complications such as diabetic foot and increase susceptibility to fungal infections. Diagnosis typically relies on direct microscopic examination of nail scrapings and fungal cultures grown on selective media, methods that are time-consuming and require specialized personnel. However, accurate identification of the infectious agent is essential for appropriate treatment and to prevent recurrence. Non-invasive techniques, such as Raman spectroscopy and optical coherence tomography (OCT), offer rapid, high-resolution imaging and molecular characterization of tissues, making them promising tools for diagnosis.

This thesis conducted an *ex vivo* investigation of the molecular composition and micromorphology of the nail plate, using Raman spectroscopy and OCT, specifically focusing on the diagnosis of onychomycosis in diabetic patients. Additionally, it explored whether diabetes-related changes in nail glycation affect susceptibility to fungal infection.

Nail clippings were collected from four distinct groups of volunteers: healthy individuals, patients with onychomycosis, patients with diabetes, and patients with both conditions. The samples were classified based on HbA1c levels and results from mycological testing. Raman and OCT examinations were performed at various stages of sample preparation. Spectral data were analyzed using multivariate techniques (PCA and PLS-DA), including deconvolution of spectral peaks corresponding to known biochemical markers such as disulfide and amide bonds. Morphological features were assessed using surface roughness parameters (R_a , R_q , R_z) and attenuation coefficients (μ_{OCT}).

The results revealed significant alterations in keratin secondary structure and nail morphology, supporting the hypothesis that patients with diabetes are more susceptible to onychomycosis. Raman spectroscopy combined with OCT offers a novel approach for detection of molecular and structural changes, with potential for future *in vivo* clinical use.

Keywords: Onychomycosis, Diabetes mellitus, Nail plate, Raman spectroscopy, Optical coherence tomography

7 Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Rogers M. Nail manifestations of some important genetic disorders in children. *Dermatologic Therapy*. 2002;15(2):111–20.
2. Rich P. Nail changes due to diabetes and other endocrinopathies. *Dermatologic Therapy*. 2002;15(2):107–10.
3. Kosinski MA, Stewart D. Nail changes associated with systemic disease and vascular insufficiency. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*. 1989;6(2):295–318.
4. Cashman MW, Sloan SB. Nutrition and nail disease. *Clinics in Dermatology*. 2010 July 1;28(4):420–5.
5. Haneke E. Nail surgery. In: *Cosmetic Medicine and Surgery*. CRC Press; 2016.
6. Solimini R, Minutillo A, Kyriakou C, Pichini S, Pacifici R, Busardo FP. Nails in forensic toxicology: an update. *Current Pharmaceutical Design*. 2017 Oct 1;23(36):5468–79.
7. Faergemann J, Baran R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *Br J Dermatol*. 2003 Sept;149(s65):1–4.
8. Tosti A, Hay R, Arenas-Guzmán R. Patients at risk of onychomycosis – risk factor identification and active prevention. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2005;19(s1):13–6.
9. Baran R, de Berker DA, Holzberg M, Thomas L. Baran and Dawber’s diseases of the nails and their management. John Wiley & Sons; 2019.
10. Piraccini BM, Piraccini BM. Nail anatomy and physiology for the clinician. *Nail Disorders: A Practical Guide to Diagnosis and Management*. 2014;1–6.
11. Williams PL. *Gray’s anatomy*. (No Title). 1989;592.
12. Smith DO, Oura C, Kimura C, Toshimori K. Artery anatomy and tortuosity in the distal finger. *The Journal of hand surgery*. 1991;16(2):297–302.
13. Flint M. Some observations on the vascular supply of the nail bed and terminal segments of the finger. *British Journal of Plastic Surgery*. 1955;8:186–95.
14. Smith DO, Oura C, Kimura C, Toshimori K. The distal venous anatomy of the finger. *The Journal of hand surgery*. 1991;16(2):303–7.
15. Zaias N. The longitudinal nail biopsy. *Journal of Investigative Dermatology*. 1967;49(4):406–8.

16. Pessa JE, Tsai TM, Li Y, Kleinert HE. The repair of nail deformities with the nonvascularized nail bed graft: indications and results. *The Journal of hand surgery*. 1990;15(3):466–70.
17. Lynn R, Steiner R, Van Wyk F. Arteriographic appearances of the digital arteries of the hands in Raynaud's disease. *The Lancet*. 1955;265(6862):471–4.
18. Samman PD, Strickland B. Abnormalities of the fingernails associated with impaired peripheral blood supply. *British Journal of Dermatology*. 1962;74(5):165–73.
19. Kitayama Y, Tsukada S. Congenital onychodysplasia: report of 11 cases. *Archives of Dermatology*. 1983 Jan 1;119(1):8–12.
20. Dawber R. The effect of immobilization on fingernail growth. *Clinical and Experimental Dermatology*. 1981;6(5):533–5.
21. Orentreich N, Markofsky J, Vogelmann JH. The effect of aging on the rate of linear nail growth. *Journal of Investigative Dermatology*. 1979;73(1):126–30.
22. Currie A, Gallagher P. The pathology of clubbing: vascular changes in the nail bed. *British journal of diseases of the chest*. 1988;82:382–5.
23. Haneke E. Anatomy of the nail unit and the nail biopsy. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. 2015 June 1;34:95–100.
24. de Berker DAR, André J, Baran R. Nail biology and nail science. *Int J Cosmet Sci*. 2007 Aug;29(4):241–75.
25. de Berker D. Nail anatomy. *Clinics in Dermatology*. 2013 Sept 1;31(5):509–15.
26. Hamilton JB, Terada H, Mestler GE. Studies of growth throughout the lifespan in Japanese: growth and size of nails and their relationship to age, sex, heredity, and other factors. *Journal of gerontology*. 1955;10(4):401–15.
27. Caputo R, Gasparini G, Contini D. A freeze-fracture study of the human nail plate. *Archives of Dermatological Research*. 1981;272:117–25.
28. Garson J, Baltenneck F, Leroy F, Riekel C, Müller M. Histological structure of human nail as studied by synchrotron X-ray microdiffraction. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2000;46(6):1025–34.
29. Achten G, Pierre M. *The Nail*. Churchill Livingstone; 1982.
30. Kobayashi Y, Miyamoto M, Sugibayashi K, Morimoto Y. Drug permeation through the three layers of the human nail plate. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 1999;51(3):271–8.
31. Wang B, Yang W, McKittrick J, Meyers MA. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*. 2016;76:229–318.

32. Lewis BL. Microscopic studies of fetal and mature nail and surrounding soft tissue. *AMA archives of dermatology and syphilology*. 1954;70(6):732–47.
33. Baden HP. The Physical Properties of Nail. *Journal of Investigative Dermatology*. 1970 Aug 1;55(2):115–22.
34. Farran L, Ennos AR, Eichhorn SJ. The effect of humidity on the fracture properties of human fingernails. *Journal of Experimental Biology*. 2008 Dec 1;211(23):3677–81.
35. Farren L, Shayler S, Ennos A. The fracture properties and mechanical design of human fingernails. *Journal of Experimental Biology*. 2004;207(5):735–41.
36. Savinov SS, Sharypova RM, Drobyshev AI. Determination of the trace element composition of human nails. *J Anal Chem*. 2020 Mar 1;75(3):409–15.
37. Benson HAE, Roberts MS, Leite-Silva VR, Walters K, editors. *Cosmetic formulation: principles and practice*. Boca Raton: CRC Press; 2019. 514 p.
38. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology*. 2008;129(6):705–33.
39. Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annual Review of Biochemistry*. 2004 July 1;73(Volume 73, 2004):749–89.
40. Chou CC, Buehler MJ. Structure and mechanical properties of human trichocyte keratin intermediate filament protein. *Biomacromolecules*. 2012;13(11):3522–32.
41. Pauling L, Corey RB, Branson HR. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1951 Apr;37(4):205–11.
42. Dowling LM, Crewther WG, Parry DA. Secondary structure of component 8c-1 of α -keratin. An analysis of the amino acid sequence. *Biochemical Journal*. 1986 June 15;236(3):705–12.
43. Fraser RD, MacRae TP, Parry DA, Suzuki E. Intermediate filaments in alpha-keratins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986 Mar;83(5):1179–83.
44. Fraser RDB, MacRae TP, Sparrow LG, Parry DAD. Disulphide bonding in α -keratin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1988 Apr 1;10(2):106–12.
45. Gillespie JM. The proteins of hair and other hard α -keratins. In: Goldman RD, Steinert PM, editors. *Cellular and Molecular Biology of Intermediate Filaments*. Boston, MA: Springer US; 1990. p. 95–128.
46. Kashid L, Gharbude D. Electro-analytical characterization and method validation of cysteine by cyclic voltammetry. *Journal of Advanced Scientific Research*. 2025;16(05):26–30.

47. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *Journal of Cell Biology*. 2006 July 10;174(2):169–74.
48. Fraser R, MacRae T, Rogers GE. Keratins: their composition, structure, and biosynthesis. (No Title). 1972;
49. Fraser RDB, Parry DAD. The structural basis of the filament-matrix texture in the avian/reptilian group of hard β -keratins. *Journal of Structural Biology*. 2011 Feb 1;173(2):391–405.
50. Fraser RDB, Parry DAD. Molecular packing in the feather keratin filament. *Journal of Structural Biology*. 2008 Apr 1;162(1):1–13.
51. Fraser RDB, Parry DAD. The molecular structure of reptilian keratin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1996 Oct 1;19(3):207–11.
52. Chen PY, McKittrick J, Meyers MA. Biological materials: functional adaptations and bioinspired designs. *Progress in Materials Science*. 2012 Nov 1;57(8):1492–704.
53. Maskan Bermudez N, Rodríguez-Tamez G, Perez S, Tosti A. Onychomycosis: old and new. *Journal of Fungi*. 2023 May;9(5):559.
54. Leung AKC, Lam JM, Leong KF, Hon KL, Barankin B, Leung AAM, et al. Onychomycosis: An updated review. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2020 May;14(1):32–45.
55. Lipner SR, Scher RK. Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2019;80(4):835–51.
56. Fillipello M. Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinic substrates. *Biology of Dermatophytes and Other Fungi*. 2000;77–85.
57. Grumbt M, Monod M, Yamada T, Hertweck C, Kunert J, Staib P. Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013 June;133(6):1550–5.
58. Monod M. Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia*. 2008 Nov;166(5–6):285–94.
59. Gupta AK, MacLeod MA, Tosti A. Onychomycosis: clinical aspects. In: Scher and Daniel's Nails: Diagnosis, Surgery, Therapy. Springer; 2018. p. 153–9.
60. Gupta A, Baran R, Summerbell R. Onychomycosis: strategies to improve efficacy and reduce recurrence. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2002;16(6):579–86.
61. Yue X, Li Q, Wang H, Sun Y, Wang A, Zhang Q, et al. An ultrastructural study of *Trichophyton rubrum* induced onychomycosis. *BMC infectious diseases*. 2015;15(1):1–8.

62. Cathcart S, Cantrell W, Elewski B. Onychomycosis and diabetes. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2009 Oct;23(10):1119–22.
63. Jayatilake J, Tilakaratne W, Panagoda G. Candidal onychomycosis: a mini-review. *Mycopathologia*. 2009;168:165–73.
64. Nwofor C, Onyenwe N, Osuoha C. Pathogenecity and enzyme screening of some selected non-dermatophytic molds. *Access Microbiology*. 2024;
65. Coleman R, Hay R. Chronic mucocutaneous candidosis associated with hypothyroidism: a distinct syndrome? *British Journal of Dermatology*. 1997;136(1):24–9.
66. Piraccini BM, Alessandrini A. Onychomycosis: a review. *Journal of Fungi*. 2015 June;1(1):30–43.
67. Iorizzo M, Piraccini BM, Alessandrini A, Bruni F, Vollono L, Pampaloni F, et al. Clinical And Onychoscopy Patterns In Fingernail Onychomycosis—A Study By The International Dermoscopy Society “Trichoscopy And Onychoscopy” Task Force. *Dermatology Practical & Conceptual*. 2025;15(1):4887.
68. Cervantes J, Lamas AP, Lencastre A, de Sá DC, Tosti A. Nail disorders in diabetics. In: Cohen Sabban EN, Puchulu FM, Cusi K, editors. *Dermatology and Diabetes*. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 281–95.
69. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006 Apr 15;212(2):167–78.
70. Kishabongo AS, Katchunga P, Van Aken EH, Speeckaert R, Lagniau S, Coopman R, et al. Glycation of nail proteins: from basic biochemical findings to a representative marker for diabetic glycation-associated target organ damage. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120112.
71. Van Nguyen C. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2006;50(12):1140–9.
72. Marin C, Papantonakis G, Sels K, van Lenthe GH, Falgayrac G, Vangoitsenhoven R, et al. Unraveling the compromised biomechanical performance of type 2 diabetes- and Roux-en-Y gastric bypass bone by linking mechanical-structural and physico-chemical properties. *Sci Rep*. 2018 Apr 12;8(1):5881.
73. Rubin MR, Paschalis EP, Poundarik A, Sroga GE, McMahon DJ, Gamsjaeger S, et al. Advanced glycation endproducts and bone material properties in type 1 diabetic mice. *PLOS ONE*. 2016 May 3;11(5):e0154700.
74. Sihota P, Yadav RN, Dhiman V, Bhadada SK, Mehandia V, Kumar N. Investigation of diabetic patient’s fingernail quality to monitor type 2 diabetes induced tissue damage. *Sci Rep*. 2019 Dec;9(1):3193.

75. Gkogkolou P, Böhm M. Advanced glycation end products: key players in skin aging? *Dermato-Endocrinology*. 2012 July 1;4(3):259–70.
76. Cervantes J, Lamas AP, Lencastre A, de Sá DC, Tosti A. Nail disorders in diabetics. *Dermatology and diabetes*. 2018;281–95.
77. David P, Singh S, Ankar R. A comprehensive overview of skin complications in diabetes and their prevention. *Cureus*. 2023;15(5).
78. World Health Organization. Classification of diabetes mellitus [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2019 [cited 2025 May 18]. 36 p. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/325182>
79. Prairie Lakes Healthcare System. Diabetes [Internet]. [cited 2025 May 18]. Available from: <https://www.prairielakes.com/health-wellness-blog/diabetes-what-is-it-and-do-you-have-it-11693.html>
80. Keresztury G, Chalmers J, Griffith P. Raman spectroscopy: theory. *Handbook of vibrational spectroscopy*. 2002;1:71–87.
81. Smith E, Dent G. *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. John Wiley & Sons; 2019.
82. Larkin P. *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Elsevier; 2017.
83. Pavlou E. Bone quality assessment in normal and diseased tissues using vibrational spectroscopy, neutron diffraction and multivariate analysis [Ph.D. Thesis]. University of Ioannina, Ioannina, Greece; 2025.
84. Kostamovaara J, Tenhunen J, Kögler M, Nissinen I, Nissinen J, Keränen P. Fluorescence suppression in Raman spectroscopy using a time-gated CMOS SPAD. *Optics express*. 2013;21(25):31632–45.
85. Szabo AG. The fluorescence properties of aromatic amino acids: Their role in the understanding of enzyme structure and dynamics. In: *The Enzyme Catalysis Process: Energetics, Mechanism and Dynamics*. Springer; 1989. p. 123–39.
86. Stockert JC, Blázquez-Castro A. *Fluorescence microscopy in life sciences*. Bentham Science Publishers; 2017.
87. McCreery RL. *Raman spectroscopy for chemical analysis*. John Wiley & Sons; 2005. 452 p.
88. Cadusch P, Hlaing M, Wade S, McArthur S, Stoddart P. Improved methods for fluorescence background subtraction from Raman spectra. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2013;44(11):1587–95.

89. Leger MN, Ryder AG. Comparison of derivative preprocessing and automated polynomial baseline correction method for classification and quantification of narcotics in solid mixtures. *Applied spectroscopy*. 2006;60(2):182–93.
90. Long D. The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules. In 2002. p. 49–84.
91. Woodward LA. Introduction to the theory of molecular vibrations and vibrational spectroscopy. Clarendon Press; 1972. 396 p.
92. Wilson EB, Decius JC, Cross PC. Molecular vibrations: the theory of infrared and Raman vibrational spectra. Courier Corporation; 1980.
93. Browne WR. Resonance Raman spectroscopy and its application in bioinorganic chemistry. In: *Practical Approaches to Biological Inorganic Chemistry*. Elsevier; 2020. p. 275–324.
94. Chemistry LibreTexts [Internet]. 2014 [cited 2025 May 21]. Physical Chemistry (LibreTexts). Available from: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Physical_Chemistry_\(LibreTexts\)](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Physical_Chemistry_(LibreTexts))
95. Bazin D. Vibrational spectroscopies to investigate concretions and ectopic calcifications for medical diagnosis. *Comptes Rendus Chimie*. 2016 June 30;19.
96. Elka A, Moulia V, Spyridonos P, Kourkouvelis N. The effect of irradiance and integration time in in vivo normal skin Raman measurements assessed by multivariate statistical analysis. Gerwert K, editor. *BSI*. 2016 Mar 29;5(2):217–23.
97. Kourkouvelis N, Polymeros A, Tzaphlidou M. Background estimation of biomedical Raman spectra using a geometric approach. *Spectroscopy: An International Journal*. 2012;27(5–6):441–7.
98. Kourkouvelis N, Balatsoukas I, Moulia V, Elka A, Gaitanis G, Bassukas I. Advances in the in Vivo Raman Spectroscopy of Malignant Skin Tumors Using Portable Instrumentation. *IJMS*. 2015 June 26;16(12):14554–70.
99. Jones RR, Hooper DC, Zhang L, Wolverson D, Valev VK. Raman techniques: fundamentals and frontiers. *Nanoscale research letters*. 2019;14:1–34.
100. Butler HJ, Ashton L, Bird B, Cinque G, Curtis K, Dorney J, et al. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature protocols*. 2016;11(4):664–87.
101. Carriere JT, Havermeyer F. Ultra-low frequency Stokes and anti-Stokes Raman spectroscopy at 785nm with volume holographic grating filters. In *SPIE*; 2012. p. 22–30.

102. Pitt G, Batchelder D, Bennett R, Bormett R, Hayward I, Smith B, et al. Engineering aspects and applications of the new Raman instrumentation. *IEE Proceedings-Science, Measurement and Technology*. 2005;152(6):241–318.
103. Kourkoumelis N, Gaitanis G, Velegraki A, Bassukas ID. Nail Raman spectroscopy: a promising method for the diagnosis of onychomycosis. An ex vivo pilot study. *Medical Mycology*. 2018 July 1;56(5):551–8.
104. Veras JMDMF, Coelho LDS, Neto LPM, Almeida RMD, Silva GCD, Santana FBD, et al. Identification of biomarkers in diabetic nails by Raman spectroscopy. *Clinica Chimica Acta*. 2023 Apr;544:117363.
105. Lazo ND, Meine JG, Downing DT. Lipids are covalently attached to rigid corneocyte protein envelopes existing predominantly as β -Sheets: a solid-state nuclear magnetic resonance study. *Journal of Investigative Dermatology*. 1995 Aug;105(2):296–300.
106. Wen W, Meng Y, Xiao J, Zhang P, Zhang H. Comparative study on keratin structural changes in onychomycosis and normal human finger nail specimens by Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*. 2013 Apr;1038:35–9.
107. Shin MK, Kim TI, Kim WS, Park HK, Kim KS. Changes in nail keratin observed by Raman spectroscopy after Nd:YAG laser treatment. *Microsc Res Tech*. 2017 Apr;80(4):338–43.
108. Cutrín Gómez E, Anguiano Igea S, Delgado-Charro MB, Gómez Amoza JL, Otero Espinar FJ. Microstructural alterations in the onychomycotic and psoriatic nail: Relevance in drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018 July;128:48–56.
109. Boulnois JL. Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. *Lasers in medical science*. 1986;1:47–66.
110. Drexler W, Fujimoto JG. Optical coherence tomography: technology and applications. Springer Science & Business Media; 2008. 885–883 p.
111. Brezinski ME. Optical coherence tomography: principles and applications. Elsevier; 2006.
112. Goodman JW. Statistical optics. John Wiley & Sons; 2015.
113. Fercher AF, Drexler W, Hitzenberger CK, Lasser T. Optical coherence tomography-principles and applications. *Reports on progress in physics*. 2003;66(2):239.
114. Guevara E. Functional connectivity of the rodent brain using optical imaging [Ph.D. Thesis]. École Polytechnique de Montréal, Montréal, QC, Canada; 2013.
115. Petrokilidou C, Gaitanis G, Bassukas ID, Velegraki A, Guevara E, Vardaki MZ, et al. Emerging optical techniques for the diagnosis of onychomycosis. *Applied Sciences*. 2020 Mar 29;10(7):2340.

116. Saleah SA, Gu Y, Wijesinghe RE, Seong D, Cho H, Jeon M, et al. Comparative quantifications and morphological monitoring of the topical treatment approach for onychomycosis-affected in vivo toenail using optical coherence tomography: A case study. *Biomedical Signal Processing and Control*. 2024 Feb;88:105648.
117. Piao D, Abreski D, Zhu Q. Preliminary results of imaging and diagnosis of nail fungal infection with optical coherence tomography. :4.
118. Sattler E, Kaestle R, Rothmund G, Welzel J. Confocal laser scanning microscopy, optical coherence tomography and transonychia water loss for in vivo investigation of nails. 2011;7.
119. Mogensen M, Thomsen JB, Skovgaard LT, Jemec GBE. Nail thickness measurements using optical coherence tomography and 20-MHz ultrasonography. *British Journal of Dermatology*. 2007;7.
120. Welzel J, Lankenau E, Birngruber R, Engelhardt R. Optical coherence tomography of the human skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1997 Dec 1;37(6):958–63.
121. Abuzahra F, Spöler F, Först M, Brans R, Erdmann S, Merk HF, et al. Pilot study: optical coherence tomography as a non-invasive diagnostic perspective for real time visualisation of onychomycosis. *Mycoses*. 2010;53(4):334–9.
122. Olsen J, Lindsø Andersen P, Themstrup L, Jemec GBE, Saunte DML. Optical coherence tomography of onychomycosis: proposed terminology and a suggestion of practical usage. *Arch Dermatol Res*. 2020 Jan 1;312(1):51–8.
123. Verne SH, Chen L, Shah V, Nouri K, Tosti A. Optical coherence tomography features of dermatophytoma. *JAMA Dermatol*. 2018 Feb 1;154(2):225.
124. Monteyne T, Coopman R, Kishabongo AS, Himpe J, Lapauw B, Shadid S, et al. Analysis of protein glycation in human fingernail clippings with near-infrared (NIR) spectroscopy as an alternative technique for the diagnosis of diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2018 Aug 28;56(9):1551–8.
125. Pavlou E, Kourkouvelis N. PyFasma: An open-source, modular Python package for preprocessing and multivariate analysis of Raman spectroscopy data. *Analyst*. 2025 June 9;
126. Pavlou E, Kourkouvelis N. Preprocessing and analyzing Raman spectra using Python. *Engineering Proceedings*. 2023;56(1):28.
127. Walt S van der, Schönberger JL, Nunez-Iglesias J, Boulogne F, Warner JD, Yager N, et al. scikit-image: image processing in Python. *PeerJ*. 2014 June 19;2:e453.
128. Adegun OK, Tomlins PH, Hagi-Pavli E, McKenzie G, Piper K, Bader DL, et al. Quantitative analysis of optical coherence tomography and histopathology images of normal and dysplastic oral mucosal tissues. *Lasers Med Sci*. 2012 July;27(4):795–804.

129. Welzel J, Bruhns M, Wolff HH. Optical coherence tomography in contact dermatitis and psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2003 June 1;295(2):50–5.
130. Niu H jun, Wang Q, Wang Y xiang, Li D yu, Fan Y bo, Chen W fan. Ultrasonic reflection coefficient and surface roughness index of OA articular cartilage: relation to pathological assessment. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012 Mar 10;13(1):34.
131. Gadelmawla E, Koura M, Maksoud T, Elewa I, Soliman H. Roughness parameters. *Journal of Materials Processing Technology*. 2002 Apr 1;123:133–45.
132. Gong P, Almasian M, van Soest G, de Bruin D, van Leeuwen T, Sampson D, et al. Parametric imaging of attenuation by optical coherence tomography: review of models, methods, and clinical translation. *J Biomed Opt*. 2020 Apr;25(4):1–34.
133. Pavlou E, Gaitanis G, Bassukas ID, Kourkouvelis N. BCC and Immunocryosurgery scar differentiation through computational resolution-enhanced OCT images and skin optical attenuation: A proof-of-concept study. *Experimental Dermatology*. 2024;33(1):e15019.
134. McAuley W, Jones S, Traynor M, Guesné S, Murdan S, Brown M. An investigation of how fungal infection influences drug penetration through onychomycosis patient's nail plates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;102:178–84.
135. Hui X, Baker SJ, Wester RC, Barbadillo S, Cashmore AK, Sanders V, et al. In Vitro Penetration of a Novel Oxaborole Antifungal (AN2690) Into the Human Nail Plate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007 Oct;96(10):2622–31.
136. Vejnovic I, Simmler L, Betz G. Investigation of different formulations for drug delivery through the nail plate. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010 Feb 15;386(1–2):185–94.
137. Cutrín-Gómez E, Anguiano-Igea S, Delgado-Charro M, Gómez-Amoza J, Otero-Espinar F. Effect on Nail Structure and Transungual Permeability of the Ethanol and Poloxamer Ratio from Cyclodextrin-Soluble Polypseudorotaxanes Based Nail Lacquer. *Pharmaceutics*. 2018 Sept 11;10(3):156.
138. Emin A, Hushur A, Mamtimin T. Raman study of mixed solutions of methanol and ethanol. *AIP Advances*. 2020 June 1;10(6):065330.
139. Goodpaster AM, Kennedy MA. Quantification and statistical significance analysis of group separation in NMR-based metabolomics studies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2011 Dec;109(2):162–70.
140. Ciesielska A, Kawa A, Kanarek K, Soboń A, Szewczyk R. Metabolomic analysis of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* during keratin degradation. *Sci Rep*. 2021 Feb 17;11(1):3959.

141. Guevara E, Torres-Galván JC, Ramírez-Elías MG, Luevano-Contreras C, González FJ. Use of Raman spectroscopy to screen diabetes mellitus with machine learning tools. *Biomed Opt Express*. 2018 Oct 1;9(10):4998.
142. Rajpal A, Ismail-Beigi F. Intermittent fasting and 'metabolic switch': Effects on metabolic syndrome, prediabetes and type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2020;22(9):1496–510.
143. Hamasaki-Matos AJ, Cóndor-Marín KM, Aquino-Ortega R, Carrillo-Ng H, Ugarte-Gil C, Silva-Caso W, et al. Characterization of the gut microbiota in diabetes mellitus II patients with adequate and inadequate metabolic control. *BMC Res Notes*. 2021 Dec;14(1):238.
144. Bakris GL, Fonseca V, Katholi RE, McGill JB, Messerli FH, Phillips RA, et al. Metabolic effects of Carvedilol vs Metoprolol in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004 Nov 10;292(18):2227.
145. Gniadecka M, Nielsen OF, Christensen DH, Wulf HC. Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998 Apr;110(4):393–8.
146. Felig P, Marliss E, Cahill GF. Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity. *N Engl J Med*. 1969 Oct 9;281(15):811–6.
147. Chen T, Ni Y, Ma X, Bao Y, Liu J, Huang F, et al. Branched-chain and aromatic amino acid profiles and diabetes risk in Chinese populations. *Scientific reports*. 2016;6(1):20594.
148. Long JL, Miao ZH, Kong LW, Cui HJ, Zhang NN, Yan D. Circulating metabolites difference in type 2 diabetes patients from regions: a cross-sectional study. *Med Data Min*. 2024;7(4):21.
149. Starling S. Metformin acts through appetite-suppressing metabolite: Lac-Phe. *Nat Rev Endocrinol*. 2024 June;20(6):319–319.
150. Costanzo M, Aleidi SM, Abdel Rahman A. Editorial: Omics in endocrinology: from biomarker discovery to targeting therapeutic strategies. *Front Mol Biosci*. 2025 Feb 13;12:1567250.
151. Shen Y, Zheng X, Hu Y, Deng Y, Xiong Q. Editorial: Bile acids in obesity-related diseases. *Front Endocrinol*. 2024 Dec 23;15:1518604.
152. Tanaka K ichiro, Yamaguchi T, Kaji H, Kanazawa I, Sugimoto T. Advanced glycation end products suppress osteoblastic differentiation of stromal cells by activating endoplasmic reticulum stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Aug 30;438(3):463–7.
153. Adamopoulos C, Mihailidou C, Grivaki C, Papavassiliou KA, Kiaris H, Piperi C, et al. Systemic effects of AGEs in ER stress induction in vivo. *Glycoconj J*. 2016 Aug;33(4):537–44.

154. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev.* 2008 Feb;29(1):42–61.
155. Moreno G, Arenas R. Other fungi causing onychomycosis. *Clinics in Dermatology.* 2010 Mar 1;28(2):160–3.
156. Sigurgeirsson B, Steingrímsson Ö. Risk factors associated with onychomycosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2004;18(1):48–51.
157. Cosio T, Valsecchi I, Gaziano R, Campione E, Botterel F. Glycation of nail proteins as a risk factor for onychomycosis. Comment on Gupta et al. Diabetic foot and fungal infections: Etiology and management from a dermatologic perspective. *J. Fungi* 2024, 10, 577. *Journal of Fungi.* 2025 Jan;11(1):46.
158. Gupta A k., Stec N, Summerbell R c., Shear N h., Piguet V, Tosti A, et al. Onychomycosis: a review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2020;34(9):1972–90.
159. Sattler E, Kaestle R, Rothmund G, Welzel J. Confocal laser scanning microscopy, optical coherence tomography and transonychia water loss for in vivo investigation of nails: CLSM, OCT and TOWL for in vivo investigation of nails. *British Journal of Dermatology.* 2012 Apr;166(4):740–6.
160. Prajapati SK, Jain A, Bajpai M. Lipid-based nanoformulations in onychomycosis therapy: addressing challenges of current therapies and advancing treatment. *RSC Advances.* 2025;15(10):7799–825.
161. Guarneri F, Custurone P, Papaiani V, Gangemi S. Involvement of RAGE and oxidative stress in inflammatory and infectious skin diseases. *Antioxidants.* 2021;10(1):82.
162. Sangiorgi S, Manelli A, Reguzzoni M, Ronga M, Protasoni M, Dell’Orbo C. The Cutaneous Microvascular Architecture of Human Diabetic Toe Studied by Corrosion Casting and Scanning Electron Microscopy Analysis. *The Anatomical Record.* 2010;293(10):1639–45.
163. ISO [Internet]. [cited 2025 Mar 27]. ISO 21920-2:2021. Available from: <https://www.iso.org/standard/72226.html>
164. Laubé F, Poupon A, Zinck P, Müller-Goymann C, Reichl S, Nardello-Rataj V. Physicochemical investigations of native nails and synthetic models for a better understanding of surface adhesion of nail lacquers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2019 Apr;131:208–17.
165. Schmitt JM. Optical coherence tomography (OCT): a review. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics.* 1999 July;5(4):1205–15.
166. Monteyne T, Coopman R, Kishabongo AS, Himpe J, Lapauw B, Shadid S, et al. Analysis of protein glycation in human fingernail clippings with near-infrared (NIR) spectroscopy as an alternative technique for the diagnosis of diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).* 2018 Sept 1;56(9):1551–8.

8 Παράρτημα

8.1 Κώδικας προσδιορισμού επιφανειακής τραχύτητας

#Βιβλιοθήκες

```
import os
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.signal import savgol_filter
from scipy.interpolate import UnivariateSpline
from pywt import wavedec
```

Εισαγωγή βιβλιοθήκης της ομάδας μας για επεξεργασία εικόνων OCT

```
sys.path.append(r'C:\Users\...\') # Ο φάκελος που περιέχει το octpy
import octpy as oct
```

Φόρτωση και επεξεργασία εικόνας OCT

```
image_path = r'C:\path\to\image.png' # Γενική διαδρομή εικόνας
image = oct.Image(image_path, canny_thresh=(0.15, 0.5))
```

Ανίχνευση ακμών με τον αλγόριθμο Canny

```
image.draw_canny()
edge_points = image.get_canny_edge()
```

Αντιστροφή άξονα y ώστε οι τιμές να αυξάνονται προς τα πάνω

```
max_y = edge_points[:, 1].max()
edge_points[:, 1] = max_y - edge_points[:, 1]
```

Επιλογή περιοχής ενδιαφέροντος (ROI)

```
x1, x2 = ... # π.χ. αρχή και τέλος στον άξονα x
```

```

y1, y2 = ... # π.χ. αρχή και τέλος στον άξονα y
filtered_points = edge_points[
    (edge_points[:, 0] >= x1) & (edge_points[:, 0] <= x2) &
    (edge_points[:, 1] >= y1) & (edge_points[:, 1] <= y2)
]

```

Σχεδίαση φιλτραρισμένου περιγράμματος

```

fig, ax = plt.subplots(figsize=(14, 4))
ax.plot(filtered_points[:, 0], filtered_points[:, 1], color='red', linewidth=2)
ax.set_xlabel('x (pixels)')
ax.set_ylabel('z (pixels)')
plt.show()

```

Εξαγωγή x και y τιμών του profile

```

x_values = filtered_points[:, 0]
y_values = filtered_points[:, 1]

```

Συνάρτηση υπολογισμού τραχύτητας επιφάνειας

```

def calculate_surface_roughness(profile):
    profile = np.array(profile)
    Ra = np.mean(np.abs(profile))
    Rq = np.sqrt(np.mean(profile**2))
    Rz = np.max(profile) - np.min(profile)
    return {"Ra": Ra, "Rq": Rq, "Rz": Rz}

```

Συνάρτηση αφαίρεσης τάσης (detrending) από το profile

```

def adaptive_detrend(profile, method="spline", smoothing_factor=0):
    x = np.linspace(0, len(profile) - 1, len(profile))
    if method == "spline":
        spline = UnivariateSpline(x, profile, s=smoothing_factor)
        trend = spline(x)
    elif method == "savgol":
        trend = savgol_filter(profile, window_length=11, polyorder=3)
    else:
        raise ValueError("Unsupported detrending method.")
    detrended_profile = profile - trend
    return {"Trend": trend, "Detrended Profile": detrended_profile}

```

Συνάρτηση πολυκλιμακωτής ανάλυσης μέσω wavelet

```
def multi_scale_analysis(profile, wavelet="db1", levels=5):
    coeffs = wavedec(profile, wavelet, level=levels)
    return {"Level {i+1}": coeff for i, coeff in enumerate(coeffs[1:])}
```

Συνάρτηση για έλεγχο έγκυρου μήκους παραθύρου εξομάλυνσης

```
def ensure_valid_window_length(y_values, proposed_length):
    if proposed_length % 2 == 0:
        proposed_length += 1
    return min(proposed_length, len(y_values)- 1) if len(y_values) > 1 else 1
```

Εφαρμογή εξομάλυνσης και αφαίρεσης τάσης στο profile

```
window_length = ensure_valid_window_length(y_values, 19)
y_smoothed = savgol_filter(y_values, window_length=window_length, polyorder=2)
detrended = adaptive_detrend(y_smoothed, method="spline", smoothing_factor=1)
```

Υπολογισμός παραμέτρων τραχύτητας επιφάνειας

```
roughness = calculate_surface_roughness(detrended["Detrended Profile"])
```

Πολυκλιμακωτή ανάλυση με wavelet

```
multi_scale_results = multi_scale_analysis(y_values)
```

Προαιρετικά: Εκτύπωση αποτελεσμάτων

```
print("Surface roughness metrics (Ra, Rq, Rz):", roughness)
```

8.2 Κατάλογος διεθνών συντομογραφιών

Συντομογραφία	Πλήρης Όρος (Αγγλικά)	Πλήρης Όρος (Ελληνικά)
AGEs	Advanced Glycation End-products	Τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης
CML	Carboxymethyllysine	Καρβοξυμεθυλλυσίνη
HbA1c	Hemoglobin A1c	Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη
OCT	Optical Coherence Tomography	Τομογραφία οπτικής συνοχής
PCA	Principal Component Analysis	Ανάλυση κύριων συνιστωσών
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis	Ανάλυση διακριτών κλάσεων με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων
<i>T.rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	-
TP	Time Point	Χρονική στιγμή

8.3 Κατάλογος ελληνικών συντομογραφιών

Συντομογραφία	Πλήρης Όρος
ΑΣΔ	Αρρύθμιστος σακχαρώδης διαβήτης
ΡΣΔ	Ρυθμισμένος σακχαρώδης διαβήτης
ΣΔ	Σακχαρώδης διαβήτης

8.4 Κατάλογος επιστημονικών δημοσιεύσεων που προέκυψαν στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής

1. Petrokilidou, C., Pavlou, E., Gaitanis, G., Bassukas, I. D., Saridomichelakis, M. N., Velegaki, A., & Kourkouvelis, N. (2019). The lipid profile of three *Malassezia* species assessed by Raman spectroscopy and discriminant analysis. *Molecular and cellular probes*, 46, 101416.
2. Petrokilidou, C., Gaitanis, G., Bassukas, I. D., Velegaki, A., Guevara, E., Vardaki, M. Z., & Kourkouvelis, N. (2020). Emerging optical techniques for the diagnosis of onychomycosis. *Applied Sciences*, 10(7), 2340.
3. Petrokilidou, C., Gaitanis, G., Velegaki, A., Bassukas, I. D., & Kourkouvelis, N. (2023). Treatment of nail clippings with ethyl alcohol improves the efficacy of Raman spectroscopy in the diagnosis of *Trichophyton rubrum* onychomycosis. *Journal of Biophotonics*, 16(7), e202300040.
4. Petrokilidou, C., Pavlou, E., Velegaki, A., Simou, A., Marsellou, I., Filis, G., & Kourkouvelis, N. (2024). Characterization and differentiation of *Candida auris* on Dixon's agar using Raman spectroscopy. *Pathogens*, 13(11), 978.

8.5 Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Ανατομική απεικόνιση εγκάρσιας τομής όνυχα.(10).....	15
Εικόνα 2: Απεικόνιση της αρτηριακής αιμάτωσης του άκρου ενός δακτύλου.(9).....	16
Εικόνα 3: (α) Σχηματική απεικόνιση μίας ονυχαίας πλάκας ενός υγιούς όνυχα ανθρώπου και της τριστηρωματικής της δομής. (β), (γ) Εικόνες SEM εγκάρσιας διατομής της ονυχαίας πλάκας: Στην πρώτη εικόνα απεικονίζονται και επισημαίνονται τα τρία στρώματα της (dorsal: ραχιαίο, intermediate: ενδιάμεσο, ventral: κοιλιακό), ενώ στην δεύτερη φωτογραφία φαίνονται καθαρά οι διαμήκεις προσανατολισμένες ίνες κερατίνης.(31) .	18
Εικόνα 4: Απεικόνιση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, της α -έλικας (α) και του σχηματισμού ενός ενδιάμεσου ινιδίου (β). Η πολυπεπτιδική αλυσίδα (αριστερά) παρουσιάζεται στην μορφή σφαιρών και ράβδων. Στην α -έλικα σημειώνεται το βήμα της που είναι 0.51nm και θέση των δεσμών υδρογόνου (κόκκινη έλλειψη). Οι αλυσίδες της α -έλικας οργανώνονται ώστε να σχηματιστούν τα διμερή, τα οποία στην συνέχεια σχηματίζουν το πρωτοϊνίδιο (protofilament). Τέσσερα πρωτοϊνίδια οργανώνονται και σχηματίζουν ένα ενδιάμεσο ινίδιο.(31).....	21
Εικόνα 5: Τα αμινοξέα που βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην δομή της α -κερατίνης: (α) κυστεΐνη, (β) γλυκίνη, (γ) τυροσίνη και (δ) φαινυλαλανίνη.....	23
Εικόνα 6: (α) Απεικόνιση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (σε μορφή σφαιρών και ράβδων) και της β -πτυχωτής επιφάνειας. (β) Απεικόνιση του σχηματισμού του ινιδίου της β -κερατίνης: μία πολυπεπτιδική αλυσίδα διπλώνεται ώστε να σχηματίσει τέσσερις β -κλώνους (β -strands), οι οποίοι περιστρέφονται, ώστε να σχηματίσουν την β -πτυχωτή επιφάνεια (distorted β -sheet). Δύο τέτοιες επιφάνειες οργανώνονται για να σχηματίσουν ένα ινίδιο β -κερατίνης (β -keratin filament).(31)	24
Εικόνα 7: Αποικίες <i>T. rubrum</i> που παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (SEM). Διάσπαρτα μικροσκοπικά σωματίδια είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια των υφών, μικροκονίδια (βέλη) και διακλαδώσεις υφών. (61).....	26
Εικόνα 8: Περιστατικό άπω και πλάγιας υπονύχιας ονυχομυκητίασης.(66)	28
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της αντίδρασης Maillard: αρχικά σχηματίζεται βάση Schiff από την αντίδραση αμίνης με αλδεϋδη, η οποία αναδιατάσσεται σε προϊόν Amadori. Σε επόμενο στάδιο, η οξειδωση και περαιτέρω τροποποίηση οδηγούν στον σχηματισμό μη αναστρέψιμων τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs), τα οποία σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες, αλλοιώνοντας τη δομή και λειτουργία τους.	33

Εικόνα 10: Κύριοι τύποι σακχαρώδη διαβήτη και πώς επηρεάζουν τη χρήση της γλυκόζης στο σώμα. Αριστερά: Σε υγιή άτομα, η ινσουλίνη επιτρέπει στους μύες να χρησιμοποιούν την γλυκόζη. Μέση: Στον διαβήτη τύπου 1, δεν παράγεται καθόλου ινσουλίνη, και η γλυκόζη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Δεξιά: Στον διαβήτη τύπου 2, υπάρχει ινσουλίνη, αλλά οι ιστοί εμφανίζουν αντίσταση σε αυτήν, με αποτέλεσμα και πάλι η γλυκόζη να μην χρησιμοποιείται επαρκώς. (Εμπνευσμένο από: (79))35

Εικόνα 11: Βασικοί τύποι των τρόπων δόνησης πολυατομικών μορίων. Οι δονήσεις τάσης (stretching): συμμετρικές και ασύμμετρες, και οι δονήσεις κάμψης (bending): ψαλιδοειδής (scissoring) και λικνιζόμενη (rocking), πραγματοποιούνται στο ίδιο επίπεδο. Οι δονήσεις κάμψης: παλλόμενη (waging) και συστρεφόμενη (twisting) πραγματοποιούνται εκτός του επιπέδου του μορίου. Τα σύμβολα (+), (-) αποτυπώνουν την φάση της ταλάντωσης των ατόμων που κινούνται πάνω και κάτω από το επίπεδο του μορίου: (+) τα άτομα κινούνται προς την ίδια πλευρά του επιπέδου και (-) κινούνται προς την αντίθετη πλευρά του επιπέδου. (Βασισμένο σε (95))48

Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης της φασματοσκοπίας Raman.50

Εικόνα 13: Μοριακό αποτύπωμα του φάσματος Raman ενός υγιούς όνυχας, όπου οι κύριες κορυφές αντιστοιχίστηκαν σε δονήσεις.51

Εικόνα 14: Διαμορφώσεις των δισουλφιδικών δεσμών.52

Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση της θέσης των δισουλφιδικών και αμιδικών δεσμών στην κερατίνη των ονύχων.55

Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση μίας τυπικής διάταξης συστήματος τομογραφίας οπτικής συνοχής (TD-OCT ή SD-OCT) με χρήση συμβολόμετρου Michelson. Το φως της πηγής διαχωρίζεται από beam splitter και κατευθύνεται προς το κάτοπτρο αναφοράς και το δείγμα. Οι ανακλώμενες ακτίνες επανασυνδυάζονται και σήμα συμβολής ανιχνεύεται για την εξαγωγή της απεικόνισης του δείγματος.58

Εικόνα 17: Απεικόνιση του νόμου Beer-Lambert: Η ένταση του φωτός μειώνεται εκθετικά καθώς διαπερνά ένα απορροφητικό μέσο με συντελεστή απορρόφησης μ_a και πάχος z .63

Εικόνα 18: Διάγραμμα απεικόνισης του σχηματισμού τομογραφικής εικόνας OCT σε υγιές όνυχα και άκρο δακτύλου. (α) Αξονική σάρωση (A-scan), (β) δισδιάστατη σάρωση (B-scan) και (γ) τρισδιάστατη/ογκομετρική σάρωση. (114,115)66

Εικόνα 19: Εγκάρσιες τομές OCT υγιούς όνυχας (α: Άπω, β: μέσο και γ: εγγύς τμήμα). Οι εικόνες παρουσιάζουν ένα λεπτό επιφανειακό σήμα εισόδου και ομοιογενή ονυχαία πλάκα, με μερικώς ορατή την κοίτη. Το άπω άκρο (α) εμφανίζει υπερανακλαστική γραμμή και αυξημένη σκέδαση στο υπονύχιο, ενώ ο μηνίσκος (γ) απεικονίζεται ως μια ελαφρώς υπερανακλαστική ταινία.68

Εικόνα 20: Εικόνες και απεικονίσεις OCT ονύχων προσβεβλημένων από <i>T. rubrum</i> (η ταυτοποίηση επιβεβαιώθηκε με καλλιέργεια και άμεση μικροσκόπηση KOH). Η λευκή γραμμή (μήκους 9 mm) στην κλινική εικόνα (α,β) υποδεικνύει το κάθετο επίπεδο στο οποίο ελήφθη η απεικόνιση OCT (γ, δ). Πολλαπλές υπερανακλαστικές, ασαφώς ορισμένες, νηματοειδείς γραμμές φαίνεται να προέρχονται από το υπονύχιο και να κατευθύνονται προς την ονυχαία πλάκα υπό γωνία σε σχέση με την επιφάνεια του όνυχος. Οι εικόνες λήφθηκαν με τη συσκευή NITID OCT (DermaLumics, Μαδρίτη, Ισπανία).(115).....	69
Εικόνα 21: Απεικόνιση διαδικασίας ταξινόμησης δειγμάτων.	72
Εικόνα 22: Πρωτόκολλο πειραματικών μετρήσεων.	74
Εικόνα 23: Διαδικασία επεξεργασίας των ονύχων με υδατικό διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης.	75
Εικόνα 24: Διαδικασία γλυκοζυλίωσης ονύχων.	77
Εικόνα 25: Φορητό φασματόμετρο B&W Tek i-Raman plus.....	79
Εικόνα 26: Φορητό σύστημα OCT NITID (Dermalumics, Ισπανία).	80
Εικόνα 27: Δείγματα ονύχων στην επιφάνεια πολυπροπυλενίου: Στην εικόνα (α) παρουσιάζεται ένας υγιής όνυχας (control), στην εικόνα (β) ένας όνυχας προσβεβλημένος από <i>T. rubrum</i> , και στην εικόνα (γ) ένας διαβητικός όνυχας.	81
Εικόνα 28: Αρχικό φάσμα (raw) και ομαλοποιημένο φάσμα περιορισμένο στο εύρος 200–2000 cm^{-1} (smoothed & cropped) υγιούς όνυχας. Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στην εκτίμηση της βάσης, η οποία υπολογίστηκε με τον αλγόριθμο SNIP. Στην ένθετη εικόνα παρουσιάζεται η μεγέθυνση του ομαλοποιημένου φάσματος και η εκτίμηση της βάσης στην περιοχή 1400–1800 cm^{-1}	83
Εικόνα 29: Κανονικοποιημένο φάσμα υγιούς όνυχας στο εύρος 400–1800 cm^{-1} . Κανονικοποίηση με L2.	84
Εικόνα 30: Α) Εφαρμογή του αλγόριθμος Canny Edge Detection στην εικόνα του υγιούς όνυχας. Τα σημεία των ανιχνευμένων άκρων σε κόκκινο χρώμα. Β) Τα σημεία που ανιχνεύθηκαν από τον αλγόριθμο αποτυπώθηκαν σε διάγραμμα, δείχνοντας τις ακριβείς θέσεις των άκρων στην εικόνα.	89
Εικόνα 31: Το διάγραμμα παρουσιάζει το (αρχικό) profile (κόκκινο), την τάση (μαύρη διακεκομμένη γραμμή) και το (τελικό) detrended profile (μπλε). Το (αρχικό) profile δείχνει την αρχική κατανομή των σημείων στην επιφάνεια των ονύχων. Το (τελικό) profile προκύπτει μετά την αφαίρεση της τάσης.....	90
Εικόνα 32: Το (τελικό) profile ενός τυχαίου control.....	90
Εικόνα 33: OCT απεικόνιση υγιούς όνυχας. Η επιφάνεια ανιχνεύθηκε με τον αλγόριθμο Canny Edge Detection και επισημάνθηκε με κόκκινο χρώμα, ενώ οι πολλαπλές διαδρομές φωτός ίσου βάθους αποτυπώθηκαν με κίτρινο.....	92

Εικόνα 34: Τα μέσα φάσματα των control (n=10) και προσβεβλημένων ονύχων από *T. rubrum* (n=5) σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (TP, Time Points). (Α) Τα δείγματα ονύχων που εξετάστηκαν με φασματοσκοπία Raman χωρίς να έχουν υποστεί χημική επεξεργασία (TP: 0 ώρες). (Β) Τα δείγματα ονύχων που εξετάστηκαν με φασματοσκοπία Raman αμέσως μετά από την εμφάνιση σε αιθυλική αλκοόλη στο χρονική στιγμή TP20. (Γ) Τα φάσματα Raman που μετρήθηκαν μετά από την ξήρανση των ονύχων ολόκληρη την νύχτα (TP: 38 ώρες). Στην ένθετη εικόνα απεικονίζεται το φάσμα της αιθυλικής αλκοόλης.95

Εικόνα 35: Διαφορά φασμάτων των ονύχων που μετρήθηκαν πριν την χημική επεξεργασία των δειγμάτων (α) και μετά την εμφάνιση αυτών σε αιθυλική αλκοόλη για 20 ώρες (β) και των ονύχων μετά από την ξήρανση τους την νύχτα (TP38). Η οριζόντια γραμμή αντιστοιχεί σε μηδενική ένταση (δηλαδή τέλεια ομοιότητα μεταξύ των δύο φασμάτων).97

Εικόνα 36: Η καμπύλη Gauss κοντά στην θέση 885 cm^{-1} προσαρμοσμένη στο φάσμα Raman (Spectrum).98

Εικόνα 37: Ανάλυση PCA των μέσων φασμάτων Raman των control και των μολυσμένων ονύχων από *T. rubrum*. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα δείγμα στο δυσδιάστατο διάγραμμα της πρώτης έναντι της δεύτερης κύριας συνιστώσας (PC1 vs. PC2). Το διάγραμμα PCA-TP0 απεικονίζει τα αποτελέσματα της PCA πριν από την έκθεση των ονύχων σε αιθυλική αλκοόλη, ενώ το PCA-TP38 απεικονίζει την διάκριση των δειγμάτων μετά την εμφάνιση σε αιθυλική αλκοόλη και την ξήρανση. Οι σκιασμένες περιοχές αντιπροσωπεύουν τις ελλείψεις εμπιστοσύνης 95%.101

Εικόνα 38: (Α) Η κοιλιακή επιφάνεια της ονυχίας πλάκας από υγιή όνυχα (control). Η ονυχία πλάκα ήταν ακέραια χωρίς ορατές φθορές. (SEM, $\times 400$). (Β) Η κοιλιακή επιφάνεια της ονυχίας πλάκας της περίπτωσης 1. Η ονυχία πλάκα παρουσίαζε σημαντικές φθορές, με χαλαρή στρωματοποίηση και ακανόνιστη μορφή. (SEM, $\times 500$). (Γ) Η κοιλιακή επιφάνεια της ονυχίας πλάκας της περίπτωσης 1. Υφές διαπερνούν το λεπτό στρώμα των κερατινοκυττάρων. Το στρώμα των κερατινοκυττάρων είχε διάσπαρτα βακτήρια (βέλος). (SEM, $\times 2000$). (Δ) Η ονυχία πλάκα της περίπτωσης 1 έδειξε σημαντική φθορά, δομική αταξία και πολλές υφές που διαπερνούν το λεπτό στρώμα των κερατινοκυττάρων (βέλος). (SEM, $\times 1000$). (Ε) Τοπική μεγέθυνση της Εικόνα 38 (Δ): ορατές υφές που διαπερνούν την ονυχία πλάκα (βέλη). Ορισμένες υφές ήταν μαλακές, άλλες αφυδατωμένες, με λεία επιφάνεια χωρίς τοπική καταστροφή, χωρίς ορατά σπόρια. (SEM, $\times 3000$). (F) Η εικόνα της περίπτωσης 2 έδειχνε υφές με εκβλάστηση και διακλάδωση που διαπερνούν τα στρωματοποιημένα κερατινοκύτταρα. (SEM, $\times 2000$) (G) Τοπική μεγέθυνση της Εικόνα 38 (F): Είναι ορατές οι υφές με εκβλάστηση και διακλάδωση. (SEM, $\times 5000$) (H) Η εικόνα της περίπτωσης 3. Ήταν ορατοί υπονύχιοι ζυμομύκητες. (SEM, $\times 2000$). (I) Η εικόνα της περίπτωσης 4. Υπήρχαν υπονύχιοι υφές και ψευδοϋφές. (SEM, $\times 4000$) (61)105

Εικόνα 39: Τα μέσα φάσματα των ονύχων από control και διαβητικούς εξετάστηκαν στο φασματικό εύρος $400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (TPs). (Α) Φάσματα Raman των ονύχων χωρίς χημική επεξεργασία (TP: 0 ώρες). (Β) Φάσματα των ονύχων αμέσως μετά από την εμφάνιση σε αιθυλική αλκοόλη στην χρονική στιγμή TP20. (Γ) Φάσματα των ονύχων μετά από ξήρανση για 38 ώρες (TP: 38 ώρες). Στην ένθετη εικόνα απεικονίζεται το φάσμα της αιθυλικής αλκοόλης.108

Εικόνα 40: Περιγραφή της πορωσιμότητας και της κατανομής πυκνότητας σε όνυχες υγιών, ασθενών με ρυθμισμένο διαβήτη (ΡΣΔ) και αρρύθμιστο (ΑΣΔ) (Α, Δ: υγιείς, Β, Ε: ΡΣΔ, Γ, ΣΤ: ΑΣΔ).(74)111

Εικόνα 41: Ανάλυση PCA των φασμάτων Raman από υγιείς και διαβητικούς όνυχες. ...112

Εικόνα 42: Ανάλυση PCA των φασμάτων Raman από υγιείς και διαβητικούς εθελοντές χωρίς χημική επεξεργασία στο εύρος 800–1800 cm^{-1}118

Εικόνα 43: (Α) PLS prediction διάγραμμα και (Β) confusion matrix. (Γ) Η καμπύλη ROC απεικονίζει την απόδοση του προγνωστικού μοντέλου μέσω της σχέσης μεταξύ της ευαισθησίας (True Positive Rate) και της ειδικότητας (False Positive Rate). Η καμπύλη ξεκινά από το σημείο (0,0) και φτάνει στο (1,1), με την περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) να αποτελεί μέτρο της ακρίβειας του μοντέλου. Η τιμή $\text{AUC}=0.98$ υποδεικνύει ικανοποιητική διακριτική ικανότητα. Η διαγώνια γραμμή στο διάγραμμα αντιπροσωπεύει το chance level ($\text{AUC}=0.5$), που υποδεικνύει τυχαία απόδοση. Μια καμπύλη πάνω από αυτή τη γραμμή δείχνει ότι το μοντέλο έχει καλύτερη απόδοση από την τυχαία πρόβλεψη.121

Εικόνα 44: Ανάλυση VIP scores στο προγνωστικό μοντέλο PLS-DA.122

Εικόνα 45: Μέσα φάσματα ονύχων από τις κατηγορίες: control (n=16), προσβεβλημένοι από *Trichophyton* spp. (n=5), πάσχοντες από σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ: n=16) και από σακχαρώδη διαβήτη και ονυχομυκητίαση (ΣΔ & OM: n=5).124

Εικόνα 46: Ανάλυση PCA των μέσων φασμάτων Raman [TP0]. Οι πάσχοντες από σακχ. διαβήτη και ονυχομυκητίαση απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, ενώ τα ίδια δείγματα που έχουν προσβληθεί από *Trichophyton* spp. επισημαίνονται με πορτοκαλί τετράγωνο. ...126

Εικόνα 47: Πιθανές αλληλεπιδράσεις μυκήτων με τα ανθρώπινα κύτταρα ξενιστές ή με τον εξωκυττάριο χώρο (ECM).(157)128

Εικόνα 48: Σχηματική απεικόνιση της εξέτασης υγιούς όνυχα με τομογραφία οπτικής συνοχής (OCT). Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση της δέσμης φωτός κατά τη διάρκεια της εξέτασης. Τα κίτρινα βέλη αντιστοιχούν στην σάρωση από τη ραχιαία επιφάνεια του όνυχα, ενώ τα κόκκινα απεικονίζουν την σάρωση από την κοιλιακή επιφάνεια.130

Εικόνα 49: Φωτογραφίες και OCT απεικονίσεις υγιών ονύχων (n=4).131

Εικόνα 50: Φωτογραφίες και OCT απεικονίσεις ονύχων με μυκητιασική προσβολή από *T. rubrum* (n=4).132

Εικόνα 51: Φωτογραφίες και OCT απεικονίσεις ονύχων διαβητικών ασθενών (n=4). Οι ασθενείς έπασχαν από αρρύθμιστο διαβήτη και συγκεκριμένα έφεραν επίπεδα HbA1c από 8.4% έως 11.0%.133

Εικόνα 52: Απεικονίσεις OCT από υγιείς (1η στήλη), μυκητιασικούς (2η στήλη) και διαβητικούς όνυχες (3η στήλη). Οι κίτρινες γραμμές υποδεικνύουν τις περιοχές υπολογισμού του μOCT140

Εικόνα 53: Τα μέσα φάσματα Raman των *in vitro* γλυκοζυλιωμένων ονύχων σε διαλύματα γλυκόζης με συγκεντρώσεις 0.278 mol/L και 0.833 mol/L.....144

Εικόνα 54: Διαφορά φασμάτων των *in vitro* γλυκοζυλιωμένων ονύχων στα διαλύματα γλυκόζης. Η οριζόντια γραμμή αντιπροσωπεύει την μηδενική ένταση, η οποία αντιστοιχεί σε τέλεια ομοιότητα μεταξύ των δύο φασμάτων που συγκρίνονται.145

8.6 Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Το διάγραμμα Jablonski απεικονίζει τις διεργασίες σκέδασης Rayleigh και Raman για μεταβάσεις μεταξύ δύο δονητικών καταστάσεων ενός μορίου. Τα S_0 και S_1 αντιστοιχούν στην θεμελιώδη και στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση του μορίου, αντίστοιχα.(83).....	38
Διάγραμμα 2: Profile έντασης σήματος σε βάθος.....	93
Διάγραμμα 3: Loadings plot της πρώτης κύριας συνιστώσας (PC1), για το PCA-TP0 και το PCA-TP38. Η σκιασμένη περιοχή αντιστοιχεί στην δόνηση $\nu(\text{CCO})$ της αιθυλικής αλκοόλης.	101
Διάγραμμα 4: Loadings plot του PC2 για το PCA-TP0 και το PCA-TP38. Τα φασματικά χαρακτηριστικά με σημαντική συνεισφορά εντοπίζονται στις δονήσεις $\nu(\text{S-S})$ και $\nu(\text{CCO})$	103
Διάγραμμα 5: Η συνεισφορά του φασματικού εύρους SR2 στην ανάλυση PCA στην χρονική στιγμή TP0. Οι φασματικές περιοχές με υψηλή ένταση αντιπροσωπεύουν τους κυματάριθμους που συνεισφέρουν περισσότερο στην διάκριση μεταξύ control και διαβητικών δειγμάτων.	114
Διάγραμμα 6: Αξιολόγηση της απόδοσης του μοντέλου PLS-DA ως προς τον αριθμό μεταβλητών (LV1–LV10), με βάση τις μετρικές Accuracy, R^2 , Q^2 και MSE. Το Accuracy εκφράζει το ποσοστό σωστών προβλέψεων, το R^2 δείχνει πόσο καλά το μοντέλο ταιριάζει στα δεδομένα εκπαίδευσης, το Q^2 αποτιμά την ικανότητα πρόβλεψης σε άγνωστα δεδομένα (repeated stratified k-fold cross-validation (3 folds)), ενώ το MSE μετρά το μέσο τετράγωνο σφάλματος πρόβλεψης. Ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών εντοπίζεται στις 3, όπου οι μετρικές δείχνουν υψηλή απόδοση και καλή ισορροπία μεταξύ προσαρμογής και γενίκευσης.	119
Διάγραμμα 7: Loading plot του PC1.	127
Διάγραμμα 8: Violin plot των τιμών μ_{OCT} για τις τρεις ομάδες. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (ANOVA, $p \leq 0.001$) μεταξύ της ομάδας control και των παθολογικών ομάδων, βάσει two-way ANOVA και ελέγχου Tukey.....	141

8.7 Κατάλογος γραφημάτων

Γράφημα 1: Χρονική εξέλιξη της χαρακτηριστικής έντασης της κορυφής Raman της αιθυλικής αλκοόλης. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (ANOVA, $p \leq 0.001$) μεταξύ των control και των προσβεβλημένων ονύχων από *T. rubrum* με όριο 0.05, όπως προκύπτει από την ανάλυση two-way ANOVA και επακόλουθο έλεγχο με Tukey. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση (SD).99

Γράφημα 2: Χρονική εξέλιξη της χαρακτηριστικής έντασης της κορυφής Raman της αιθυλικής αλκοόλης. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά (ANOVA, $p \leq 0.001$) μεταξύ των control και των διαβητικών ονύχων βάσει two-way ANOVA και ελέγχου Tukey.110

Γράφημα 3: Boxplot της επιφανειακής τραχύτητας R_a136

Γράφημα 4: Boxplot της παραμέτρου R_q της επιφανειακής τραχύτητας. Ο αστερίσκος υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά (ANOVA, $p \leq 0.05$) μεταξύ των control και των ονύχων από διαβητικά άτομα, βάσει ανάλυσης two-way ANOVA και επακόλουθο έλεγχο με Tukey.....137

Γράφημα 5: Boxplot της παραμέτρου R_z της επιφανειακής τραχύτητας. Ο άξονας y (R_z) έχει διακοπεί (ένδειξη με γκρι διακεκομμένες γραμμές) για να παρουσιαστεί το outlier πιο κοντά στο υπόλοιπο σύνολο δεδομένων.138

8.8 Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Αντιστοίχιση κύριων κορυφών του φάσματος Raman ενός όνυχα.(102)	51
Πίνακας 2: Φασματικές περιοχές στις οποίες εφαρμόστηκαν καμπύλες Gauss και η αντίστοιχη συσχέτιση τους με βιομόρια.	85
Πίνακας 3: Δημογραφικά στοιχεία και τιμές HbA1c των συμμετεχόντων ανά κατηγορία ονύχων (Control, Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ), Ρυθμισμένος (ΡΣΔ) και Αρρύθμιστος (ΑΣΔ) Σακχαρώδης Διαβήτης). Περιλαμβάνονται φύλο, μέση ηλικία και τιμή HbA1c με εύρος τιμών για κάθε ομάδα.	106
Πίνακας 4: Σύνοψη της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) για διαφορετικές φασματικές περιοχές (SR) και χρονικά σημεία (TP). Παρουσιάζεται το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης που αποδίδεται στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες (PC1, PC2), καθώς και οι Ευκλείδειες αποστάσεις μεταξύ των ομάδων (Control, Διαβητικοί (ΣΔ)) και εντός των ομάδων (μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση).....	113
Πίνακας 5: Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις των παραμέτρων των καμπυλών Gauss για τους control και διαβητικούς όνυχες (ΣΔ) στην χρονική στιγμή TP0. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των control και των διαβητικών. Βιβλ. Αναφορές: (103,104,145)	115
Πίνακας 6: Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις των παραμέτρων των καμπυλών Gauss στους control και στους παθολογικούς όνυχες. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων με <i>Trichophyton spp.</i> και ονύχων διαβητικών	129
Πίνακας 7: Μέσες τιμές των παραμέτρων τραχύτητας. Στην γραμμή με γκρι σκίαση, καταγράφονται οι υπολογισμοί της διατριβής, ενώ στις επόμενες τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας.....	139
Πίνακας 8: Μέση τιμή του μ_{OCT} για κάθε ομάδα ονύχων. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν την στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0.001$) σε σύγκριση με την ομάδα control.....	141
Πίνακας 9: Αντιστοίχιση κορυφών σε δονήσεις NIR και RS. Βιβλ. αναφορές: (102,164,165)	143