



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανίχνευση C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και D-διμερών
σε μικροσυστοιχίες με φασματοσκοπία ανάκλασης
λευκού φωτός**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΥΚΟΥΒΙΝΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2015

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανίχνευση C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και D-διμερών σε μικροσυστοιχίες με φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΥΚΟΥΒΙΝΟΣ

A.M.: 001026

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδα , Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδα Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

Σωτήριος Κακαμπάκος, Ερευνητής Α΄ του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε “ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ”

Παναγιώτα Πέτρου , Ερευνήτρια Α΄ του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε “ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ”

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδα	Καθηγήτρια
Σωτήριος Κακαμπάκος	Ερευνητής Α΄
Παναγιώτα Πέτρου	Ερευνήτρια Α΄
Θωμάς Μαυρομούστακος	Καθηγητής
Ντία Γαλανοπούλου	Αναπ. Καθηγήτρια
Αναστάσιος Οικονόμου	Αναπ. Καθηγητής
Μαριάννα Αντωνέλου	Λέκτορας

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 27/02/2015

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλοί αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν.5343/1932, άρθρο 202).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου στον σύγχρονο κόσμο. Για το λόγο αυτό, είναι σημαντικός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης στον ορό του αίματος πρωτεϊνών που ονομάζονται καρδιακοί δείκτες και σχετίζονται με τον καθορισμό της έκτασης της βλάβης μετά από κάποιο ισχαιμικό επεισόδιο ή την πρόγνωση εμφάνισης κάποιας καρδιακής νόσου. Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη μεθόδου ταυτόχρονης ανίχνευσης δύο καρδιακών δεικτών, της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) και των D-διμερών (D-Dimers), με συστοιχία αντισωμάτων και οπτικό ανοσοαισθητήρα που βασίζεται σε φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός και επιτρέπει την ανίχνευση αντιδράσεων σε πραγματικό χρόνο χωρίς τη χρήση ιχνηθετών. Η ανίχνευση βασίζεται στη παρακολούθηση των μεταβολών του φάσματος συμβολής του φωτός που ανακλάται από μια επιφάνεια πυριτίου που φέρει κατάλληλο υμένιο διαφανούς υλικού πάνω στο οποίο ακινητοποιούνται τα αντισώματα. Στα πλαίσια της εργασίας επιλέχθηκαν κατάλληλα αντισώματα για τους δύο δείκτες μέσω ανάπτυξης μη ανταγωνιστικών ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης. Στη συνέχεια, οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί μεταφέρθηκαν στον οπτικό αισθητήρα όπου αρχικά βελτιστοποιήθηκε το πάχος και η σύσταση του διαφανούς υμενίου καθώς και η μέθοδος χημικής τροποποίησης της επιφάνειας και ακινητοποίησης των αντισωμάτων σε αυτήν. Ακολούθως, βελτιστοποιήθηκαν όλες οι παράμετροι των ανοσοχημικών προσδιορισμών (συγκεντρώσεις αντισωμάτων, διάρκεια ανοσοαντίδρασης, ταχύτητα ροής διαλυμάτων, κ.α). Με τις βέλτιστες συνθήκες ελήφθησαν καμπύλες βαθμονόμησης για τους δύο δείκτες και αξιολογήθηκε η επαναληψιμότητα και η αξιοπιστία των μετρήσεων. Τέλος, κατασκευάστηκαν στην ίδια επιφάνεια διακριτές ζώνες ειδικών αντισωμάτων κατά της CRP και των D-Dimers για την ταυτόχρονη ανίχνευση τους σε δείγματα ορού. Οι τιμές που προσδιορίστηκαν για τους δύο αναλύτες σε δείγματα ορού ήταν σε καλή συμφωνία με αυτές που προσδιορίστηκαν στα ίδια δείγματα με μεθόδους αναφοράς, καταδεικνύοντας την αξιοπιστία των μετρήσεων και την δυνατότητα εφαρμογής του αισθητήρα για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των δύο δεικτών.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ανίχνευση βιομορίων με βιοαισθητήρα

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, D-διμερή, μικροσυστοιχίες, βιοαισθητήρες

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are one of the main death causes in the modern world. For this reason, the determination of the concentration in the serum of particular proteins, called cardiac markers, is vital both for determining the extent of the damage after an ischemic incident as well as for predicting a cardiac disease. The aim of this work was to develop a method to simultaneously detect two markers that can help in predicting a heart attack, namely C-reactive protein (CRP) and D-Dimers using antibodies microarrays in combination with an optical immunosensor based on white light reflectance spectroscopy and allows the detection of biomolecular reactions in real time without the use of labels. In particular, detection is based on monitoring changes in interference spectrum created upon reflection of white light on a silicon surface covered with a suitable film of transparent material on which the analyte-specific antibodies are immobilized. At first, suitable antibodies were selected through the development of non-competitive enzyme immunoassays for the two analytes in microtitration wells. After that, the immunochemical assays were transferred to the optical sensor, wherein the thickness and composition of the transparent film deposited on the silicon surface as well as the method for the chemical modification of the surface and immobilization of antibodies were optimized. Subsequently, all the parameters of immunochemical determinations with the sensor were optimized including antibody concentrations, immunoreaction time, flow rate, etc. By applying the optimal conditions, calibration curves for both markers were obtained and the repeatability and reliability of the measurements performed with the developed immunosensor were evaluated. Finally, discrete zones of the two specific antibodies against CRP and D-Dimers were created by spotting them onto the same surface and the surfaces were used for the simultaneous detection of the two analytes in serum samples. The values determined for both analytes were in good agreement with those determined for the same samples with reference methods, demonstrating the reliability of the determinations performed with the developed immunosensor and its potential for application in the simultaneous determination of two markers in clinical samples.

SUBJECT AREA: Biomolecules detection by biosensor

KEYWORDS: CRP, D-Dimers, microarrays, biosensor

*Αφιερώνεται σε αυτούς που με υπομονή
επιμένουν να προσπαθούν*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2011-2015 στο Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών επιστημών “Δημόκριτος” υπό την επίβλεψη του Δρ. Σ. Κακαμπάκου Ερευνητή Α΄ Βαθμίδας και της Δρ. Π. Πέτρου Ερευνήτριας Α΄ Βαθμίδας του ινστιτούτου σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α. υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Δρ. Α. Σιαφάκα-Καπάδα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών επιστημών “Δημόκριτος” για την διάθεση της εργαστηριακής υποδομής για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας καθώς και την Γ.Γ.Ε.Τ. για την κατά μέρους χρηματοδότηση της παρούσας εργασίας μέσω του προγράμματος ΟΡΑΜΑ.

Βαθύτατες ευχαριστίες εκφράζω προς την καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α. Δρ. Α. Σιαφάκα-Καπάδα για της πολύτιμες συμβουλές και τις διορθώσεις κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσοαναλύσεων Δρ. Σ. Κακαμπάκο, για την αποδοχή ως μέλος της επιστημονικής του ομάδας την ανάθεση του θέματος της διδακτορικής μου διατριβής, τη συνεχή καθοδήγηση, τις διορθώσεις του όπως και το αμείωτο ενδιαφέρον που μου επέδειξε. Οφείλω να αναγνωρίσω πως μέσα από την επιστημονική του ιδιοφυΐα προσέφερε μια ευρύτητα στην αντίληψή μου μακριά από τα στερεότυπα των προπτυχιακών μου σπουδών.

Προς την Δρ. Π. Πέτρου, εκφράζω τις θερμότερες ευχαριστίες για την συνεχή επίβλεψη και καθοδήγηση, τις διορθώσεις καθώς και την αμέριστη στήριξη που μου παρείχε στις προσπάθειές μου καθ’ όλη τη διάρκεια της διατριβής συμβάλλοντας με την επιστημονική της γνώση στην ολοκλήρωσή της.

Στον Δρ. Ι. Ράπτη επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την σημαντική συμβολή του στην πραγμάτωση των στόχων της διατριβής καθώς εκείνος σχεδίασε και κατασκεύασε το οπτοηλεκτρονικό μέρος του αισθητήρα ενώ καθ’

όλη τη διάρκεια της διατριβής ενίσχυε με τις επιστημονικές του συμβουλές τις προσπάθειές μου.

Το Δρ. Κ. Μισιακό ευχαριστώ για την συμβολή του στην κατασκευή της διάταξης του βιοαισθητήρα καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Τον Δρ. Ι. Χριστοφίδη θα ήθελα να ευχαριστήσω για τις πολύτιμες και καίριες συμβουλές που μου έδωσε κατά την διάρκεια του διδακτορικού μου καθώς και για την στήριξη που μου έδειξε.

Την εταιρία *ThetaMetrisis* και συγκεκριμένα τους Δρ. Δ. Δρυγιαννάκη και Δ. Γουστουρίδη θέλω να ευχαριστήσω για την πολύτιμη συμβολή τους για την ανάπτυξη του αισθητήρα και του λογισμικού του.

Στους Συνεργαζόμενους Ερευνητές Δρ. Χ. Μαστιχιάδη και Δρ. Α. Μπουρκουλα εκφράζω εγκάρδιες ευχαριστίες καθώς συνέβαλλαν τα μέγιστα ως προς την εξοικείωσή μου με το αντικείμενο της διατριβής όπως και την ολοκλήρωση του πειραματικού και συγγραφικού μέρους.

Για την συμπαράσταση και στήριξη καθ' όλη αυτή την διάρκεια της εργασίας μου θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Α. Ψαρούλη, Β. Πάγκαλη, Μ. Αγγελοπούλου, Α. Κανιούρα, Ζ. Τσιάλα, Ε. Σταύρα, Β. Βασιλακοπούλου.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω στους γονείς, τα αδέρφια, τους φίλους και τους συναδέλφους μου που με στήριζαν και με εμπύχωναν σε όλη την διάρκεια εκπόνησης της μελέτης αυτής.

Τέλος στην Χρύσα μου, εκφράζω ευχαριστίες από καρδιάς για την υπομονή, στήριξη και αγάπη που μου παρείχε στις δύσκολες στιγμές, πίστεψε περισσότερο από τον καθένα στο εγχείρημά μου και χωρίς αυτήν η εξέλιξη της ζωής μου θα ήταν πολύ διαφορετική.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΚΑΡΔΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	33
1.1 Ο ρόλος των καρδιακών δεικτών	33
1.2 Βασικά χαρακτηριστικά καρδιακών δεικτών	36
1.3 C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C - reactive protein, CRP).....	37
1.3.1 Ιστορική αναδρομή και δομή της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης.....	37
1.3.2 Βιοχημεία της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης.....	39
1.3.3 Κλινικές εφαρμογές της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης.....	41
1.4 D-διμερή (D-Dimers).....	42
1.4.1 Ιστορική αναδρομή και δομή των D-διμερών.....	42
1.4.2 Βιοχημικός ρόλος των D-διμερών	43
1.4.3 Κλινικές εφαρμογές του προσδιορισμού των επιπέδων των D-διμερών	45
1.5 Χρησιμότητα της ταυτόχρονης ανίχνευσης της C-αντιδρώσας Πρωτεΐνης και των D-διμερών για την διάγνωση ασθενειών	47
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ.....	49
2.1 Εισαγωγή στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς.....	49
2.2 Εισαγωγή στους βιοαισθητήρες.....	51
2.3 Είδη βιοαισθητήρων.....	53
2.3.1 Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες.....	53
2.3.2 Θερμικοί βιοαισθητήρες.....	54
2.3.3 Ακουστικοί βιοαισθητήρες.....	55

2.3.4 Οπτικοί βιοαισθητήρες.....	55
2.4 Οπτικοί βιοαισθητήρες χωρίς την χρήση ιχνηθετών.....	56
2.4.1 Εισαγωγή στους μη ιχνηθετημένους οπτικούς βιοαισθητήρες.....	56
2.4.2 Συμβολομετρικοί βιοαισθητήρες (Mach-Zehnder).....	57
2.4.3 Βιοαισθητήρες συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR).....	58
2.4.4 Βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός (RIFS, Reflectometric InterFERENCE Spectroscopy).....	59
2.4.5 Αρχή λειτουργίας του βιοαισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός(WLRS).....	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ.....	65
3.1 Ταυτόχρονος προσδιορισμός περισσότερου του ενός αναλυτών	65
3.2 Εισαγωγή στις μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών.....	66
3.3 Ιστορική αναδρομή	67
3.4 Κατασκευή πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών.....	69
3.4.1 Τεχνικές εναπόθεσης πρωτεϊνών στο υπόστρωμα	69
3.4.1.1 Κατασκευή μικροσυστοιχιών με επαφή	69
3.4.1.2 Δημιουργία μικροσυστοιχιών χωρίς επαφή	73
3.4.2 Ακίνητοποίηση των πρωτεϊνών στον στερεό φορέα.....	75
3.4.2.1 Ακίνητοποίηση μέσω προσρόφησης.....	76
3.4.2.2 Ομοιοπολική ακίνητοποίηση.....	76
3.4.2.3 Ακίνητοποίηση μέσω ειδικών δεσμευτικών πρωτεϊνών	77
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	79

5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ.....	81
5.1 Υδροφιλοποίηση επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου.....	81
5.2 Χημική τροποποίηση επιφανειών πυριτίου με APTES	82
5.3 Χημική τροποποίηση επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με γλουταραλδεϋδη	84
5.4 Χημική τροποποίηση επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με το GOPTS.....	85
5.5 Μέθοδος επίστρωσης υμενίων AZ σε επιφάνειες πυριτίου	87
5.6 Τροποποίηση πρωτεϊνικών μορίων με βιοτίνη (βιοτινυλίωση).....	89
5.7 Προσδιορισμός συγκέντρωσης βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	91
5.8 Έλεγχος επιτυχίας της βιοτινυλίωσης των πρωτεϊνών.....	93
5.9 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων CRP και D-dimers σε ρυθμιστικά διαλύματα και ανθρώπινο φυσιολογικό ορό	96
5.10 Μέθοδος ανοσοενζυμομετρικού προσδιορισμού της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης	99
5.11 Μέθοδος ανοσοενζυμομετρικού προσδιορισμού των D-διμερών (D-Dimers) σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης	102
5.12 Μέθοδος εναπόθεσης βιομορίων αναγνώρισης σε επιφάνειες πυριτίου και κατασκευή πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών	105
5.13 Ακίνητοποίηση των βιομορίων στις επιφάνειες πυριτίου	108
5.13.1 Πρωτόκολλο ακίνητοποίησης I: Απευθείας ακίνητοποίηση αντισώματος σε ενεργοποιημένη επιφάνεια πυριτίου.....	109
5.13.2 Πρωτόκολλο ακίνητοποίησης II: Ακίνητοποίηση βιοτινυλιωμένου	

αντισώματος μέσω στρεπταβιδίνης προσροφημένης σε στερεό φορέα.....	111
5.13.3 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης III: Ακινητοποίηση βιοτινυλιωμένου αντισώματος σε στρεπταβιδίνη δεσμευμένη σε επιφάνεια επιστρωμένη με b-BSA.....	113
5.14 Ανίχνευση των αναλυτών στις επιφάνειες πυριτίου.....	115
5.15 Ταυτόχρονη ανίχνευση CRP και D-dimers σε επιφάνειες πυριτίου.....	120
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	123
6.1 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδων ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού της CRP και των D-dimers σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης....	123
6.1.1 Επιλογή αντισωμάτων έναντι της CRP και των D-dimers	123
6.1.2 Επιλογή σύστασης διαλυμάτων ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού της CRP και των D-dimers.....	127
6.1.3 Χρονική μελέτη ανοσοαντιδράσεων	130
6.1.4 Καμπύλες προτύπων ενζυμοανοσοπροσδιορισμών των CRP και D-dimers σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.....	132
6.2 Προσδιορισμός βέλτιστης σύστασης και πάχους διάφανου στρώματος που εναποτίθεται στην επιφάνεια πυριτίου	133
6.3 Επιλογή μεθόδου ενεργοποίησης της αισθητήριας επιφάνειας	138
6.4 Επιλογή μεθόδου ακινητοποίησης των ειδικών αντισωμάτων στην αισθητήρια επιφάνεια	141
6.5 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του αντισώματος στην αισθητήρια επιφάνεια	143
6.6 Επιλογή μεθόδου εναπόθεσης του αντισώματος δέσμευσης στην επιφάνεια για την δημιουργία των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών	144
6.7 Έλεγχος της ομοιογένειας της ακινητοποίησης αντισώματος στην	

αισθητήρια επιφάνεια	146
6.8 Έλεγχος επαναληψιμότητας της μέτρησης μεταξύ διαφορετικών επιφανειών	147
6.9 Σταθερότητα τροποποιημένων αισθητήριων επιφανειών	149
6.9.1 Σταθερότητα ακινητοποιημένων αντισωμάτων σε τροποποιημένες αισθητήριες επιφάνειες κατά την αποθήκευσή τους.....	149
6.9.2 Διερεύνηση δυνατότητας αναγέννησης των τροποποιημένων με αντίσωμα αισθητήριων επιφανειών.....	150
6.9.3 Σταθερότητα ακινητοποιημένων σε τροποποιημένες αισθητήριες επιφάνειες αντισωμάτων στο χρόνο μετά από επαναλαμβανόμενες αναγεννήσεις.....	152
6.10 Προσδιορισμός της βέλτιστης ταχύτητας ροής στην μικροροϊκή κυψελίδα.....	154
6.11 Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου ροής του διαλύματος αναλύτη από την μικροροϊκή κυψελίδα	156
6.12 Μελέτη σταθερότητας προτύπων διαλυμάτων.....	158
6.13 Καμπύλες προτύπων και αναλυτικά χαρακτηριστικά των ανοσοπροσδιορισμών της CRP και των D-dimers.....	160
6.13.1 Καμπύλες προτύπων CRP.....	160
6.13.2 Καμπύλες προσδιορισμού των D-dimers.....	162
6.14 Επιδράσεις του ορού στην μέτρηση και το αναλυτικό σήμα.....	164
6.15 Έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου.....	166
6.16 Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων και συσχέτιση με εμπορικά διαθέσιμο σύστημα προσδιορισμού.....	167
6.17 Ταυτόχρονος προσδιορισμός CRP και D-dimers με φασματοσκοπία	

ανάκλασης λευκού φωτός.....	170
6.17.1 Κατασκευή μικροσυστοιχιών για ανίχνευση της CRP και αξιολόγηση της επαναληψιμότητας της μέτρησης.....	170
6.17.2 Κατασκευή μικροσυστοιχιών για ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών βιομορίων.....	172
6.17.3 Ταυτόχρονη ανίχνευση CRP και D-dimers σε μικροσυστοιχίες με την χρήση του βιοαισθητήρα φασματοσκοπίας ανίχνευσης λευκού φωτός.....	174
7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	179
8. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	187
9. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	189
10. ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	191

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Δημοφιλέστεροι καρδιακοί δείκτες σε σχέση με τον μηχανισμό δράσης τους για την εκτίμηση κινδύνου στα καρδιαγγειακά νοσήματα.....	35
Σχήμα 2: Τρισδιάστατη δομή υπομονάδας (μονομερούς) C - αντιδρώσας πρωτεΐνης.....	38
Σχήμα 3: Η πενταμερής δομή της CRP με συνδεδεμένα δύο άτομα ασβεστίου (άσπρα σφαιρίδια) σε κάθε υπομονάδα. Τα μαύρα σφαιρίδια είναι προσδεμένα μόρια φωσφοχολίνης.....	38
Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση δράση της CRP στον οργανισμό.....	39
Σχήμα 5: Πορεία σύνθεσης και αποδόμησης του ινώδους.....	45
Σχήμα 6: Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών διαμορφώσεων ανοσοχημικών προσδιορισμών στερεάς φάσης (Α) ανταγωνιστικού και (Β) μη ανταγωνιστικού τύπου.....	51
Σχήμα 7: Αναπαράσταση του τρόπου λειτουργίας των βιοαισθητήρων.....	52
Σχήμα 8: Μέτρηση της γλυκόζης στο αίμα με την χρήση ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα.....	54
Σχήμα 9: Απεικόνιση τυπικού θερμικού βιοαισθητήρα.....	54
Σχήμα 10: Ακουστικός βιοαισθητήρας συνεχούς ροής.....	55
Σχήμα 11: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των βιοαισθητήρων Mach-Zehnder.....	58
Σχήμα 12: α) Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των βιοαισθητήρων SPR, β) καταγραφή σήματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, γ) μετατόπιση του μήκους κύματος ως αποτέλεσμα της αντίδρασης.....	59
Σχήμα 13: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των βιοαισθητήρων	

φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός (RIFS).....	60
Σχήμα 14: Α) Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός Β) Μετατόπιση του φάσματος λόγω της αύξησης του πάχους του βιομοριακού υμενίου που σχηματίζεται πάνω στην ανακλαστική επιφάνεια.....	62
Σχήμα 15: Φάσματα από φιλμ με υπόστρωμα ●: Si και ●: Si με επίστρωση SiO ₂ πάχους 1000 nm.....	63
Σχήμα 16: Α) Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών αντισωμάτων, Β) Εικόνες από πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες με διαφορετική σχηματοποίηση μετά από αντίδραση με μόρια αναλυτών σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες.....	67
Σχήμα 17: Ακίδες εναπόθεσης: (Α) συμπαγείς ακίδες, (Β-Γ) ακίδες τύπου πένας με διάφορα εύρη ανοίγματος και (Δ) τριχοειδείς ακίδες.....	70
Σχήμα 18: Πορεία εναπόθεσης με: Α) Συμπαγείς ακίδες: το ακροφύσιο της ακίδας συγκρατεί μέσω τριχοειδών δυνάμεων το διάλυμα και η εναπόθεση γίνεται μέσω απλής επαφής με το υπόστρωμα. Β) Ακίδες τύπου πένας: το εσωτερικό της ακίδας πληρώνεται με το διάλυμα μέσω τριχοειδών δυνάμεων και υπάρχει η δυνατότητα σειριακής εναπόθεσης για κάθε πλήρωση της ακίδας με διάλυμα.....	70
Σχήμα 19: (α) Σχηματική πορεία κατασκευής μικροσυστοιχιών με νανολιθογραφία τύπου dip-pen. (β) Σχηματική πορεία κατασκευή μικροσυστοιχιών με απομάκρυνση μορίων με ακίδες μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM grafting).....	72
Σχήμα 20: Η λειτουργία της ημιπερατής μεμβράνης. Στο σχήμα φαίνονται οι βασικές φυσικές και χημικές λειτουργίες της ημιπερατής μεμβράνης. Αυτές οι λειτουργίες περιλαμβάνουν: (i) την διέλευση μορίων νερού και μικρών ιόντων προς την επιφάνεια του μικροηλεκτροδίου, (ii) την παρεμπόδιση μεταφοράς βιομορίων στην ενεργή επιφάνεια του μικροηλεκτροδίου, (iii) την προστασία των ειδικών δεσμευτικών αντιδράσεων από τις επιδράσεις των	

προϊόντων ηλεκτρόλυσης (H^+ , OH^- , H_2 , O_2 και ελεύθερες ρίζες,) και (iv) τη χρήση της για την πρόσδεση μορίων αναγνώρισης.....	74
Σχήμα 21: Σχηματική αναπαράσταση της εναπόθεσης μικροκηλίδων με θερμική εκνέφωση. Αντιστάσεις εξατμίζουν μια μικροποσότητα υγρού η οποία στη συνέχεια αποκόπτεται και προσπίπτει στην επιφάνεια.....	75
Σχήμα 22: Σχηματική αναπαράσταση της ακινητοποίησης αντισωμάτων σε επιφάνεια μέσω προσρόφησης.....	76
Σχήμα 23: Σχηματική αναπαράσταση της ακινητοποίησης αντισωμάτων με ομοιοπολική πρόσδεση σε επιφάνεια.....	77
Σχήμα 24: Σχηματική αναπαράσταση της ακινητοποίησης αντισωμάτων μέσω του συστήματος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης. Το αντίσωμα που φέρει μόρια βιοτίνης ακινητοποιείται στην επιφάνεια λόγω της ισχυρής σύνδεσης μεταξύ βιοτίνης-στρεπταβιδίνης.....	78
Σχήμα 25: Υδροφιλοποίηση υάλινων επιφανειών με H_2SO_4/H_2O_2	81
Σχήμα 26: Αρχή μεθόδου σιλιανοποίησης επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με APTES.....	83
Σχήμα 27: Αρχή μεθόδου ενεργοποίησης επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με γλουταραλδεϋδη.....	85
Σχήμα 28: Αρχή μεθόδου σιλιανοποίησης επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με GOPTS.....	87
Σχήμα 29: Αρχή μεθόδου επίστρωσης επιφανειών πυριτίου με υμένιο AZ....	89
Σχήμα 30: Αντίδραση σύζευξης πρωτεϊνών με βιοτίνη.....	89
Σχήμα 31: Καμπύλη βαθμονόμησης γ-σφαιρινών κουνελιού με τη μέθοδο Bradford (■).....	93
Σχήμα 32: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου ελέγχου της βιοτινυλίωσης πρωτεϊνών.....	95

Σχήμα 33: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες βαθμονόμησης των εμπορικά διαθέσιμων ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών της CRP(■) και D-dimers (○).	99
Σχήμα 34: Σχηματική αναπαράσταση ανοσοενζυμικού προσδιορισμού της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.....	102
Σχήμα 35: Σχηματική αναπαράσταση του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού των D-διμερών σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.....	105
Σχήμα 36: Ειδικό αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται για πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 10 ng/mL χρησιμοποιώντας διαφόρους συνδυασμούς αντισωμάτων δέσμευσης και ανίχνευσης. Κάθε στήλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....	124
Σχήμα 37: Ειδικό αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται για πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 50 ng/mL χρησιμοποιώντας διαφόρους συνδυασμούς αντισωμάτων δέσμευσης και ανίχνευσης. Κάθε στήλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....	125
Σχήμα 38: Ειδικό αναλυτικό σήμα αντισώματος GC019 με πρότυπα διαλύματα CRP 0 και 50 ng/mL χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συνδυασμούς ρυθμιστικών διαλυμάτων. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....	129
Σχήμα 39: Ειδικό αναλυτικό σήμα αντισωμάτων GPDD, b-MDD6, b-MDD41 με πρότυπα διαλύματα D-dimers 0 και 50 ng/mL χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συνδυασμούς ρυθμιστικών διαλυμάτων. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....	130
Σχήμα 40: Μεταβολή ειδικού αναλυτικού σήματος που ελήφθη για πρότυπα διαλύματα CRP συγκέντρωσης 10 ng/mL (■) και D-dimers 50 ng/mL (●) συναρτήσει του χρόνου της αντίδρασης των προτύπων διαλυμάτων με το ακινητοποιημένο στα φρεάτια αντίσωμα. Η χρονική διάρκεια του δευτέρου σταδίου της αντίδρασης ήταν 1 ώρα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....	131

- Σχήμα 41: Μεταβολή ειδικού αναλυτικού σήματος που ελήφθη για πρότυπα διαλύματα CRP συγκέντρωσης 10 ng/mL (■) και D-dimers 50 ng/mL (●) συναρτήσει του χρόνου της αντίδρασης των προτύπων διαλυμάτων με το ακινητοποιημένο στα φρεάτια αντίσωμα. Η χρονική διάρκεια του δευτέρου σταδίου της αντίδρασης ήταν 1 ώρα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD..... 132
- Σχήμα 42: Καμπύλες προτύπων CRP (■) και D-dimers (●) που ελήφθησαν με μη ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοπροσδιορισμό σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD..... 133
- Σχήμα 43: Φάσματα ανάκλασης που ελήφθησαν από υποστρώματα Si που είχαν στην επιφάνεια τους υμένιο SiO₂ πάχους 300 (Α), 500 (Β), 700 (Γ), 1000 (Δ) ή 3000 nm (Ε), ή υμένιο Si₃N₄ πάχους 100 (ΣΤ) ή 250 nm (Ζ), ή διπλό υμένιο SiO₂/Si₃N₄ πάχους 1000/100 nm (Η)..... 135
- Σχήμα 44: Φαινόμενο πάχος της βιομοριακής στοιβάδας που σχηματίζεται σε υποστρώματα Si στα οποία έχουν εναποτεθεί υμένια SiO₂ ή Si₃N₄ διαφορετικού πάχους καθώς και συνδυασμός αυτών και τα οποία έχουν τροποποιηθεί με πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός έναντι της CRP μετά από αντίδραση με διάλυμα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD..... 137
- Σχήμα 45: Φαινόμενο πάχος της βιομοριακής στοιβάδας που σχηματίζεται σε υποστρώματα Si/SiO₂ τα οποία έχουν υποστεί διαφορετικές τροποποιήσεις και στις οποίες έχει ακινητοποιηθεί πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός έναντι της CRP κατά την αντίδραση με διάλυμα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL. Οι διαφορετικές τροποποιήσεις που παρουσιάζονται είναι: APTES σε υδατικό διάλυμα (APTES/H₂O, πρώτη στήλη), APTES σε διάλυμα αιθανόλης (APTES/EtOH, δεύτερη στήλη), APTES σε υδατικό διάλυμα και ενεργοποίηση με γλουταραλδεϋδη (APTES/GA, τρίτη στήλη), GOPTS σε άνυδρο τολουόλιο (GOPTS, τέταρτη στήλη), και AZ5214 (AZ, πέμπτη στήλη). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών

επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD..... 140

Σχήμα 46: Φαινόμενο πάχος της βιομοριακής στοιβάδας (σήμα) που σχηματίζεται σε υποστρώματα Si/SiO₂ τα οποία έχουν τροποποιηθεί με APTES και στην συνέχεια έχει ακινητοποιηθεί πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός κατά της CRP κατά την αντίδραση με πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 100 ng /mL. Οι διαφορετικοί τρόποι ακινητοποίησης του ειδικού αντισώματος που παρουσιάζονται είναι: πρώτη στήλη: απευθείας προσρόφηση του αντισώματος, δεύτερη στήλη: πρόσδεση βιοτινυλιωμένου αντισώματος σε προσροφημένη στρεπταβιδίνη, τρίτη στήλη: δεύτερη στήλη), πρόσδεση βιοτινυλιωμένου αντισώματος σε δεσμευμένοι στρεπταβιδίνη σε προσροφημένη bBSA (bBSA/STR/GC019, τρίτη στήλη). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD..... 142

Σχήμα 47: Μεταβολή του φαινόμενου πάχους της βιομοριακής στοιβάδας (σήμα) που σχηματίζεται σε υποστρώματα Si/SiO₂ τα οποία έχουν τροποποιηθεί με APTES και στην συνέχεια έχει ακινητοποιηθεί πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός από διαλύματα συγκεντρώσεων: 50 (μαύρα τετράγωνα), 100 (κόκκινοι κύκλοι), 200 (μπλέ τρίγωνα) και 400 μ g/mL (πράσινα τρίγωνα) συναρτήσει της συγκέντρωσης της CRP . Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD..... 143

Σχήμα 48: Φαινόμενο πάχος της βιομοριακής στοιβάδας (σήμα) που σχηματίζεται σε ενεργοποιημένα υποστρώματα Si/SiO₂ στα οποία το ειδικό κατά της CRP έχει εναποτεθεί με το χέρι (hand spot), ή με αυτόματη συσκευή εναπόθεσης κηλίδων με τη συμπαγή (solid pin) ή την ακίδα τύπου πέννας (quill pin). Οι τιμές αφορούν πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD..... 145

Σχήμα 49: Φαινόμενο πάχος βιομοριακής στοιβάδας (σήμα) που λαμβάνεται από 10 διαφορετικά σημεία μιας επιφάνειας Si/SiO₂ στην οποία έχει ακινητοποιηθεί αντίσωμα έναντι της CRP. Τα αποτελέσματα αφορούν συγκέντρωση CRP 100 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών

επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....	147
---------------------------------------	-----

Σχήμα 50: Τιμές φαινόμενου πάχους βιομοριακής στοιβάδας (σήμα) που ελήφθησαν από διαφορετικές επιφάνειες στις οποίες είχε ακινητοποιηθεί αντίσωμα έναντι της CRP ή των D-dimers (20 επιφάνειες για κάθε αναλύτη). Τα αποτελέσματα αφορούν συγκέντρωση CRP 100 ng/mL και D-dimers 500 ng/mL, αντίστοιχα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....	148
---	-----

Σχήμα 51: Τιμές σήματος που ελήφθησαν από επιφάνειες στις οποίες είχε ακινητοποιηθεί αντίσωμα έναντι της CRP και των D-dimers και φυλάχθηκαν σε ξηραντήρα υπό κενό σε θερμοκρασία 4 °C συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης. Οι τιμές αντιστοιχούν σε πρότυπα διαλύματα CRP 100 ng/mL και D-dimers 500 ng/mL. Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....	149
--	-----

Σχήμα 52: Τιμές σήματος που ελήφθησαν από επιφάνεια στην οποία είχε ακινητοποιηθεί αντίσωμα έναντι της CRP μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης/αναγέννησης. Οι τιμές αφορούν πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 50 ng/mL.....	151
--	-----

Σχήμα 53: Τιμές σήματος που ελήφθησαν από επιφάνεια στην οποία είχε ακινητοποιηθεί αντίσωμα έναντι των D-dimers μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης/αναγέννησης. Οι τιμές αφορούν πρότυπο διάλυμα D-dimers συγκέντρωσης 500 ng/mL.....	152
---	-----

Σχήμα 54: Τιμές σήματος που ελήφθησαν από επιφάνειες στις οποίες είχαν ακινητοποιηθεί αντισώματα έναντι της CRP (μαύρες στήλες) και των D-dimers (κόκκινες στήλες) μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης/αναγέννησης εκφρασμένες ως επί τοις εκατό ποσοστά των τιμών που ελήφθησαν από τις επιφάνειες αμέσως μετά την παρασκευή τους (τιμή χρόνος 0). Οι τιμές αφορούν πρότυπα διαλύματα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL και D-dimers 500 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....	153
--	-----

Σχήμα 55: Καταγραφή σε πραγματικό χρόνο του ειδικού αναλυτικού	
--	--

σήματος κατά την παροχέτευση διαλύματος αντισώματος κατά της CRP με διαφορετικές ταχύτητες ροής σε επιφάνεια τροποποιημένη με αντίσωμα κατά της CRP και αντίδραση με πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 50 ng/mL. Οι ταχύτητες ροής που παρουσιάζονται είναι: 10 μl/min (μαύρη γραμμή), 20 μl/min (πράσινη γραμμή), 50 μl/min, (μπλε γραμμή) και 100 μl/min(κόκκινη γραμμή)..... 155

Σχήμα 56: Ειδικό αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται από επιφάνειες τροποποιημένες με ειδικό αντίσωμα κατά της CRP (A) και των D-dimers (B) για διέλευση σταθερού όγκου 600 μl προτύπου διαλύματος του αντίστοιχου αναλύτη με διαφορετικές ταχύτητες ροής. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων ήταν για CRP 50 ng/mL (A) και D-dimers 500 ng/mL (B). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD..... 157

Σχήμα 57: Ειδικό αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται από επιφάνειες τροποποιημένες με ειδικό αντίσωμα κατά της CRP (A) και των D-dimers (B) για διέλευση προτύπου διαλύματος του αντίστοιχου αναλύτη με σταθερή ταχύτητα ροής 20 μl/min για διαφορετικού χρόνου αντίδρασης. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων ήταν για CRP 50 ng/mL (A) και D-dimers 500 ng/mL (B). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD..... 158

Σχήμα 58: Τιμές ειδικού σήματος σε σχέση με τον χρόνο συντήρησης στους A) 4 °C και στους B) -20°C των πρότυπων δειγμάτων που ελήφθησαν για συγκεντρώσεις CRP 100 ng/mL και D-dimers 500 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD..... 159

Σχήμα 59: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες προτύπων CRP που ελήφθησαν με τον αναπτυχθέντα βιοαισθητήρα κατά: α) την απευθείας αντίδραση της CRP με το ακινητοποιημένο αντίσωμα (-▲-), β) την αντίδραση της δεσμευμένης στο αντίσωμα δέσμευσης CRP με το αντίσωμα ανίχνευσης (-●-) και, γ) την αντίδραση στρεπταβιδίνης με βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης (-■-). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αντιστοιχούν στον κάτω χ άξονα και στον αριστερό γ άξονα ενώ η μπλε

καμπύλη αντιστοιχεί στον πάνω χ άξονα και στον δεξί y άξονα..... 161

Σχήμα 60: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες προτύπων D-dimers που ελήφθησαν με τον αναπτυχθέντα βιοαισθητήρα κατά: α) την αντίδραση των ακινητοποιημένων στο αντίσωμα δέσμευσης μορίων D-dimers με το αντίσωμα ανίχνευσης (-▲-), και β) την αντίδραση στρεπταβιδίνης με βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης (-●-). Η κόκκινη καμπύλη αντιστοιχεί στον κάτω χ άξονα και στον αριστερό y άξονα ενώ η μπλε καμπύλη αντιστοιχεί στον πάνω χ άξονα και στον δεξί y άξονα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD..... 163

Σχήμα 61: Α) Τιμές ειδικού σήματος που ελήφθησαν από διαλύματα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL που παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (buffer) ή προέκυψαν από κατάλληλες αραιώσεις προτύπων σε ορό. Β) Καμπύλες προτύπων CRP που παρασκευαστήκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (μαύρη γραμμή) ή σε ορό ο οποίος αραιώθηκε στην συνέχεια 50 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (κόκκινη γραμμή). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD..... 165

Σχήμα 62: Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της CRP (Α) και D-Dimer (Β) που προσδιορίστηκαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο (WLRS) και με τα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα νεφελομετρίας Siemens Dimension® analyser (CRP) και Siemens Innovance® D-Dimer. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις ευθείες παλινδρόμησης (κόκκινο χρώμα)..... 169

Σχήμα 63: Α) Αποκρίσεις που ελήφθησαν κατά τη σάρωση μιας επιφάνειας που έφερε 7 ζώνες αντισώματος κατά της CRP κατά την αντίδραση με πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 250 ng/mL. Οι μαύρες καμπύλες αντιστοιχούν σε σημεία εκτός των ζωνών (blank = μη ειδική δέσμευση), ενώ οι κόκκινες καμπύλες σε σημεία εντός καθεμιάς από τις 7 βιοδραστικές ζώνες. Β) Απόκριση που ελήφθη με μέτρηση σταθερού σημείου από αισθητήρια επιφάνεια που έφερε μια ζώνη αντισώματος κατά της CRP κατά την αντίδραση με πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 250 ng/mL..... 171

Σχήμα 64: Αποκρίσεις που ελήφθησαν κατά τη σάρωση μιας επιφάνειας

που έφερε 3 βιοδραστικές ζώνες, 2 ζώνες βιοτινυλιωμένης BSA και μια ζώνη αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού. Οι καμπύλες κόκκινου και πράσινου χρώματος αντιστοιχούν στις αποκρίσεις από τις ζώνες βιοτινυλιωμένης BSA κατά την αντίδραση με διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/mL}$ ενώ η καμπύλη μπλε χρώματος σε απόκριση από τη ζώνη του αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού κατά την αντίδραση με διάλυμα γ-σφαιρινών κουνελιού συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g/mL}$. Η μαύρη καμπύλη αντιστοιχεί στην απόκριση από σημείο της επιφάνειας που δεν έχει ακινητοποιηθεί κάποιο βιομόριο (blank).....	174
Σχήμα 65: Καμπύλες προτύπων CRP (A) και D-dimers (B) που ελήφθησαν είτε με μετρήσεις σταθερού σημείου (μαύρη γραμμή) είτε για ταυτόχρονη ανίχνευση των δύο αναλυτών στην ίδια βιοδραστική επιφάνεια (κόκκινη γραμμή). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....	175
Σχήμα 66: Απόκριση σε πραγματικό χρόνο κατά τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της CRP και των D-dimers σε δείγμα ανθρώπινου πλάσματος (C2). Κάθε καμπύλη αφορά μέτρηση σε συγκεκριμένη βιοδραστική ζώνη. Οι καμπύλες κόκκινου και μαύρου χρώματος αντιστοιχούν σε απόκριση από ζώνες αντισώματος CRP ενώ οι καμπύλες ροζ και πράσινου χρώματος αντιστοιχούν σε απόκριση από ζώνες αντισώματος D-Dimer. Η μπλε καμπύλη αντιστοιχεί σε απόκριση από σημείο της επιφάνειας όπου δεν έχει ακινητοποιηθεί ειδικό αντίσωμα (Blank).....	176
Σχήμα 67: Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της CRP (A) και D-dimers (B) που προσδιορίστηκαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο (WLRS) και με τα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα νεφελομετρίας Siemens Dimension® analyser (CRP) και Siemens Innovance® D-Dimer. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις ευθείες παλινδρόμησης (κόκκινο χρώμα).....	178

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Τριτοταγής δομή του D-διμερούς (D-dimers).....	43
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της εναπόθεσης των κηλίδων πάνω στον στερεό φορέα: Α) με επαφή και Β) από απόσταση.....	69
Εικόνα 3: Μέθοδος κατασκευής μικροσυστοιχιών με μικροσφραγίδες (α) η σφραγίδα εμβαπτίζεται στο διάλυμα του δείγματος, (β) το δείγμα μεταφέρεται στο υπόστρωμα μέσω φυσικής επαφής του ανάγλυφου ελαστομερούς με την επιφάνεια του υποστρώματος της μικροσυστοιχίας.....	71
Εικόνα 4 : Συσκευή αυτόματης εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey Calligrapher™ MiniArrayer της Bio-Rad.....	106
Εικόνα 5 : Συμπαγής ακίδα εναπόθεσης μικροκηλίδων για την κατασκευή μικροσυστοιχιών.....	108
Εικόνα 6 : Διάταξη φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός.....	117

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Επιλεγμένοι καρδιακοί δείκτες και τα χαρακτηριστικά τους.....	36
Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις CRP και επίπεδα κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου.....	42
Πίνακας 3: Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης και έλεγχος βιοτινυλίωσης αντισωμάτων.....	96
Πίνακας 4 : Παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την εναπόθεση των διαλυμάτων στις επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου.....	108
Πίνακας 5: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοχημικού προσδιορισμού της CRP με τον αισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (WLRS).	162
Πίνακας 6: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοχημικού προσδιορισμού των D-dimers με τον αισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (WLRS).....	164
Πίνακας 7: Αποτελέσματα δοκιμασιών ανάκτησης για την CRP και τα D-dimers.....	166
Πίνακας 8: Αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά την μέτρηση της CRP και των D-dimers με την μέθοδο αναφοράς (νεφελομετρία) και με την αναπτυχθείσα μέθοδο WLRS.....	168
Πίνακας 9: Αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά την ταυτόχρονη μέτρηση της CRP και των D-dimers σε δείγματα πλάσματος με την μέθοδο αναφοράς (νεφελομετρία) και με την αναπτυχθείσα μέθοδο WLRS.....	177
Πίνακας 10: Αισθητήρες για ανίχνευση CRP και D-dimer	185

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΑΡΔΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

1.1 Ο ρόλος των καρδιακών δεικτών

Τα καρδιακά νοσήματα και ειδικότερα τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα αποτελούν την κυριότερη αιτία θνησιμότητας παγκοσμίως, τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες [1, 2]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, περίπου 17,5 εκατομμύρια θάνατοι το έτος 2005, το 30% των συνολικών θανάτων παγκοσμίως, οφείλονταν σε καρδιακά νοσήματα, ενώ εκτιμάται ότι μέχρι το 2015, θα αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες [3]. Στην Ευρώπη, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Στατιστική Υπηρεσία καταγράφηκαν το έτος 2008 4,3 εκατομμύρια θάνατοι λόγω καρδιακών παθήσεων εκ των οποίων τα 2 εκατομμύρια στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ενώ υπολογίζεται ότι το κόστος για την Ευρωπαϊκή οικονομία για την περίθαλψη ασθενών με οξέα καρδιακά επεισόδια ανέρχεται σε περίπου 192 δισεκατομμύρια Euro το χρόνο [4].

Η κυριότερη αιτία εμφάνισης των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων είναι η καρδιακή ισχαιμία, δηλαδή η κατάσταση μειωμένης παροχής οξυγόνου στον καρδιακό μυ, που συνοδεύεται από μειωμένη συστολή του μυοκαρδίου, ως αποτέλεσμα της αθηροσκλήρωσης των στεφανιαίων αρτηριών. Η ισχαιμία καταλήγει στην προοδευτική νέκρωση του καρδιακού ιστού και την εμφάνιση διαφορετικών κλινικών καταστάσεων, τα οποία χαρακτηρίζονται από τον γενικό όρο στεφανιαία σύνδρομα και περιλαμβάνουν: σταθερή στηθάγχη, ασταθή στηθάγχη, έμφραγμα του μυοκαρδίου και οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου, που αποτελεί και το τελευταίο στάδιο του στεφανιαίου συνδρόμου, χαρακτηρίζεται από νέκρωση (κυτταρικό θάνατο) μίας εκτεταμένης περιοχής του καρδιακού ιστού ως αποτέλεσμα της απόφραξης των στεφανιαίων αρτηριών [5].

Ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των ασθενών που εμφανίζουν ένα από τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα αποτελεί η έγκαιρη πρόγνωση ή/και διάγνωσης της καρδιακής βλάβης. Η πρόγνωση ενός επικείμενου εμφράγματος του μυοκαρδίου μπορεί να οδηγήσει μέσω της εφαρμογής κατάλληλης

θεραπευτικής αγωγής σε σημαντική μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας της νόσου. Τα περισσότερα από τα παραδοσιακά διαγνωστικά εργαλεία (ηλεκτροκαρδιογράφημα, φυσική εξέταση, ιατρικό ιστορικό) δεν καλύπτουν πλήρως τις απαιτήσεις της διάγνωσης ενώ παράλληλα εμφανίζουν μειωμένη προγνωστική αξία. Συγκεκριμένα, η διαγνωστική ευαισθησία του ηλεκτροκαρδιογραφήματος για οξέα εμφράγματα του μυοκαρδίου είναι μόνο 60%. Κατά τη φυσική εξέταση από την άλλη, είναι δύσκολο να διακριθεί η προέλευση παθολογικών συμπτωμάτων όπως στηθάγχη, εφίδρωση, δυσχέρεια στην αναπνοή κ.α., ενώ σε ποσοστό 33% των περιπτώσεων οξέων εμφραγμάτων του μυοκαρδίου δεν εμφανίζονται ενοχλήσεις στο στήθος ή σε άλλο σημείο του σώματος που να μπορούν να σχετιστούν με καρδιακή βλάβη [6]. Τέλος, η πρόγνωση με βάση το ιστορικό του ασθενούς είναι εξαιρετικά χρονοβόρα, χαρακτηρίζεται από δυσκολία λεπτομερούς καταγραφής του συνόλου του ιστορικού, ενώ πρέπει να τονιστεί ότι το 80% των περιστατικών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου καταγράφεται σε άτομα χωρίς ιστορικό καρδιακών παθήσεων. Προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι προαναφερθέντες περιορισμοί και να καταστεί ευκολότερη και ταχύτερη η πρόγνωση των στεφανιαίων συνδρόμων, τα τελευταία χρόνια έχουν επιλεχθεί συγκεκριμένοι βιοχημικοί δείκτες (πρωτεΐνες, ένζυμα, πεπτίδια, κ.α.) των οποίων η αύξηση των επιπέδων στον ορό πέρα από συγκριμένα όρια αποτελεί ένδειξη πιθανής ύπαρξης καρδιακού νοσήματος [7].

Ιστορικά, ο πρώτος βιοχημικός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για τη διάγνωση καρδιακής βλάβης ήταν η ασπαραγινική αμινοτρανσφεράση (AST), σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 1954 [8]. Στα χρόνια που ακολούθησαν υπήρξε μεγάλο ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα για την εύρεση και την κλινική αξιολόγηση διαφόρων ουσιών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως «καρδιακοί δείκτες» για την πρόγνωση ή/και τη διάγνωση των καρδιακών νοσημάτων. Στο πλαίσιο αυτό καθιερώθηκαν αρχικά μεθοδολογίες που βασίζονταν σε προσδιορισμούς ενζυμικής δραστηριότητας της κινάσης της κρεατίνης (CK) και της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) [9].

Σήμερα, ο δείκτης που προσδιορίζεται συχνότερα σε περιπτώσεις που υπάρχει ένδειξη καρδιακής βλάβης είναι η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive

protein, CRP). Ο προσδιορισμός της σε συνδυασμό με άλλους καρδιακούς δείκτες όπως η CK και η cTnI αποτελεί το κύριο μέσο για τη διάγνωση, πρόγνωση, παρακολούθηση και αξιολόγηση του κινδύνου που διατρέχουν ασθενείς που θεωρούνται ύποπτοι για οξεία στεφανιαία σύνδρομα. Η μυοσφαιρίνη (MYO) αποτελεί επίσης έναν πολύ ειδικό καρδιακό δείκτη δεδομένου ότι οι συγκεντρώσεις της στον ορό αυξάνονται ταχέως όταν υποστεί βλάβη ο καρδιακός μυς (καρδιακό επεισόδιο). Σημαντικός επίσης καρδιακός δείκτης ειδικά για την πρόγνωση εμφάνισης καρδιακής νόσου (απόφραξη στεφανιαίας αρτηρίας) είναι η αύξηση των επιπέδων των D-διμερών (D-dimers) στο ορό. Στο Σχήμα 1 παρουσιάζονται οι συχνότερα μελετώμενοι καρδιακοί δείκτες σε συνδυασμό με τον βιοχημικό μηχανισμό που συμμετέχουν [10].



Σχήμα 1: Δημοφιλέστεροι καρδιακοί δείκτες σε σχέση με τον μηχανισμό δράσης τους για την εκτίμηση κινδύνου στα καρδιαγγειακά νοσήματα.

1.2 Βασικά χαρακτηριστικά καρδιακών δεικτών

Τα βασικά χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένα βιομόριο για να χαρακτηριστεί ως καρδιακός δείκτης είναι τα εξής:

- Υψηλή κλινική ευαισθησία
- Υψηλή εξειδίκευση
- Γρήγορη απελευθέρωση στην κυκλοφορία του αίματος προκειμένου να επιτυγχάνεται έγκαιρη διάγνωση
- Μεγάλος χρόνος παραμονής στην κυκλοφορία του αίματος
- Δυνατότητα συσχέτισης των επιπέδων του δείκτη με το μέγεθος της καρδιακής βλάβης

Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1) παρουσιάζονται μερικοί από τους πιο συχνά προσδιοριζόμενους καρδιακούς δείκτες καθώς και τα βασικά κλινικά χαρακτηριστικά τους [10]:

Πίνακας 1: Επιλεγμένοι καρδιακοί δείκτες και τα χαρακτηριστικά τους

Δείκτης	Καρδιακή βλάβη που ανιχνεύονται	M.B. (kD)	Επίπεδα συγκέντρωσης στον ορό	Εξειδίκευση / Ευαισθησία
Τροπονίνη I (cTnI)	Οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου	23,5	0.01 – 0.1 ng/mL	++++/++++
Τροπονίνη T (cTnT)	Οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου	37	0.05–0.1 ng/mL	++++/++++
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)	Πρόγνωση οξέος εμφράγματος μυοκαρδίου	115	>3–15 µg/mL	++/+++
Κινάσης της Κρεατίνης-MB (CK-MB)	Οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου	85	10 ng/mL	+++ /+++
Ασπαρτική Αμινοτρανσφεράση (AST)	Οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου	103	11 - 38 IU/L	+ /++
Γαλακτική Αφυδρογονάση (LDH)	Οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου	135	230-460 U/L	+ /++
H-FABP	Νέκρωση μυοκαρδίου	14,5	≥6 ng/mL	++/+++
Ιντερλευκίνη 6 (IL-6)	Πρόγνωση οξέος εμφράγματος μυοκαρδίου	26	>2 pg/mL	++/+++
D-διμερές (D-Dimer)	Δημιουργία θρόμβων	200	>500 ng/mL	++/+++

Οι περισσότεροι από τους δείκτες ανιχνεύονται στον ορό σε υψηλές συγκεντρώσεις σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά από κάποιο καρδιακό επεισόδιο και παραμένουν σε αυξημένα επίπεδα για κάποιο διάστημα μετά

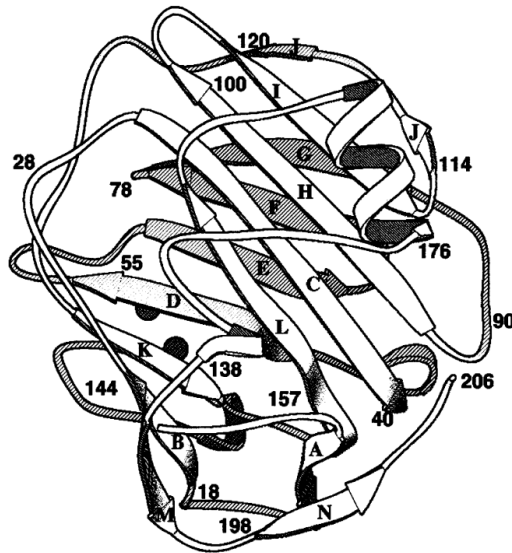
από αυτό. Υπάρχουν όμως και κάποιοι δείκτες, όπως η CRP και τα D-dimers, οι οποίοι δεν έχουν μόνο διαγνωστική αλλά και προγνωστική αξία, καθώς αυξημένες συγκεντρώσεις τους στον ορό αποτελούν ένδειξη αυξημένου κινδύνου για επικείμενο καρδιακό επεισόδιο. Στη συνέχεια του κεφαλαίου αυτού, θα περιγραφούν αναλυτικότερα οι βιοχημικές ιδιότητες και οι κλινικές εφαρμογές των δύο αυτών καρδιακών δεικτών καθώς αποτελούν και το αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

1.3 C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C - reactive protein, CRP)

1.3.1 Ιστορική αναδρομή και δομή της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης

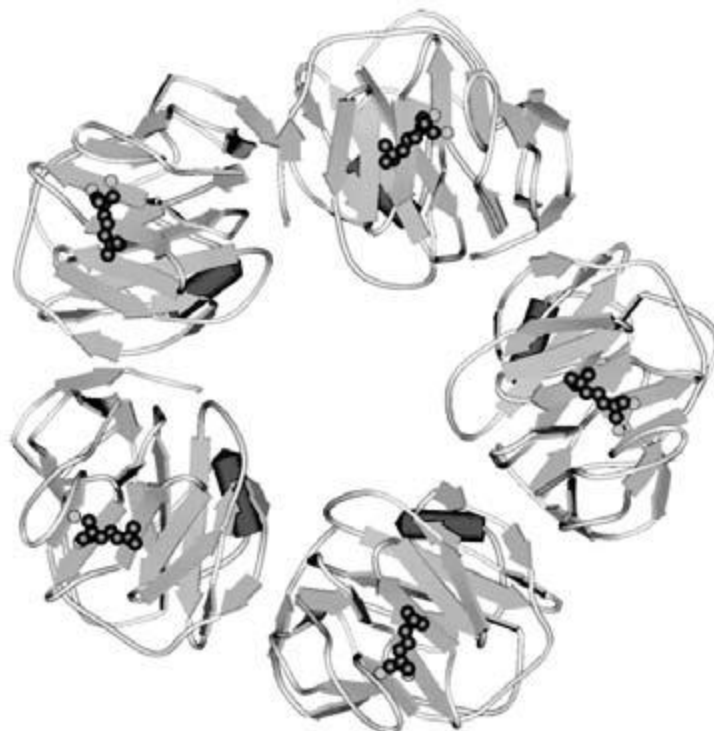
Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP) είναι μια πρωτεΐνη τα επίπεδα της οποίας αυξάνονται γρήγορα στην κυκλοφορία του αίματος σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζεται ως πρωτεΐνη οξείας φάσης, όρος που χαρακτηρίζει τις πρωτεΐνες εκείνες που η συγκέντρωσή τους αυξάνει κατά τουλάχιστον 25% στον ορό του αίματος κατά την εκδήλωση φλεγμονής.

Ανακαλύφθηκε το 1930 από τους William S. Tillet και Thomas Francis στο Ινστιτούτο Ιατρικής Έρευνας Rockefeller κατά την διάρκεια μελετών ανοσολογικής απόκρισης ασθενών με πνευμονιοκοκκική πνευμονία, ως μια πρωτεΐνη που συνδέεται με τον C-πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος του πνευμονιοκόκκου [11]. Η CRP είναι μέλος της οικογένειας των πενταξαζινών πρωτεϊνών οι οποίες διατηρούν υψηλή ομολογία μεταξύ των ειδών. Όπως όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας δομείται από πέντε όμοιες υπομονάδες (πρωτομερή) οι οποίες σχηματίζουν ένα συμμετρικό πενταμερές με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονομερών. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από ένα πολυπεπτίδιο μονής αλυσίδας 206 αμινοξέων με μοριακό βάρος περίπου 23.000 Da.



Σχήμα 2: Τρισδιάστατη δομή υπομονάδας (μονομερούς) C - αντιδρώσας πρωτεΐνης [12].

Κάθε υπομονάδα δεσμεύει δύο ιόντα ασβεστίου (Ca^{+2}) επιτρέποντας έτσι την σύνδεση της με την φωσφοχολίνη (phosphocholine, PCh), ένα τμήμα της φωσφατιδυλοχολίνης της κυτταρικής μεμβράνης, κατά την διαδικασία αναγνώρισης και ανοσολογικής απόκρισης όταν ένα κύτταρο έχει υποστεί ζημία.

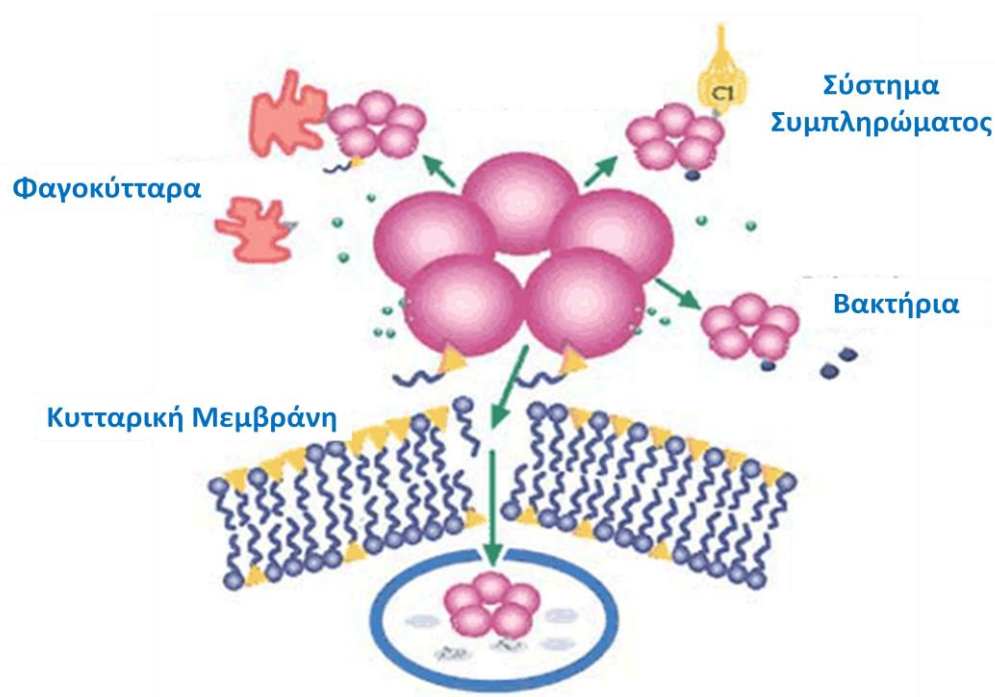


Σχήμα 3: Η πενταμερής δομή της CRP με συνδεδεμένα δύο άτομα ασβεστίου (άσπρα σφαιρίδια) σε κάθε υπομονάδα. Τα μαύρα σφαιρίδια είναι προσδεμένα μόρια φωσφοχολίνης [13].

1.3.2 Βιοχημεία της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης

Οι πρωτεΐνες οξείας φάσεως, στις οποίες ανήκει και η CRP, είναι μια ομάδα τριάντα και πλέον πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στον μηχανισμό άμυνας του οργανισμού ενάντια σε λοιμώξεις ή φυσικό τραύμα με απώτερο στόχο την αποκατάσταση της ομοιοστασίας των ιστών. Διακρίνονται στις α) **Θετικές Πρωτεΐνες Οξείας Φάσης**, οι οποίες αυξάνονται τουλάχιστον κατά 25% στην οξεία φάση και στην ομάδα αυτή ανήκουν η CRP, το ινωδογόνο, το αμυλοειδές Α, πολλοί παράγοντες του συμπληρώματος, η σερουλοπλασμίνη, και η απποσφαιρίνη, και β) **Αρνητικές Πρωτεΐνες Οξείας Φάσης** των οποίων η συγκέντρωση ελαττώνεται τουλάχιστον κατά 25% κατά την οξεία φάση, στις ομάδες αυτές ανήκουν πρωτεΐνες όπως η λευκωματίνη, η τρανσφερίνη και ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας (IGF) [13].

Η CRP συντίθεται κυρίως από τα ηπατοκύτταρα, ενώ άλλα κύτταρα όπως τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα μπορούν επίσης να παράγουν μικρές ποσότητες. Η πρόκληση οξέος τραυματισμού των ιστών, λοιμώξεις και φλεγμονές μπορούν να προκαλέσουν αύξηση των επιπέδων της CRP στον ορό μέχρι και 1.000 φορές σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα, που όμως ελαττώνονται γρήγορα με την υποχώρηση της φλεγμονής ή την επούλωση του τραύματος [14].



Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση δράσης της CRP στον οργανισμό

Η CRP εμπλέκεται στην οψωνοποίηση, στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος, στην στρατολόγηση και προσκόλληση των λευκοκυττάρων, στην έκκριση κυτοκινών και στην απόπτωση. Η δράση της CRP εκδηλώνεται μέσω της σύνδεσης της με μόρια φωσφατιδυλοχολίνης των λιποσακχαριτών του τοιχώματος των βακτηρίων ή των μυκήτων ή με μόρια φωσφατιδυλοχολίνης στην μεμβράνη νεκρών ή σε κατάσταση απόπτωσης κυττάρων. Το σύμπλεγμα CRP-φωσφατιδυλοχολίνης συνδέεται στην συνέχεια με τον παράγοντα C1q, το πρώτο στοιχείο της κλασικής οδού του συμπληρώματος, ενεργοποιώντας την αλληλουχία του συμπληρώματος οδηγώντας στην καταστροφή των κυττάρων-στόχων μέσω της παραγωγής του παράγοντα C5a που δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας για τα ουδετερόφιλα και του παράγοντα C3b που προάγει τη φαγοκυττάρωση [15, 16].

Αφετέρου, υπάρχουν ενδείξεις ότι η CRP ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση αντιδρώντας με τον παράγοντα Η (ρυθμιστής της πρωτεΐνης του συμπληρώματος). Το σύμπλεγμα CRP-παράγοντας Η ανταγωνίζεται τη δράση του C3b και εμποδίζει το σχηματισμό του μεμβρανοεπιθητικού συμπλέγματος C5-C9 [17]. Έτσι, η CRP διατηρεί μια ισορροπία στην περιοχή της φλεγμονής. Τα κύτταρα του ξενιστή προστατεύονται από τη σύνδεση με την CRP αφού η φωσφατιδυλοχολίνη έχει διαφορετική μορφή στις μεμβράνες των θηλαστικών. Η CRP συνδέεται στα μονοκύτταρα σε υποδοχείς υψηλής (CD32) και χαμηλής συγγένειας (CD64) προκαλώντας έκκριση κυτοκινών και αύξηση της φαγοκυττάρωσης [18]. Επίσης, έχει προταθεί ότι η CRP διεγείρει την έκκριση της IL-1, της IL-2, της IL-6, της IL-8, του TNF-α, του PAF, και της MCP-1. Ακόμη, η CRP επάγει την παραγωγή ROS, του αναστολέα του πλασμινογόνου (PAI-1) και του ιστικού παράγοντα (TF) και την έκφραση των ICAM-1, VCAM-1 και ELAM-1 [19]. Η δυνατότητα της CRP να διεγείρει την έκκριση κυτοκινών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Γνωρίζοντας ότι οι κυτοκίνες, κυρίως η IL-6, αλλά και η IL-1 με τον TNF-α, διεγείρουν την παραγωγή της CRP, μπορούμε να συμπεράνουμε την ύπαρξη ενός μηχανισμού θετικής ανάδρασης μεταξύ επαγωγής της CRP και ενίσχυσης της φλεγμονώδους αντίδρασης. Σχετικά με τις προφλεγμονώδεις επιδράσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως του VCAM-1,

του ICAM-1, της E-σελεκτίνης και η παραγωγή της IL-8 και της MCP-1 προάγουν τη στρατολόγηση και προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο [20].

1.3.3 Κλινικές εφαρμογές της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης

Ο προσδιορισμός της CRP στον ορό του αίματος χρησιμοποιείται ευρέως για την διάγνωση μολυσματικών και φλεγμονωδών καταστάσεων, λόγω του ότι σε αυτές τις καταστάσεις η συγκέντρωση της στον ορό του αίματος αυξάνεται γρήγορα και παραμένει σταθερή χωρίς να υπόκειται σε ημερήσια ή εποχιακή διακύμανση και εξαρτάται μόνο από τον ρυθμό παραγωγής της από το ήπαρ [21]. Επιπλέον, πολύ λίγα φάρμακα επηρεάζουν την συγκέντρωση της στον ορό, με εξαίρεση κάποια που επιδρούν στο βασικό μηχανισμό που οδηγεί στην παραγωγή της, ενώ η συγκέντρωση της να ελαττώνεται ταχέως όταν πάψει να υπάρχει η αιτία παραγωγής της. Λόγω των προαναφερθέντων χαρακτηριστικών της, η CRP είναι ένας από τους πιο χρήσιμους εργαστηριακούς δείκτες για τη διάγνωση της παρουσίας κάποιας φλεγμονής ή/και καταστροφής των ιστών και ως εκ τούτου χρησιμοποιείται ως διαγνωστικό εργαλείο στις ακόλουθες περιπτώσεις:

- α) στον γενικό έλεγχο για την παρουσία νόσου,
- β) στην παρακολούθηση της απόκρισης στη θεραπεία φλεγμονωδών νοσημάτων, όπως οι φλεγμονώδεις πολυαρθρίτιδες, οι αγγειίτιδες, η νόσος του Crohn, ο ρευματικός πυρετός, κ.α.,
- γ) στην διάγνωση νεοπλασιών αν και η αύξηση των συγκεντρώσεων της στον ορό σε αυτή την περίπτωση δεν είναι τόσο μεγάλη όσο σε άλλες παθολογικές καταστάσεις, και
- δ) στην πρόγνωση καρδιαγγειακών νόσων.

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι ασθενείς με αυξημένα επί μακρό χρονικό διάστημα επίπεδα CRP στον ορό έχουν αυξημένες πιθανότητες να παρουσιάσουν σε κάποια φάση της ζωής τους διαβήτη, υπέρταση ή/και καρδιαγγειακές νόσους.

Βάσει αυτών των ευρημάτων, τα τελευταία χρόνια πληθαίνουν οι μελέτες που δείχνουν ότι η CRP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την πρόβλεψη καρδιαγγειακής νόσου. Επίσης τα ευρήματα αυτά, οδήγησαν την American Heart Association σε συνεργασία με τα U.S. Centers for Disease Control and Prevention να καθορίσουν τρία επίπεδα κινδύνου εκδήλωσης καρδιαγγειακής νόσου με βάση την συγκέντρωση της CRP στον ορό, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 [22, 23].

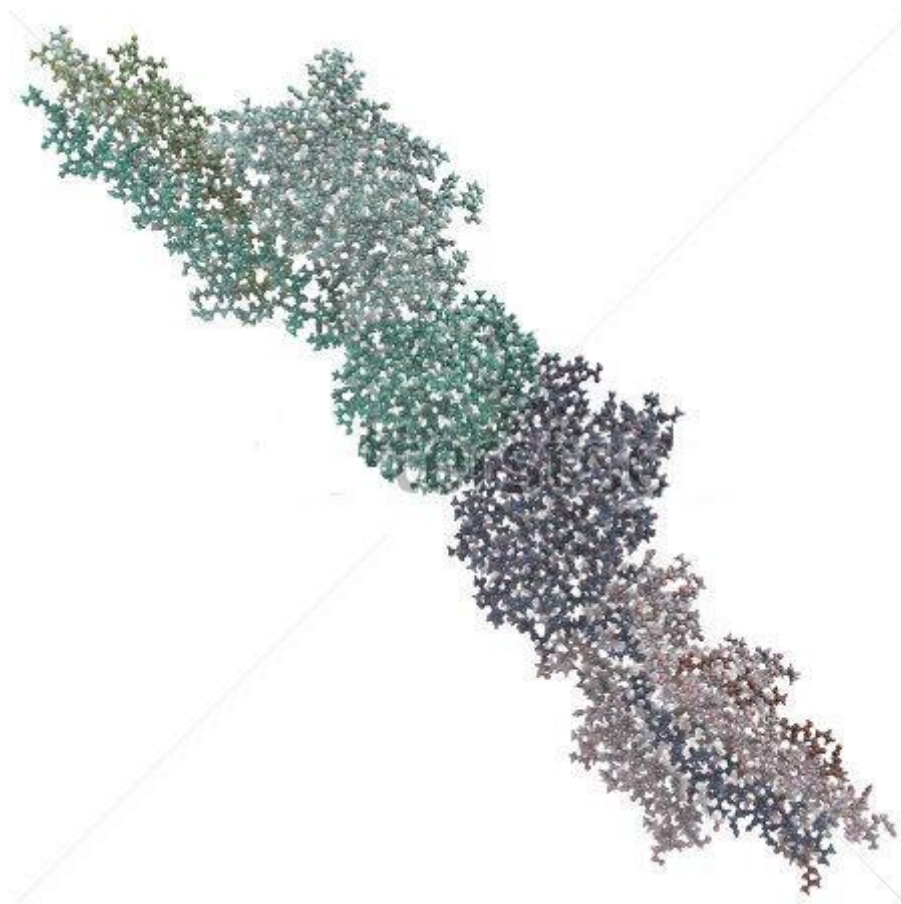
Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις CRP και επίπεδα κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου

Επίπεδο κινδύνου	Συγκέντρωση CRP
Χαμηλό	<1000 ng/mL
Μεσαίο	1000-3000 ng/mL
Υψηλό	>3000 ng/mL

1.4 D-διμερή (D-dimers)

1.4.1 Ιστορική αναδρομή και δομή των D-διμερών

Τα D-διμερή (D-dimers) είναι πρωτεϊνικά μόρια που δημιουργούνται κατά την αποδόμηση των μορίων του ινώδους. Περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1970 από τον P.J.Gaffney ως προϊόντα της αποδόμησης θρόμβων, αλλά άρχισαν να χρησιμοποιούνται ως δείκτες για διαγνωστικούς σκοπούς μετά την δεκαετία του 90 [24, 25]. Το μόριο των D-διμερών αποτελείται από δύο μονομερή καθένα από τα οποία αποτελείται από τρεις πεπτιδικές αλυσίδες: η πρώτη αλυσίδα (αλυσίδα α) αποτελείται από 111 έως 197 αμινοξέα, η δεύτερη (αλυσίδα β) από 134-461, και η τρίτη (αλυσίδα γ) από 88 έως 406. Η τριτοταγής δομή κάθε μονομερούς επιτυγχάνεται με δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των τριών αλυσίδων και η διμερής δομή με δυο ισοπεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ των καρβοξυ-τελικών άκρων των γ αλυσίδων, και το συνολικό μοριακό βάρος είναι περίπου 200 kDa.



Εικόνα 1: Τριτοταγής δομή του D-διμερούς (D-dimers) [26]

1.4.2 Βιοχημικός ρόλος των D-διμερών

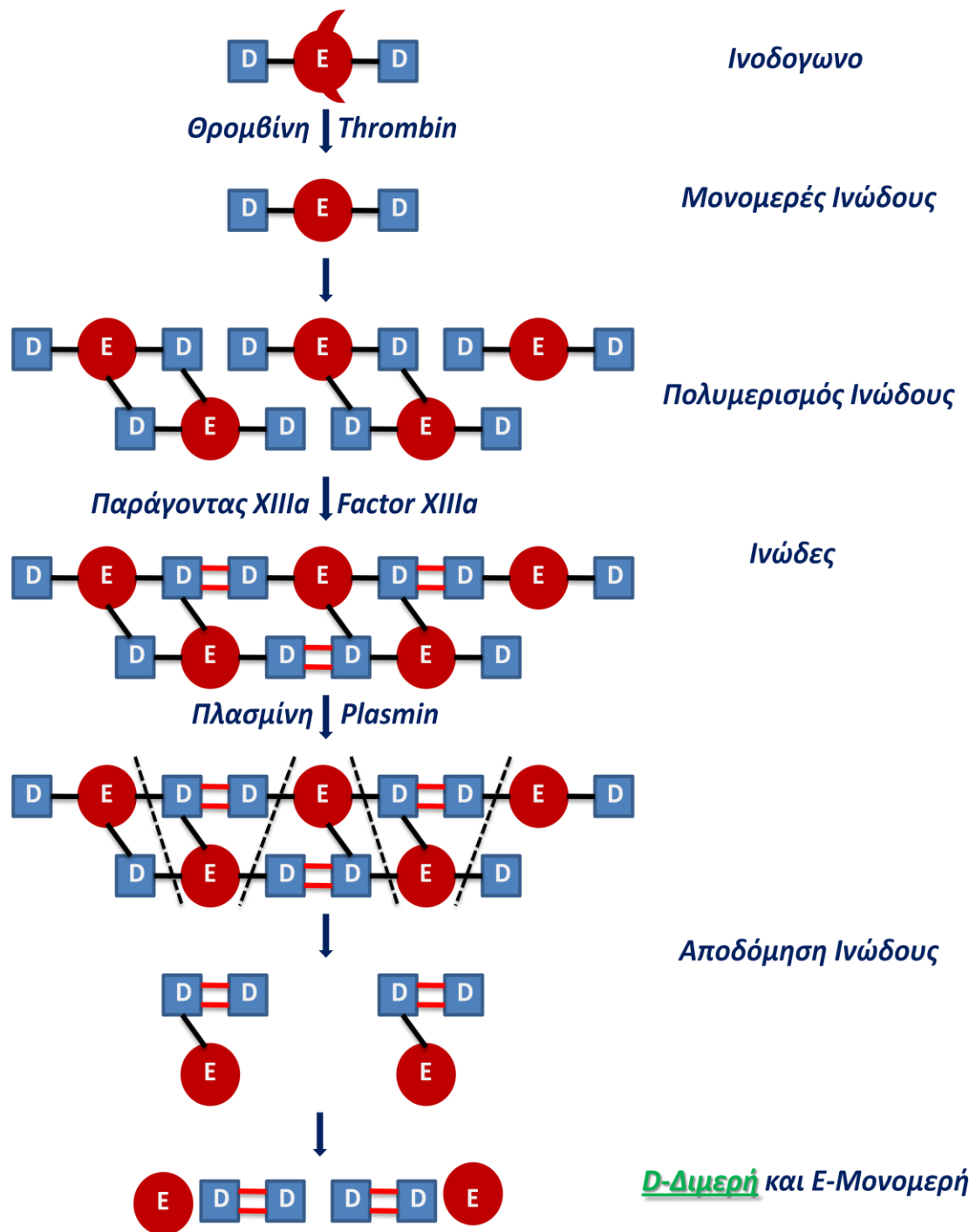
Όταν υποστεί βλάβη ένα αγγείο ενεργοποιείται ο μηχανισμός της πήξης του αίματος με αποτέλεσμα τη δημιουργία θρόμβου στην περιοχή της βλάβης, που οδηγεί στη μερική ή ολική απόφραξη του αγγείου. Το ινώδες δημιουργείται μετά από δράση της θρομβίνης επί του ινωδογόνου όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 5. Η διαδικασία της πήξης ξεκινά με την διάσπαση των μορίων του ινωδογόνου από την θρομβίνη με αποτέλεσμα την δημιουργία των μονομερών του ινώδους, τα οποία αποτελούνται από δυο δομικές μονάδες D και E. Συγκεκριμένα, κάθε μονομερές ινώδους αποτελείται από δύο μονάδες D και μια μονάδα E. Τα μονομερή αυτά στην συνέχεια πολυμερίζονται με δημιουργία διαμοριακών ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των τμημάτων D και E σχηματίζοντας τα πρωτοϊνίδια. Ακολούθως, με την δράση του παράγοντα XIIIa δημιουργούνται επιπλέον διαμοριακοί

ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των τμημάτων D διαφορετικών πρωτοϊνιδίων σχηματίζοντας τα μόρια του ινώδους.

Παράλληλα με τη δημιουργία του θρόμβου δραστηριοποιείται το ινωδολυτικό σύστημα, που έχει σκοπό τη λύση του θρόμβου και την αποκατάσταση της κυκλοφορίας στο αγγείο. Βασικό ρόλο στην ινωδόλυση παίζει μια β_2 -σφαιρίνη του αίματος, το πλασμινογόνο, η οποία παράγεται στο ήπαρ και κυκλοφορεί στο αίμα ως σύμπλοκο με το ινωδογόνο, γεγονός που ερμηνεύει και την παρουσία της πρωτεΐνης αυτής στο εσωτερικό του θρόμβου. Για να ενεργοποιηθεί όμως το πλασμινογόνο απαιτείται η παρέμβαση άλλων ουσιών, οι οποίες ονομάζονται ενεργοποιητές του πλασμινογόνου και προκαλούν την διάσπαση του πλασμινογόνου και την απελευθέρωση του πρωτεολυτικού ενζύμου, της πλασμίνης. Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου είναι:

- Ο ιστικός ενεργοποιητής (tPA), μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων.
- Η ουροκινάση (uPA), ένα πολυπεπτίδιο που παράγεται στα νεφρικά κύτταρα.
- Βακτηριακοί ενεργοποιητές με κύριο εκπρόσωπο τη στρεπτοκινάση που είναι πολυπεπτίδιο το οποίο παράγεται από β -αιμολυτικούς στρεπτοκόκκους.
- Ενεργοποιητές που βρίσκονται στο πλάσμα όπως το υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο (HMWK) και η καλλικρεΐνη που δρουν κυρίως μέσω της ενεργοποίησης της ουροκινάσης.

Όταν παραχθεί η πλασμίνη, δρα στο ινωδογόνο και το ινώδες τα οποία αποτελούν τα υποστρώματα δράσης της [27, 28]. Για την αποδόμηση του ινώδους, η πλασμίνη συνδέεται σε πολλαπλές θέσεις του μορίου και προκαλεί μια αρχική διάσπαση σε θραύσματα υψηλού μοριακού βάρους. Ακολουθεί περαιτέρω διάσπαση η οποία καταλήγει στα D-διμερή και E-μονομερή, τα οποία είναι και τα προϊόντα της αποικοδόμησης του ινώδους (Σχήμα 5) [29, 30].



Σχήμα 5: Πορεία σύνθεσης και αποδόμησης του ινώδους

1.4.3 Κλινικές εφαρμογές του προσδιορισμού των επιπέδων των D-διμερών

Ο προσδιορισμός των D-διμερών στο αίμα αποτελεί ένδειξη παρουσίας περίσσειας θρομβίνης (ενδοαγγειακή πήξη) που προέρχεται από αυξημένη

ινωδόλυση η οποία με τη σειρά της οφείλεται στη δράση της πλασμίνης. Έτσι, η παρουσία αυξημένων επιπέδων D-διμερών στην κυκλοφορία του αίματος είναι ένδειξη της διάσπασης θρόμβων που σχηματίστηκαν στην διάρκεια ενός επεισοδίου θρόμβωσης ή αιμορραγίας καθώς και λύσης του ινώδους που έχει παραχθεί κατά την ενδαγγειακή πήξη. Επιπλέον, η απουσία D-διμερών από την κυκλοφορία του αίματος αποκλείει τη περίπτωση φλεβικής θρόμβωσης ή πνευμονικής εμβολής. Τα D-διμερή χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικό εργαλείο στις ακόλουθες παθολογικές καταστάσεις [31, 32, 33, 34]:

- α) στο σύνδρομο διάχυτης ενδαγγειακής πήξης (σηψαιμία, βαριά λοίμωξη)
- β) στην πνευμονική εμβολή
- γ) σε περιπτώσεις εκτεταμένου εγκαύματος
- δ) μετά από χειρουργικές επεμβάσεις
- ε) παρουσία μεγάλης έκτασης αιματώματος, διαχωρισμός αορτικού τοιχώματος, ανεύρυσμα αορτής και έντονη αιμόλυση
- η) σε καρκίνους διαφόρων οργάνων καθώς και αιματολογικές κακοήθειες
- θ) σε περιπτώσεις πνευμονίας και σαρκοείδωσης
- ι) κατά την χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ή κίρρωση ήπατος
- ια) στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης σε θρομβολυτική αγωγή
- ιβ) σε περιπτώσεις θρομβοπενίας από χορήγηση ηπαρίνης (HIT-II)
- ιγ) στις στεφανιαίες νόσους και κατά την φλεβική ή αρτηριακή θρόμβωση

Τα τελευταία χρόνια πληθαίνουν οι μελέτες που υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα των D-διμερών στο αίμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης για την διάγνωση αρτηριακή θρόμβωσης καθώς και για την πρόγνωση καρδιαγγειακής νόσου σε συνδυασμό φυσικά με την γενικότερη εικόνα του ασθενούς. Συγκεκριμένα αν η προσδιοριζόμενη συγκέντρωση των D-διμερών στον ορό του αίματος είναι μεγαλύτερη από 0,5 $\mu\text{g/mL}$ υπάρχει αυξημένη πιθανότητα ύπαρξης θρόμβωσης και κίνδυνο για θρομβοτικό επεισόδιο ενώ εξαιρετικά σημαντική είναι και η αρνητική προγνωστική αξία του προσδιορισμού αφού συγκεντρώσεις D-διμερών μικρότερες από 0,5 $\mu\text{g/mL}$

αντιστοιχούν σε σχεδόν μηδενική πιθανότητα παρουσίας θρόμβου και επομένως σε μειωμένο κίνδυνο αρτηριακής θρόμβωσης [35, 36].

1.5 Χρησιμότητα της ταυτόχρονης ανίχνευσης της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και των D-διμερών για την διάγνωση ασθενειών

Όπως προκύπτει από τα προηγούμενα εδάφια, ο προσδιορισμός της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και των D-διμερών είναι πολύ σημαντικός για την διάγνωση ή/και την πρόγνωση κάποιων παθολογικών καταστάσεων, κυρίως περιπτώσεις φλεγμονών και λοιμώξεων, όπου ο προσδιορισμός και η κλινική αξιολόγηση των επιπέδων των δύο αυτών ουσιών μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την κατάσταση του ασθενούς και να βοηθήσει στην αποτελεσματική αντιμετώπιση της ασθένειας.

Τα τελευταία χρόνια πληθαίνουν οι μελέτες που προτείνουν την χρήση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και των D-διμερών ως δεικτών για τις καρδιαγγειακές νόσους και τις αρτηριακές θρομβώσεις καθώς υπάρχει στατιστικά υψηλή συσχέτιση μεταξύ της αύξησης των επιπέδων της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και των D-διμερών στην κυκλοφορία του αίματος με την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου [37]. Επιπροσθέτως, αύξηση των επιπέδων αυτών των δεικτών παρουσιάζεται συχνότερα σε άτομα που είναι καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές καθώς και σε άτομα με υπέρταση. Επιπλέον μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση της αύξησης της συγκέντρωσης της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και των D-διμερών στο αίμα καθώς και των περιφερικών αρτηριακών ασθενειών με την άθληση [38]. Επομένως είναι προφανές ότι σε αρκετές περιπτώσεις απαιτείται προσδιορισμός των επιπέδων της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και των D-διμερών σε δείγματα ορού ατόμων για τα οποία υπάρχει μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου με βάση το ιατρικό τους ιστορικό, τους κληρονομικούς παράγοντες και το ηλεκτροκαρδιογράφημα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ

2.1 Εισαγωγή στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς

Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί είναι αναλυτικές μέθοδοι που βασίζονται σε αντισώματα ή συναφή αντιδραστήρια για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών σε βιολογικά ή άλλα δείγματα. Τα αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες ανήκουν στην τάξη των γ-σφαιρινών και ως εκ τούτου ονομάζονται και ανοσοσφαιρίνες. Παράγονται από τα β-λεμφοκύτταρα και εκκρίνονται στο αίμα ως μέρος της ανοσολογικής απόκρισης ενός οργανισμού στην παρουσία ενός ξένου παράγοντα, του ανοσοογόνου.

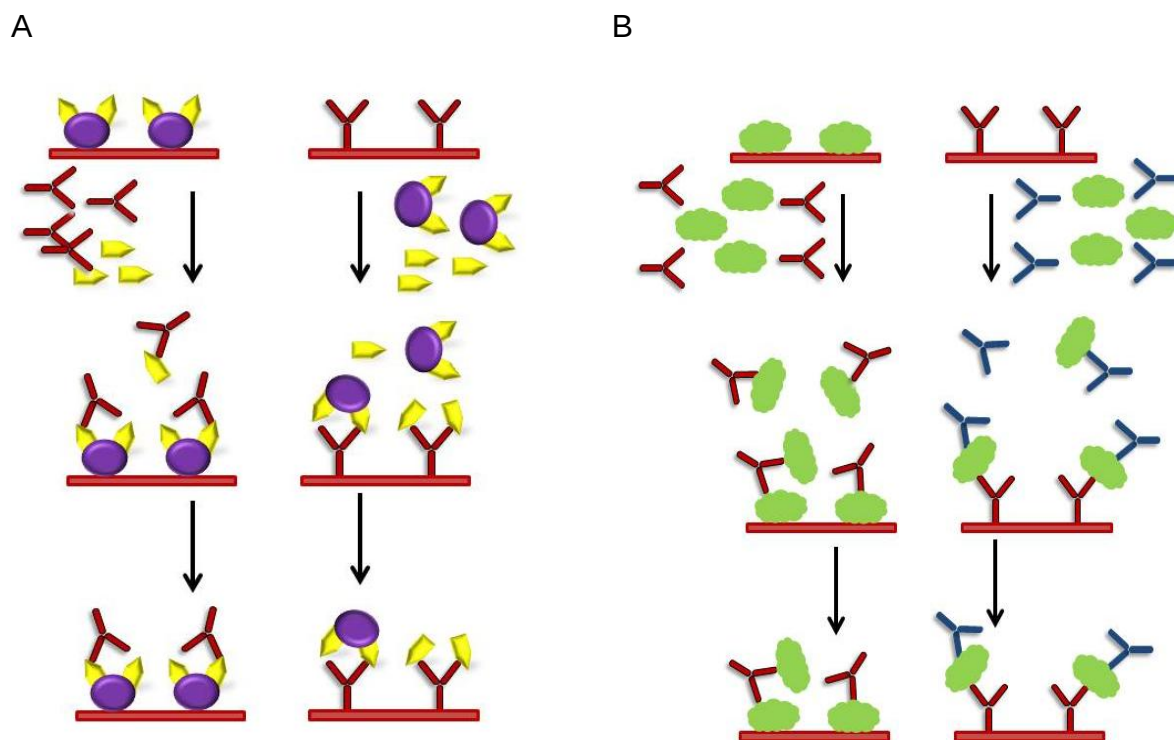
Τα ανοσογόνα είναι ουσίες οι οποίες όταν εισέλθουν στον οργανισμό προκαλούν τη παραγωγή των αντισωμάτων και αντιδρούν ειδικά με αυτά. Ουσίες που μπορούν να συνδεθούν με αντισώματα αλλά δεν προκαλούν κατά ανάγκη και ανοσολογική απόκριση ονομάζονται αντιγόνα. Η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος είναι πολύ ισχυρή καθώς οφείλεται στη συνεργική δράση μεγάλου αριθμού μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (δυνάμεις Coulomb, δεσμοί υδρογόνου, δυνάμεις Van der Waals) ενώ εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση καθώς για κάθε αντιγόνο μπορεί να παραχθεί ένα διαφορετικό ειδικό αντίσωμα [39].

Η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος αξιοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1958 από τους Yalow και Berson οι οποίοι παρουσίασαν έναν μια ανοσοχημική μέθοδο για τον προσδιορισμό της ινσουλίνης σε πλάσμα αίματος [40]. Η καινοτομία αυτή υιοθετήθηκε ευρέως για την ανάπτυξη ανοσοπροσδιορισμών ανταγωνιστικού τύπου, οι οποίοι βασίζονται στον έμμεσο προσδιορισμό των θέσεων δέσμευσης του αντισώματος που κατέλαβε ο αναλύτης (αντιγόνο) μετρώντας τις θέσεις δέσμευσης που καταλήφθηκαν από τον ιχνηθέτη [41]. Οι ιχνηθέτες είναι ανάλογα του αναλύτη σημασμένα με ραδιοϊσότοπα, ένζυμα, φθορίζοντα, ηλεκτρενεργά, χημειοφωταυγή ή βιοφωταυγή μόρια [42, 43].

Οι Catt και Tregear εισήγαγαν το 1967 τις τεχνικές διαχωρισμού στερεάς φάσης βάσει των οποίων το αντιγόνο ή το αντίσωμα προσδένεται πάνω σε στερεό φορέα με αποτέλεσμα τα ανοσοσυμπλέγματα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού να είναι συνεχώς ακινητοποιημένα στην

επιφάνεια του φορέα και να διαχωρίζονται εύκολα από τις ελεύθερες μορφές των αντιδραστηρίων οι οποίες παραμένουν στο διάλυμα [44]. Η εξέλιξη αυτή έδωσε ώθηση στις ανοσοχημικές τεχνικές καθώς μπορούσαν πλέον να εφαρμοστούν για οποιοδήποτε ζεύγος αντιγόνου-αντισώματος, εμφάνισαν χαμηλότερη μη ειδική δέσμευση, απλοποιημένες διαδικασίες διαχωρισμού, αυξημένες δυνατότητες αυτοματοποίησης και αναπτύχθηκαν νέοι τύποι ανοσοπροσδιορισμών όπως οι μη-ανταγωνιστικού τύπου [45]. Οι βασικές διαμορφώσεις ανοσοπροσδιορισμών στερεάς φάσης τόσο ανταγωνιστικού όσο και μη ανταγωνιστικού τύπου παρουσιάζονται σχηματικά στο Σχήμα 6. Στους μη ανταγωνιστικούς ανοσοπροσδιορισμούς χρησιμοποιείται ένα αντίσωμα ακινητοποίησης και ένα αντίσωμα ανίχνευσης (ιχνηθέτης) τα οποία αναγνωρίζουν και συνδέονται σε διαφορετικούς επιτόπους του αναλύτη. Ο αναλύτης προσδένεται στο αντίσωμα δέσμευσης και ταυτόχρονα ή σε επόμενο στάδιο προστίθεται το αντίσωμα ανίχνευσης, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί ένα σύμπλεγμα τύπου “sandwich”. Ο άμεσος αυτός προσδιορισμός είναι κατάλληλος κυρίως για μεγάλου μοριακού βάρους αναλύτες που μπορεί να έχουν τουλάχιστον δύο διαφορετικούς επίτοπους ενώ οδηγεί σε μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης σε σχέση με τον ανταγωνιστικό όταν όλοι οι εμπλεκόμενοι παράγοντες (αντίσωμα, μόριο σήμανσης, κ.α.) είναι οι ίδιοι και στους δύο τύπους ανοσοπροσδιορισμού.

Τα πλεονεκτήματα που εμφανίζουν οι ανοσοπροσδιορισμοί σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές είναι η εξαιρετική ευαισθησία και εξειδίκευση οι οποίες εκπορεύονται από την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος [46]. Τα χαρακτηριστικά αυτά έχουν μεγάλη σημασία στην ανάλυση βιολογικών υγρών (ορός, πλάσμα, ούρα, κ.α.) λόγω της πολυπλοκότητας και της περιορισμένης ποσότητας των δειγμάτων ή της μικρής συγκέντρωσης (ppm ή ppb) των προσδιοριζόμενων ουσιών και στάθηκαν ικανά να καθιερώσουν τους ανοσοπροσδιορισμούς ως μεθόδους επιλογής τόσο στον τομέα των Βιοϊατρικών επιστημών αλλά και σε τομείς όπως το περιβάλλον, τα τρόφιμα, η γεωργία και ο αθλητισμός [39].

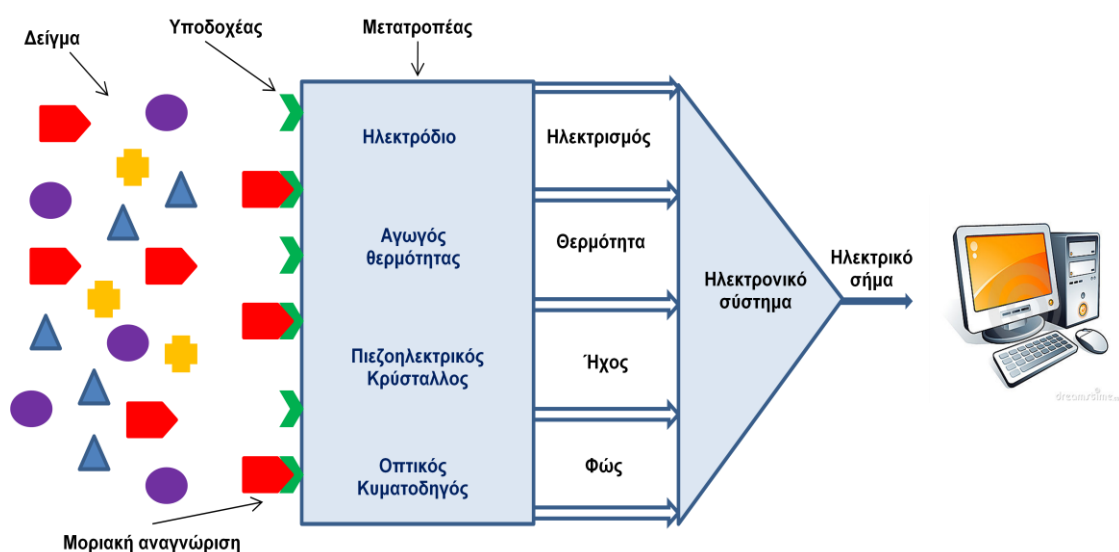


Σχήμα 6: Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών διαμορφώσεων ανοσοχημικών προσδιορισμών στερεάς φάσης (Α) ανταγωνιστικού και (Β) μη ανταγωνιστικού τύπου

2.2 Εισαγωγή στους βιοαισθητήρες

Οι εξελίξεις στο τομέα της βιοαναλυτικής χημείας σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της μικροηλεκτρονικής τεχνολογίας οδήγησαν στη δημιουργία μίας αυξανόμενης τάσης για τη μεταφορά των κλασικών αναλυτικών τεχνικών και των ανοσοπροσδιορισμών από τον πάγκο του εργαστηρίου σε φορητές συσκευές ή μικροδιατάξεις όπως οι βιοαισθητήρες. Οι βιοαισθητήρες εκπροσωπούν μία κατηγορία χημικών αισθητήρων ικανών να μετατρέπουν μια βιολογική απόκριση σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα [47]. Ο όρος βιοαισθητήρας άρχισε να εμφανίζεται στη διεθνή βιβλιογραφία από τα τέλη της δεκαετίας του 70, όμως ο πρώτος βιοαισθητήρας, γνωστός ως ενζυμικό ηλεκτρόδιο αναφέρθηκε το 1962 [48]. Το 2001 δόθηκε από την IUPAC [68] ο ακριβής ορισμός του όρου «βιοαισθητήρας» ως η ανεξάρτητη ολοκληρωμένη συσκευή η οποία είναι ικανή να παρέχει συγκεκριμένη ποσοτική ή ημιποσοτική αναλυτική πληροφορία χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης (βιοχημικός υποδοχέας) το οποίο βρίσκεται σε άμεση επαφή με

ένα φυσικοχημικό στοιχείο μετατροπής του σήματος (μεταλλάκτης). Το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης είναι ακινητοποιημένο σε ένα στερεό φορέα με τον οποίον αποτελούν τη βιοδραστική επιφάνεια του αισθητήρα και είναι ικανό να αναγνωρίζει τη παρουσία, τη δραστικότητα ή τη συγκέντρωση ενός συγκεκριμένου αναλύτη σε δείγμα. Η αναγνώριση λαμβάνει χώρα μέσω βιοκαταλυτικής ή αλληλεπίδρασης συγγενείας μεταξύ του βιολογικού στοιχείου και του αναλύτη αποτέλεσμα της οποίας είναι η μεταβολή κάποιας φυσικής ή χημικής ιδιότητας του δείγματος. Ο μετατροπέας σήματος που βρίσκεται σε επαφή με τη βιοδραστική επιφάνεια ή ένα τμήμα της επιφάνειας του οποίου έχει χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης μετατρέπει τη φυσικοχημική μεταβολή, η οποία πραγματοποιείται σε μοριακό επίπεδο, σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα με την παρεμβολή κατάλληλου ηλεκτρονικού συστήματος (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Αναπαράσταση του τρόπου λειτουργίας των βιοαισθητήρων.

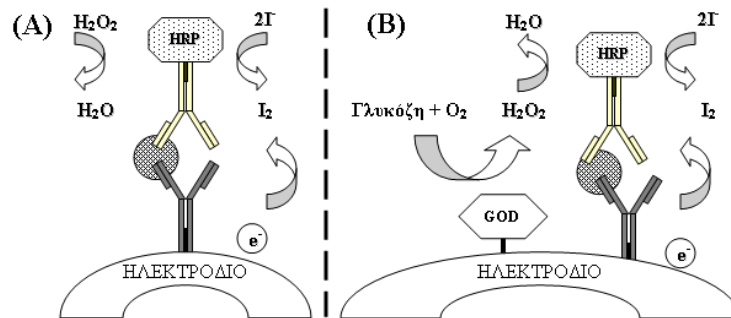
Ανάλογα με τη φυσικοχημική παράμετρο που μεταβάλλεται (μάζα, φως, θερμότητα, ηλεκτρισμός), ο μετατροπέας σήματος μπορεί να είναι πιεζοηλεκτρικός κρύσταλλος (μικροζυγός), οπτικός κυματοδηγός, αγωγός θερμότητας ή ηλεκτρόδιο αντίστοιχα. Ενώ, το ηλεκτρονικό σύστημα του βιοαισθητήρα περιλαμβάνει εκτός από κατάλληλο ανιχνευτή (ηχητικών κυμάτων, φωτοπολλαπλασιαστή ή φωτοδίοδο, θερμότητας ή ηλεκτρικού

σήματος), ενισχυτή, επεξεργαστή και καταγραφέα σήματος [47]. Ένας λειτουργικός βιοαισθητήρας πρέπει να χαρακτηρίζεται από ευαισθησία ανίχνευσης, αξιοπιστία, ειδικότητα, μεγάλο δυναμικό εύρος και ταχεία απόκριση. Επίσης η απόκριση του βιοαισθητήρα δεν πρέπει να επηρεάζεται από ηλεκτρικές ή περιβαλλοντικές παρεμβολές, να έχει μεγάλη διάρκεια ζωής, μικρό κόστος και δυνατότητες συνεχούς λειτουργίας και επαναχρησιμοποίησης [49, 50]. Ακολουθεί μια σύντομη περιγραφή των κυριότερων κατηγοριών βιοαισθητήρων.

2.3 Είδη βιοαισθητήρων

2.3.1 Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες

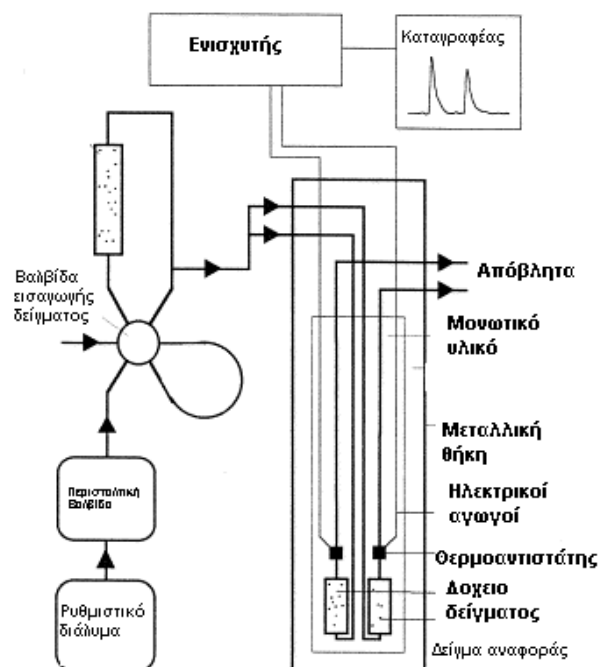
Η λειτουργία τους βασίζεται στην μέτρηση ενός ηλεκτρικού μεγέθους (δυναμικό, ένταση ρεύματος, φορτίο). Συνήθως το βιομόριο αναγνώρισης είναι ένα ενζυμο ή ένα αντίσωμα και ο μεταλλάκτης ένα ηλεκτρόδιο ή μία ηλεκτροχημική διάταξη. Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες είναι η πιο πολυπληθής ομάδα αισθητήρων, και μεταξύ αυτών οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι είναι οι αμπερομετρικοί και οι ποτενσιομετρικοί. Οι αμπερομετρικοί ανοσοαισθητήρες βασίζονται στη μέτρηση της έντασης του ρεύματος που παράγεται κατά την ηλεκτροχημική οξειδωση ή αναγωγή του ηλεκτρενεργού υποστρώματος ενός ενζυμικού ιχνηθέτη που συνήθως χρησιμοποιείται ως βιομόριο αναγνώρισης [51]. Οι ποτενσιομετρικοί βασίζονται στη μέτρηση της μεταβολής του δυναμικού ως αποτέλεσμα της ενζυμικής αντίδρασης [52, 53]. Ο διασημότερος ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας είναι ο ενζυμικός αισθητήρας γλυκόζης με τον οποίο προσδιορίζεται με σχετική ακρίβεια η ποσότητα της γλυκόζης στο αίμα χρησιμοποιώντας μόνο μια μικρή ποσότητα ολικού αίματος (Σχήμα 8).



Σχήμα 8: Μέτρηση της γλυκόζης στο αίμα με την χρήση ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα.

2.3.2 Θερμικοί βιοαισθητήρες

Η λειτουργία των θερμικών ή θερμομετρικών βιοαισθητήρων βασίζεται στην μέτρηση της μεταβολής της θερμοκρασίας, η οποία προέρχεται από την θερμότητα που εκλύεται ή απορροφάται κατά την σύνδεση του αναλύτη στο ακινητοποιημένο στην επιφάνεια του αισθητήρα βιομόριο αναγνώρισης (Σχήμα 9). Συνήθως προσδιορίζονται οι μεταβολές της θερμοκρασίας του κυκλοφορούντος ρευστού μετά την αντίδραση ενός κατάλληλου υποστρώματος (αντιγόνου) με το ακινητοποιημένο βιομόριο αναγνώρισης (αντίσωμα) [54].



Σχήμα 9: Απεικόνιση τυπικού θερμικού βιοαισθητήρα

2.3.3 Ακουστικοί βιοαισθητήρες

Οι ακουστικοί ή πιεζοηλεκτρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην ανίχνευση μεταβολών στην πυκνότητα της μάζας μέσω των μεταβολών στις ελαστικές, ηλεκτρικές ή διηλεκτρικές ιδιότητες μιας μεμβράνης που βρίσκεται σε επαφή με ένα πιεζοηλεκτρικό υλικό. Συνήθως οι μεταλλάκτες που χρησιμοποιούνται βασίζονται στη διάδοση μαζικού ακουστικού κύματος (BAW) ή επιφανειακού ακουστικού κύματος (SAW). Στους πρώτους, ένας κρυσταλλικός συντονιστής, συνήθως από χαλαζία, συνδέεται με έναν ενισχυτή για το σχηματισμό ενός ταλαντωτή, του οποίου η συχνότητα συντονισμού είναι συνάρτηση των ιδιοτήτων δύο μεμβρανών που προσαρτώνται σ' αυτόν. Οι δεύτεροι βασίζονται στη διάδοση ενός SAW κατά μήκος ενός υποστρώματος που καλύπτεται από μεμβράνη, του οποίου οι ιδιότητες επηρεάζουν τις απώλειες κατά τη διάδοση καθώς και τη ταχύτητα μετάδοσης του κύματος. Τα επιφανειακά ακουστικά κύματα παράγονται και μετρώνται από μεταλλικούς διαψηφιακούς μετατροπείς που τοποθετούνται πάνω στο πιεζοηλεκτρικό υπόστρωμα [55, 56] (Σχήμα 10).



Σχήμα 10: Ακουστικός βιοαισθητήρας συνεχούς ροής

2.3.4 Οπτικοί βιοαισθητήρες

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην ανίχνευση μεταβολών στην ένταση της ακτινοβολίας που ανακλάται, διαθλάται, διασπείρεται, σκεδάζεται, ή εκπέμπεται κατά την αλληλεπίδραση της με την βιοδραστική επιφάνεια. Πιο συγκεκριμένα, οι οπτικοί ανοσοαισθητήρες ανιχνεύουν την πρόσδεση του αναλύτη στην ανοσοδραστική επιφάνεια μέσω της παρακολούθησης της μεταβολής ενός ή περισσοτέρων από τα βασικά χαρακτηριστικά της οπτικής

ακτινοβολίας (μέγεθος, φάση, συχνότητα ή κατάσταση πόλωσης) και συσχέτιση της μεταβολής με τη ποσότητά του αναλύτη στο δείγμα.

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες αποτελούν την πλέον διαδεδομένη κατηγορία βιοαισθητήρων καθώς παρέχουν ταχείες μετρήσεις, υψηλή ευαισθησία, μειωμένες παρεμποδίσεις από το δείγμα και αυξημένες δυνατότητες ταυτόχρονου προσδιορισμού μίγματος αναλυτών όπως και μετρήσεων σε πραγματικό χρόνο. Βασίζονται στη χρήση οπτικών κυματοδηγών με δείκτη διάθλασης (n_1) υψηλότερο από αυτόν του δείγματος (n_2) ως στερεών φορέων ανοσοαντίδρασης, κατάλληλων οπτικών πηγών και φωτοανιχνευτών. Μπορούν να καταταγούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το αν χρησιμοποιούνται ή όχι ιχνηθέτες: σε εκείνους που χρησιμοποιούν ιχνηθέτες κυρίως αισθητήρες φθορισμού (π.χ., φθορισμοανοσοαισθητήρες ολικής εσωτερικής ανάκλασης) και σε αυτούς που δεν βασίζονται στη χρήση ιχνηθετών. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης χωρίς την χρήση ιχνηθετών [57, 58]. Για τον λόγο αυτό ακολουθεί περιγραφή των κύριων κατηγοριών οπτικών αισθητήρων που δεν απαιτούν τη χρήση ιχνηθετών για την ανίχνευση των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων.

2.4 Οπτικοί βιοαισθητήρες χωρίς την χρήση ιχνηθετών

2.4.1 Εισαγωγή στους μη ιχνηθετημένους οπτικούς βιοαισθητήρες

Η απαίτηση για γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση ουσιών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας μεγάλης ποικιλίας οπτικών βιοαισθητήρων, οι οποίοι πλεονεκτούν έναντι αυτών που χρησιμοποιούν ιχνηθέτες στο ότι:

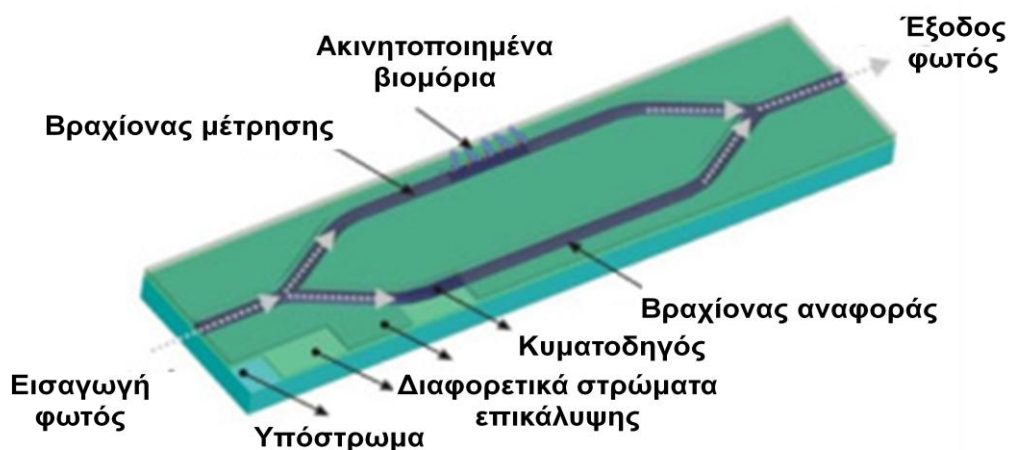
- ✓ Δεν χρειάζεται τροποποίηση των αντιδραστηρίων (αντίσωμα ή ανάλογο αντιγόνου)
- ✓ Υπάρχει δυνατότητα καταγραφής της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, παρέχοντας έτσι πληροφορίες για την κινητική της αντίδρασης
- ✓ Μειώνεται σημαντικά ο χρόνος και το κόστος της ανάλυσης

Ανάλογα με την αρχή στην οποία βασίζονται για την ανίχνευση, οι οπτικοί βιοαισθητήρες διακρίνονται σε:

- Συμβολομετρικούς (Mach-Zehnder, Young, Fabry-Perot, Hartma)
- Συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR)
- Φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός (RIF, WLRS)

2.4.2 Συμβολομετρικοί βιοαισθητήρες (Mach-Zehnder)

Οι βιοαισθητήρες Mach-Zehnder αποτελούν τον συνηθέστερα μελετώμενο τύπο συμβολομετρικού βιοαισθητήρα. Στους συμβολομετρικούς αισθητήρες η ανίχνευση βασίζεται στη μέτρηση της μεταβολής της φάσης (ϕ) μεταξύ δύο οπτικών κυμάτων που συμβάλλουν και η οποία εξαρτάται από το μήκος κύματος του κυματοδηγούμενου φωτός (λ), το μήκος της διαδρομής (L) και το δείκτη διάθλασης (n) του οπτικού κυματοδηγού συνήθως επίπεδης γεωμετρίας που χρησιμοποιείται ως μεταλλάκτης σήματος [59]. Τα περισσότερα συμβολόμετρα αποτελούνται από δύο ανεξάρτητους οπτικούς κυματοδηγούς οι οποίοι συμβάλλουν σε κάποιο σημείο της οπτικής διαδρομής στο οποίο καταγράφεται και το φάσμα συμβολής. Στο Σχήμα 11 παρουσιάζεται σχηματικά η αρχή λειτουργίας ενός συμβολομέτρου Mach-Zehnder. Στο συμβολόμετρο αυτό, ένας κυματοδηγός διαχωρίζεται σε δύο βραχίονες οι οποίοι στην συνέχεια ενώνονται σε έναν κοινό κυματοδηγό. Ο ένας βραχίονας τροποποιείται με το αντιδραστήριο αναγνώρισης και λειτουργεί ως στερεός φορέας ανοσοαντίδρασης με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται ο δείκτης διάθλασής του κατά τη πρόσδεση του αναλύτη (αισθητήριο βραχίονας) ενώ ο δεύτερος δεν είναι τροποποιημένος ή δεν έρχεται σε επαφή με το δείγμα και λειτουργεί ως βραχίονας αναφοράς. Το κυματοδηγούμενο φως διαχωρίζεται σε δύο δέσμες, από τις οποίες η μία αλληλεπιδρά με την ανοσοδραστική επιφάνεια του αισθητηρίου βραχίονα ενώ η άλλη με την επιφάνεια του βραχίονα αναφοράς. Στη συνέχεια οι δύο δέσμες συμβάλλουν, το εξερχόμενο φως συλλέγεται από κατάλληλο ανιχνευτή και προσδιορίζεται η μεταβολή της φάσης της δέσμης που αλληλεπιδράσε με την ανοσοδραστική επιφάνεια σε σχέση με τη δέσμη αναφοράς [60].

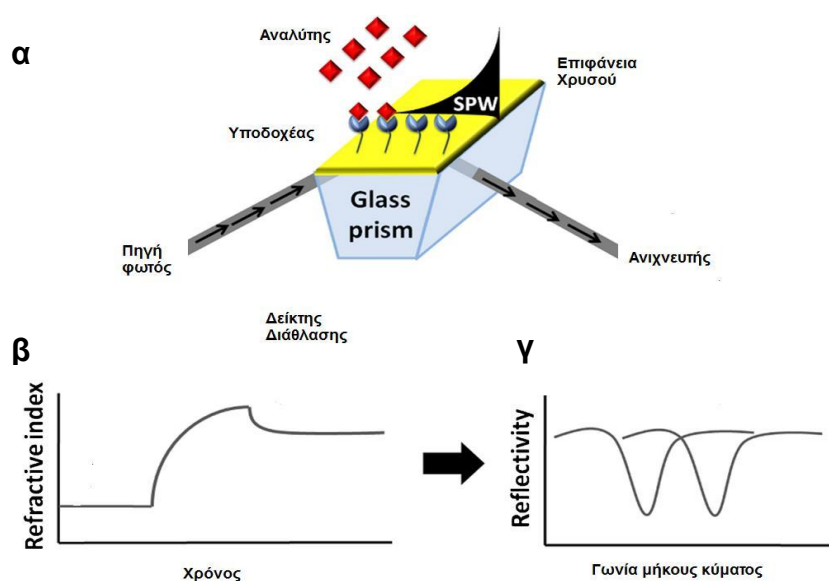


Σχήμα 11: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των βιοαισθητήρων Mach-Zehnder [61].

2.4.3 Βιοαισθητήρες συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR)

Οι βιοαισθητήρες SPR βασίζονται στο φαινόμενο του συντονισμού των επιφανειακών πλασμονίων. Τα επιφανειακά πλασμόνια είναι ηλεκτρόνια της στοιβάδας αγωγιμότητας μετάλλων που συμπεριφέρονται ως μια ενιαία οντότητα και διαμορφώνουν ένα κύμα ηλεκτρονικής πυκνότητας όταν διεγερθούν από εξωτερικά προσπίπτον φως. Το κύμα που δημιουργείται διαδίδεται κατά μήκος της επιφάνειας διηλεκτρικού/μετάλλου. Η σύζευξη του φωτός με τα πλασμόνια στο μέταλλο μπορεί να επιτευχθεί είτε με ολική εσωτερική ανάκλαση του φωτός μέσα από ένα πρίσμα [62] ή με περίθλαση σε ένα πλέγμα και κυματοδότηση. Ο συντονισμός οδηγεί σε μεταφορά ενέργειας από τα προσπίπτοντα φωτόνια με αποτέλεσμα τη δημιουργία κυμάτων πυκνότητας φορτίου. Συντονισμός με φωτόνια της περιοχής του ορατού φωτός μπορεί να επιτευχθεί για διάφορα μέταλλα όπως χρυσός, άργυρος και αλουμίνιο. Η διέγερση των πλασμονίων έχει ως αποτέλεσμα τη ταλάντωσή τους δημιουργώντας ένα κύμα το οποίο διαδίδεται κατά μήκος της μεσεπιφάνειας του μεταλλικό φιλμ και του διηλεκτρικό στρώματος, όπου έχουν ακινητοποιηθεί τα κατάλληλα βιοδραστικά μόρια [63]. Το κύμα των πλασμονίων δημιουργεί ένα φθίνον πεδίο το οποίο εκτείνεται στο διηλεκτρικό

υλικό και αλληλεπιδρά με τα ακινητοποιημένα βιομόρια. Η δέσμευση του αναλύτη στη βιοδραστική επιφάνεια μεταβάλλει τα χαρακτηριστικά του κύματος πλασμονίων όπως η γωνία πρόσπτωσης του φωτός για την επίτευξη συντονισμού ή το μήκος κύματος στο οποίο επιτυγχάνεται ο συντονισμός εξαιτίας της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διηλεκτρικού στρώματος. Η μεταβολή αυτή είναι απευθείας ανάλογη της ποσότητας του αναλύτη που προσδένεται στο ακινητοποιημένο βιομόριο αναγνώρισης, π.χ., αντίσωμα (Σχήμα 12).

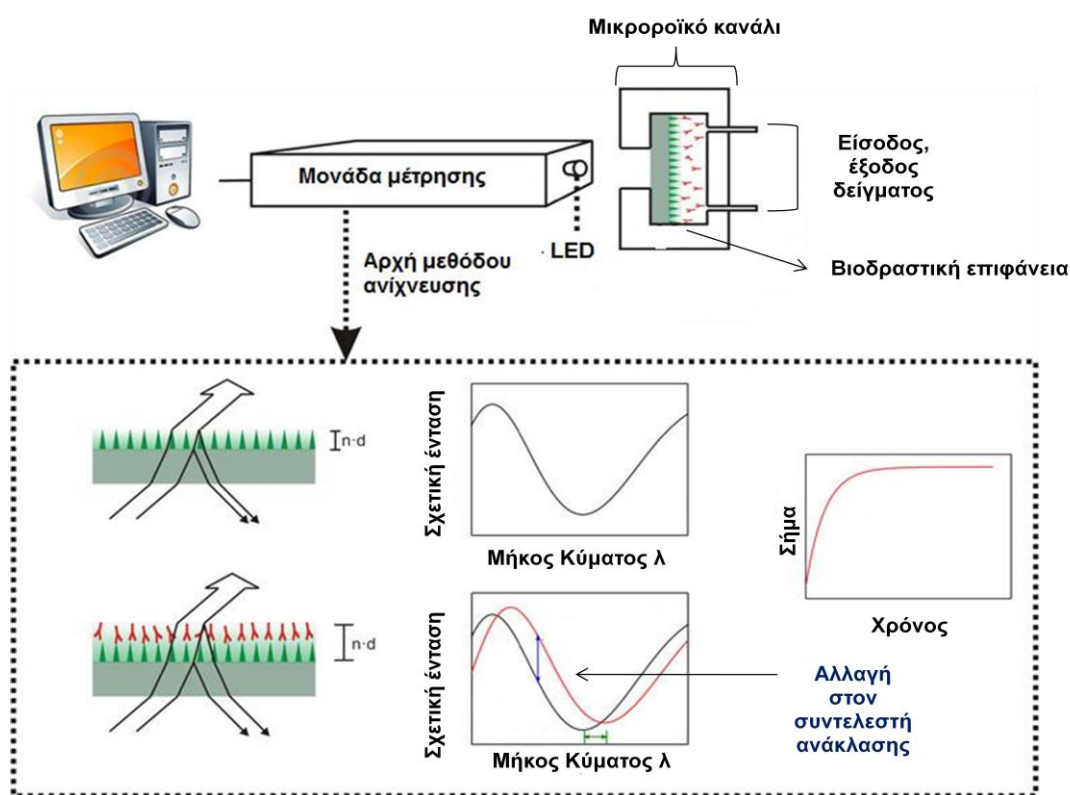


Σχήμα 12: α) Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των βιοαισθητήρων SPR, β) καταγραφή σήματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, γ) μετατόπιση του μήκους κύματος ως αποτέλεσμα της αντίδρασης [64].

2.4.4 Βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός (RIFS, Reflectometric InterFERENCE Spectroscopy)

Οι βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός βασίζονται στην παρακολούθηση της μετατόπισης των σημείων συμβολής δεσμών φωτός οι οποίες ανακλώνται σε διεπιφάνειες υλικών με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης. Μια τέτοια επιφάνεια μπορεί να δημιουργηθεί με την δημιουργία ενός λεπτού στρώματος διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) ή άλλου διαφανούς υλικού σε ένα απλό γυάλινο πλακίδιο μικροσκοπίου. Η δέσμη φωτός ανακλάται με διαφορετική γωνία σε κάθε διεπιφάνεια

(διάλυμα/βιομόριο, βιομόριο/διαφανές υλικό, διαφανές υλικό/γυάλινο πλακίδιο μικροσκοπίου) και επομένως οι ανακλώμενες δέσμες διασχίζουν διαφορετικούς οπτικούς δρόμους με αποτέλεσμα όταν συμβάλλουν να λαμβάνει χώρα καταστρεπτική ή ενισχυτική συμβολή και να δημιουργείται το φάσμα συμβολής. Η μορφή του φάσματος εξαρτάται από την γωνία πρόσπτωσης του φωτός, το μήκος κύματος, το πάχος του στρώματος του διαφανούς υλικού και τον δείκτη διάθλασης του [65, 66]. Όταν στην επιφάνεια του διαφανούς υλικού που έχει τροποποιηθεί με βιομόρια αναγνώρισης προσδεθούν τα προς ανάλυση μόρια, αλλάξει ο δείκτης διάθλασης με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του φάσματος συμβολής (Σχήμα 13). Οι βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός παρέχουν παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της πρόσδεσης του αναλύτη στο βιομόριο αναγνώρισης που έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια του αισθητήρα μέσω της καταγραφής του φαινόμενου πάχους του στρώματος που δημιουργείται στην διεπιφάνεια διάλυμα/διαφανές υλικό συναρτήσει του χρόνου.



Σχήμα 13: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των βιοαισθητήρων φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός (RIFS) [67]

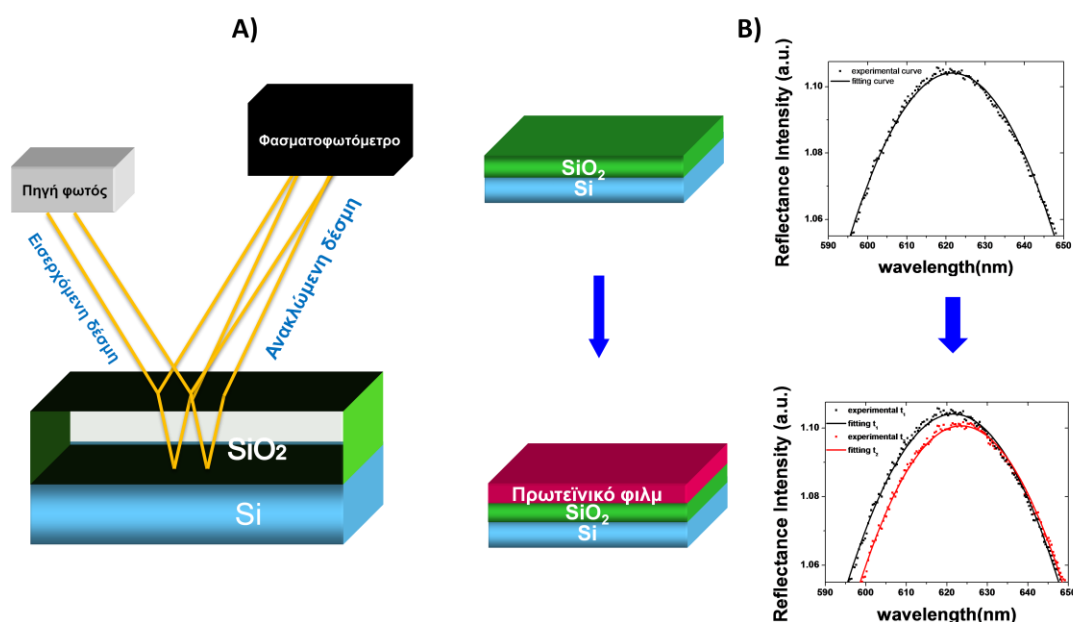
Υποκατηγορία των αισθητήρων φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός αποτελούν οι αισθητήρες φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός στους οποίους το προσπίπτον φως ανακλάται σε μια διεπιφάνεια που αποτελείται από ένα στρώμα διαφανούς υλικού το οποίο έχει επιστρωθεί σε ένα πλήρως ανακλαστικό υλικό όπως είναι το πυρίτιο. Η βιοαντίδραση που λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του διαφανούς υλικού παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο μέσω της παρακολούθησης της μεταβολής του φάσματος ανακλώμενου λευκού φωτός. Στο επόμενο υποκεφάλαιο παρουσιάζεται αναλυτικά η αρχή μεθόδου λειτουργίας του βιοαισθητήρα καθώς αποτελεί τον αισθητήρα που χρησιμοποιήθηκε για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

2.4.5 Αρχή λειτουργίας του βιοαισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός(WLRS)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η μέθοδος βασίζεται στην ανάκλαση ορατού φωτός από κατάλληλα διαμορφωμένο υπόστρωμα/δείγμα ώστε να προκύπτει ένα φάσμα συμβολής. Χρησιμοποιώντας οπτικές παραμέτρους σε κατάλληλους αλγορίθμους παράγεται ένα μοντέλο που περιγράφει την αλληλεπίδραση του φωτός με το δείγμα και μέσω αυτού προδιορίζονται χαρακτηριστικά του δείγματος όπως το πάχος ή/και οπτικές σταθερές όπως ο δείκτης διάθλασης, ο συντελεστής απορρόφησης, κ.α. Από τις μεταβολές των οπτικών ιδιοτήτων μπορεί να μετρηθεί έμμεσα η αλλαγή στο πάχος της επιφάνειας του δείγματος όταν λαμβάνει χώρα μια βιοαντίδραση [68].

Στο Σχήμα 14 παρουσιάζεται σχηματικά η αρχή λειτουργίας του βιοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός καθώς και τα βασικά στοιχεία της οπτικής διάταξης. Συγκεκριμένα, μια διπλή οπτική ίνα συνδέεται με λάμπα εκπομπής λευκού φωτός (500-2000 nm) και στην συνέχεια διαιρείται σε δύο δέσμες φωτός. Η μία καταλήγει απευθείας σε ένα φασματοφωτόμετρο δύο καναλιών και συγκεκριμένα στο κανάλι αναφοράς, ενώ η δεύτερη μεταφέρει το φως στην ανακλαστική επιφάνεια όπου και πραγματοποιείται η βιοαντίδραση. Το προσπίπτον φως έχει κατεύθυνση κάθετη προς την επιφάνεια του δείγματος ενώ το ανακλώμενο συλλέγεται στο εσωτερικό της ίνας και οδηγείται στο κανάλι μέτρησης του φασματοφωτομέτρου. Το φασματοφωτόμετρο ελέγχεται

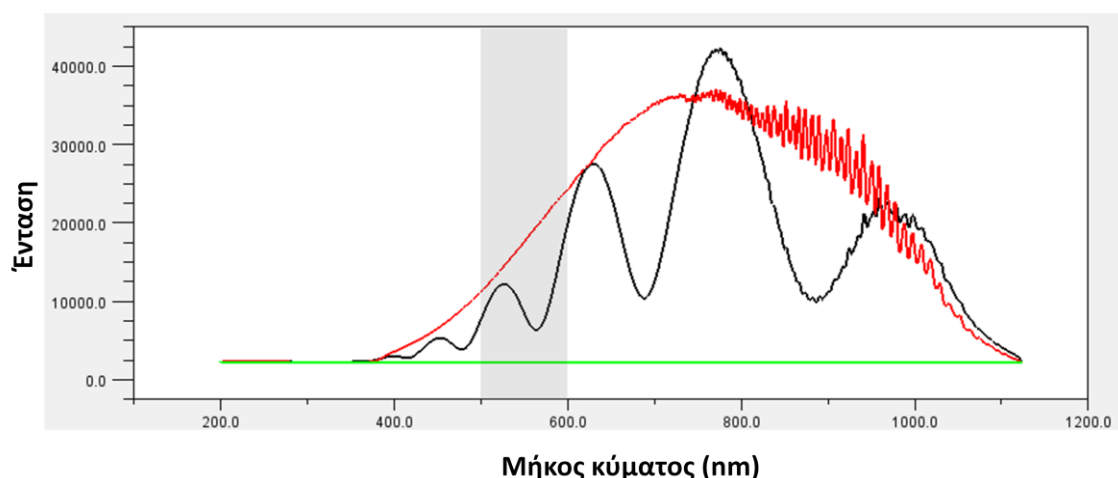
από ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο καταχωρούνται δύο σήματα για κάθε μήκος κύματος, το φάσμα αναφοράς και το πειραματικό φάσμα. Το προσπίπτον φως ανακλάται μερικώς σε κάθε διεπιφάνεια μεταξύ των στρωμάτων που έχουν διαφορετικό δείκτη διάθλασης [69]. Αρχικά συναντά το πρωτεϊνικό στρώμα μέσα στο οποίο διαθλάται έως ότου συναντήσει την αδιαφανή επιφάνεια του πυριτίου, όπου λαμβάνει χώρα πλήρης ανάκλαση. Οι ανακλώμενες δέσμες δημιουργούν ένα νέο χαρακτηριστικό φάσμα ανάκλασης. Αν συμβεί οποιαδήποτε αλλαγή του πάχους ή του δείκτη διάθλασης το ανακλώμενο φάσμα μετατοπίζεται και η μεταβολή ανιχνεύεται άμεσα σε πραγματικό χρόνο [70].



Σχήμα 14: A) Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρων φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός B) Μετατόπιση του φάσματος λόγω της αύξησης του πάχους του βιομοριακού υμενίου που σχηματίζεται πάνω στην ανακλαστική επιφάνεια.

Η ακρίβεια της μεθόδου στηρίζεται στον αριθμό των κορυφών του φάσματος ανάκλασης που καταγράφεται. Στο Σχήμα 15, αναπαρίσταται το φάσμα που καταγράφεται από ανάκλαση σε υπόστρωμα Si σε σύγκριση με αυτό που παίρνουμε από υπόστρωμα SiO₂/Si. Με την παρεμβολή του στρώματος του SiO₂ αυξάνεται η οπτική διαδρομή του φωτός και λαμβάνονται αρκετές κορυφές στο φάσμα ανάκλασης ώστε να επιτευχθεί καλύτερη προσαρμογή του πειραματικού φάσματος στο θεωρητικό και συνεπώς ακριβέστερος

υπολογισμός του πάχους του υλικού. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να προσδιοριστεί το πάχος λεπτών υμενίων (<200nm). Εκτός από SiO₂, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στρώματα νιτριδίου του πυριτίου (Si₃N₄) τα οποία επίσης είναι διαπερατά στην ακτινοβολία ορατού και μπορούν να κατασκευαστούν με πολύ μεγάλη καθαρότητα και ακρίβεια ως προς το πάχος τους με κλασικές διεργασίες μικροηλεκτρονικής παρουσιάζοντας επίσης σταθερότητα με το πέρασμα του χρόνου.



Σχήμα 15: Φάσματα από φιλμ με υπόστρωμα ●: Si και ●: Si με επίστρωση SiO₂ πάχους 1000 nm.

Το βιομόριο αναγνώρισης ακινητοποιείται μετά από κατάλληλη ενεργοποίηση του υποστρώματος στην επιφάνεια του SiO₂ ή του Si₃N₄. Κατά την αντίδραση του αναλύτη με βιομόριο αναγνώρισης (π.χ., αντίσωμα) αυξάνεται το πάχος του πρωτεϊνικού φιλμ. Αυτή η μεταβολή στο πάχος του παρουσιάζεται ως μετατόπιση του φάσματος το καταγράφεται συνεχώς.

Η ενέργεια E της ακτινοβολίας που επιστρέφει στον ανιχνευτή για κάθε μήκος κύματος λ δίνεται από την παρακάτω σχέση.

$$E = A + B \cos\left(\frac{4\pi n_1 d_1}{\lambda}\right) + C \cos\left(\frac{4\pi n_2 d_2}{\lambda}\right) + D \cos\left(\frac{4\pi(n_2 d_2 + n_1 d_1)}{\lambda}\right)$$

όπου:

$$A = r_{01}^2 + r_{12}^2(1 - r_{01}^2)^2 + r_{23}^2(1 - r_{01}^2)^2(1 - r_{12}^2)^2$$

$$B = 2r_{01}r_{12}(1 - r_{01}^2)^2$$

$$C = 2r_{12}r_{23}(1 - r_{01}^2)(1 - r_{12}^2)^2$$

$$D = 2r_{01}r_{23}(1 - r_{01}^2)(1 - r_{12}^2)^2$$

$$r_{ij} = \frac{n_i - n_j}{n_i + n_j}$$

Με r_{01} , r_{12} , r_{23} συμβολίζονται οι σχετικοί δείκτες διάθλασης μεταξύ των στρωμάτων που έρχονται σε επαφή με την ακτινοβολία, το 0 αντιστοιχεί στον αέρα πάνω από την επιφάνεια, (1) είναι η πρωτεϊνική στοιβάδα, (2) το υπόστρωμα του SiO_2 ή Si_3N_4 και (3) το πυρίτιο. Με n_1 , n_2 είναι οι δείκτες διάθλασης και τα d_1 , d_2 τα πάχη της πρωτεϊνικής στοιβάδας και του SiO_2 ή Si_3N_4 , αντίστοιχα [71]. Από την μορφή της παραπάνω εξίσωσης είναι φανερό πως πρόκειται για μια ημιτονοειδή συνάρτηση και οι τιμές που θα λάβει το συνημίτονο είναι αυτές που θα καθορίσουν τα αντίστοιχα μέγιστα και ελάχιστα. Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με το φασματοφωτόμετρο, μέσω κατάλληλου προγράμματος, υπολογίζει για κάθε μήκος κύματος την ενέργεια με την οποία ανακλώνται οι ακτίνες στον ανιχνευτή του φασματοφωτομέτρου. Μέσω αλγόριθμου συγκρίνει τις πειραματικές τιμές με τις θεωρητικές έως ότου γίνει η καλύτερη δυνατή προσαρμογή των δύο φασμάτων. Δεδομένου ότι η ένταση της πηγής για κάθε λ είναι γνωστή από το φάσμα αναφοράς και με την παραδοχή πως ο δείκτης διάθλασης της πρωτεϊνικής στοιβάδας δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά την αντίδραση με τον αναλύτη, ο μόνος άγνωστος της εξίσωσης είναι το πάχος της πρωτεϊνικής στοιβάδας. Με αυτό τον τρόπο ο αλγόριθμος είναι σε θέση να υπολογίζει την μεταβολή του πάχους της πρωτεϊνικής στοιβάδας συναρτήσει του χρόνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

3.1 Ταυτόχρονος προσδιορισμός περισσότερων του ενός αναλυτών

Οι πρώτοι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό ενός αναλύτη ανά δοκιμαστικό σωλήνα και δείγμα, ωστόσο, το 1966 περιγράφηκε στη βιβλιογραφία ο πρώτος ταυτόχρονος ανοσοπροσδιορισμός δύο αναλυτών στο ίδιο δείγμα [72]. Ο προσδιορισμός αυτός αφορούσε την ταυτόχρονη ανίχνευση της ανθρώπινης ινσουλίνης και της αυξητικής ορμόνης με τη χρήση διαφορετικών ραδιοεπισημασμένων μορίων (I^{131} και I^{125}). Η επόμενη δημοσίευση που αφορούσε σε ταυτόχρονο ανοσοπροσδιορισμό περισσότερων του ενός αναλυτών εμφανίστηκε αρκετά χρόνια αργότερα (1989) [73].

Ο ταυτόχρονος προσδιορισμός μίγματος αναλυτών στο ίδιο δείγμα έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα σε σχέση με τον προσδιορισμό μεμονωμένων αναλυτών:

(α) απλοποίηση της εργασίας

(β) ελάττωση του χρόνου ανάλυσης (ο χρόνος που απαιτείται για κάθε προσδιορισμό ταυτίζεται με εκείνον που απαιτείται για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό όλων των αναλυτών), και

(γ) στην μείωση του κόστους της ανάλυσης ως αποτέλεσμα της απλοποίησης της εργασίας, της ελάττωσης του χρόνου ανάλυσης και της μειωμένης κατανάλωσης των αντιδραστηρίων [74].

Οι πρώτες προσεγγίσεις που ακολουθήθηκαν για την επίτευξη του ταυτόχρονου προσδιορισμού περισσότερο του ενός αναλυτών στο ίδιο δείγμα βασίζονταν στην χρήση μορίων επισημασμένων με διαφορετικές κατηγορίες ιχνηθετών όπως: ραδιοϊσότοπα, ένζυμα, φθορίζουσες ουσίες αλλά και ηλεκτρενεργά μόρια. Λόγω του γεγονότος ότι ήταν πολύ δύσκολο να ρυθμιστούν οι συνθήκες ανάλυσης για την λήψη του βέλτιστου σήματος από τους διαφορετικούς ιχνηθέτες ήταν επίσης δύσκολη και η ταυτόχρονη ανίχνευση πλήθους αναλυτών με υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης. Η πλέον επιτυχημένη προσέγγιση για την ανάπτυξη μεθόδων ταυτόχρονου

ανοσοχημικού προσδιορισμού περισσότερο του ενός αναλυτών βασίστηκε στο χωρικό διαχωρισμό των ανοσοαντιδραστηρίων αναγνώρισης μέσω της ακινητοποίησής τους σε διαφορετικές θέσεις επάνω στην ίδια στερεά φάση [73, 75]. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει τη χρήση ενός μόνο ιχνηθέτη για όλους τους ανοσοπροσδιορισμούς που πραγματοποιούνται ταυτόχρονα με αποτέλεσμα να αίρονται οι περιορισμοί του αριθμού αναλυτών και της μειωμένης ευαισθησίας ανίχνευσης που εμφανίζει η χρήση διαφορετικών ιχνηθετών [75]. Ο χωρικός διαχωρισμός των ανοσοαντιδραστηρίων αναγνώρισης επιτυγχάνεται είτε με τη χρήση στερεών φορέων που αποτελούνται από διακριτές επιφάνειες σε κάθε μία από τις οποίες έχει ακινητοποιηθεί διαφορετικό βιοδραστικό μόριο είτε με την ακινητοποίηση των διαφορετικών βιοδραστικών μορίων σε διακριτές θέσεις μιας ενιαίας επιφάνειας.

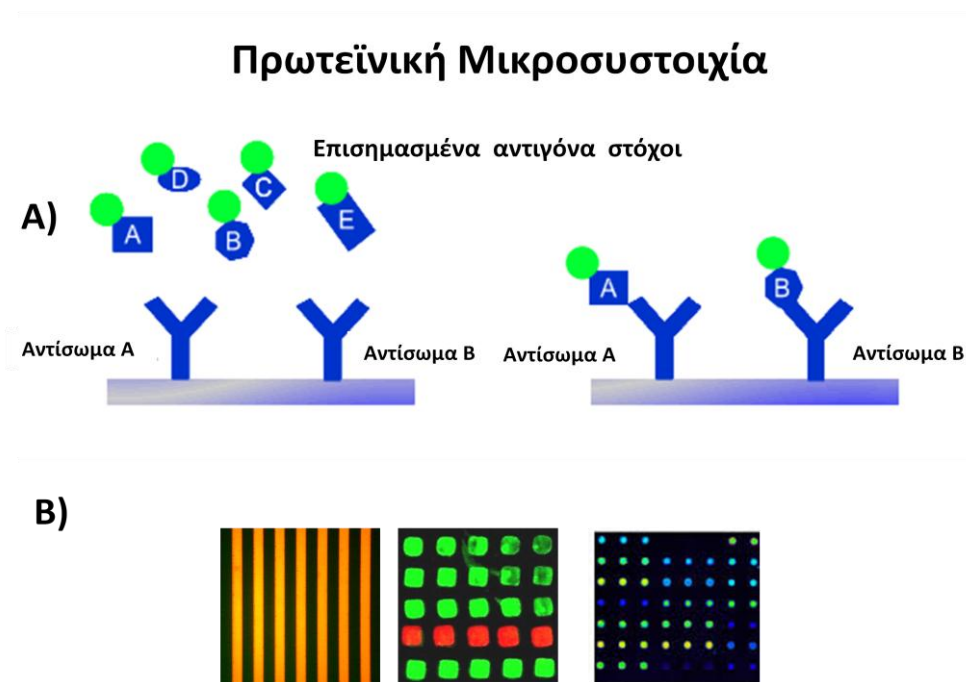
Η ακινητοποίηση των ανοσοαντιδραστηρίων σε διακριτές θέσεις σε έναν ενιαίο στερεό φορέα για το ταυτόχρονο προσδιορισμό μίγματος αναλυτών προτάθηκε για πρώτη φορά από τον R. Ekins το 1989 [73, 76]. Η προσέγγιση αυτή αποτέλεσε τη βάση για την ανάπτυξη ανοσοπροσδιορισμών με την χρήση συστοιχιών αντισωμάτων [77, 78] όπως και μικροσυστοιχιών ανοσοαντιδραστηρίων (αναλυτών) [79, 80] που αποτελούν και το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας και θα αναπτυχθούν διεξοδικά στα επόμενα εδάφια.

3.2 Εισαγωγή στις μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών

Οι μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών αποτελούνται από μια επιφάνεια πάνω στην οποία έχουν ακινητοποιηθεί σε συγκεκριμένα σημεία μόρια διαφορετικών πρωτεϊνών συνήθως με μορφή κηλίδων διαμέτρου μερικών εκατοντάδων μικρομέτρων. Οι πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες βρίσκουν πια ευρεία εφαρμογή στη βιοανάλυση για τον ταυτόχρονο ποιοτικό (παρουσία ή όχι) ή/και ποσοτικό προσδιορισμό μεγάλου αριθμού βιομορίων σε βιολογικά δείγματα, π.χ. αίμα [81, 82].

Η πιο κοινή πρωτεϊνική μικροσυστοιχία είναι η μικροσυστοιχία αντισωμάτων, στην οποία ειδικά αντισώματα κατά διαφόρων αναλυτών εναποτίθενται σε

διακριτές θέσεις πάνω στην ίδια επιφάνεια (συνήθως από γυαλί ή πυρίτιο) και χρησιμοποιούνται ως μόρια δέσμευσης για την ανίχνευση διαφόρων αναλυτών.



Σχημα 16: Α) Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών αντισωμάτων, Β) Εικόνες από πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες με διαφορετική σχηματοποίηση μετά από αντιδραση με μόρια αναλυτών σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες.

3.3 Ιστορική αναδρομή

Όπως αναφέρθηκε και στο εδάφιο 3.1, το θεωρητικό υπόβαθρο για την ανάπτυξη των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών παρουσιάστηκε από τον R. Ekins στα τέλη της δεκαετίας του 1980 [73,76]. Σύμφωνα με το μοντέλο που προτάθηκε, οι μικροσυστοιχίες αντισωμάτων όχι μόνο επιτρέπουν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ενός συνόλου ουσιών αλλά είναι πιο ευαίσθητες και γρήγορες σε σχέση με τους συνήθεις ανοσοχημικούς προσδιορισμούς. Οι πρώτες μικροσυστοιχίες ήταν προσπάθειες σμίκρυνσης βιοχημικών και ανοσοχημικών δοκιμασιών που εκτελούνταν συνήθως σε πλακίδια μικροτιτλοποίησης 96 φρεατίων. Ο Mendoza et al. κατασκεύασε συστοιχίες αντισωμάτων αποτελούμενες από 96 φρεάτια, με 144 κηλίδες το καθένα για δοκιμασίες τύπου ELISA [83]. Μία άλλη τάση ήταν η χρήση μεμβρανών ως

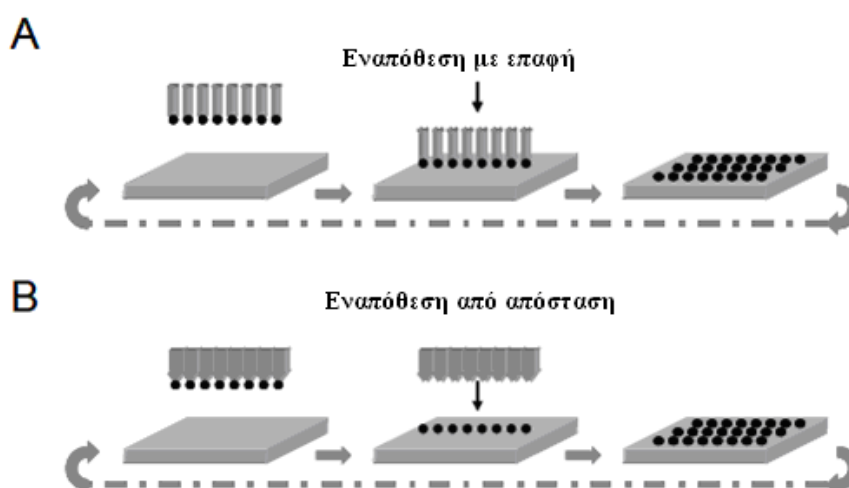
στερεό υπόστρωμα για την κατασκευή μικροσυστοιχιών λόγω της αυξημένης ικανότητάς τους για πρόσδεση πρωτεϊνών σε σχέση με τις επίπεδες επιφάνειες. Η ανάπτυξη των μεθόδων ανάλυσης με ιχνηθέτες φθορισμού στα τέλη του 1980 καθώς και η παρασκευή νέων βελτιωμένων υποστρωμάτων στις αρχές του 1990 προετοίμασαν το έδαφος για τις σύγχρονες μικροσυστοιχίες και κατέστησαν την ανάλυση των σημάτων γρηγορότερη και περισσότερο αξιόπιστη. Όμως, η καινοτομία που άλλαξε ολόκληρο τον τομέα της έρευνας στο πεδίο των μικροσυστοιχιών έλαβε χώρα το 1991, όταν εφαρμόστηκαν για πρώτη φορά από τον Stephen Fodor και τους συνεργάτες του για την παρασκευή μικροσυστοιχιών μέθοδοι, όπως η φωτολιθογραφία και η αποτύπωση, που χρησιμοποιούνταν ήδη στην βιομηχανία των ημιαγωγών [84]. Οι μέθοδοι αυτές επέτρεψαν την σμίκρυνση του μεγέθους των κηλίδων και τον αυτοματισμό των διαδικασιών κατασκευής τους.

Στα μέσα της δεκαετίας του 90, η ταχεία εξέλιξη της τεχνολογίας των υπολογιστών σε συνδυασμό με την ανάπτυξη του πεδίου της βιοτεχνολογίας οδήγησε σε πραγματική «έκρηξη» των εφαρμογών μικροσυστοιχιών με διάφορα ακινητοποιημένα μόρια αναγνώρισης, π.χ., πρωτεΐνες, τμήματα DNA, πεπτίδια κλπ., με αποτέλεσμα ο όρος «τεχνολογία μικροσυστοιχιών» να χρησιμοποιηθεί ως γενικός όρος για την περιγραφή αυτής της τεχνολογίας. Με τις μικροσυστοιχίες κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός μεγάλου αριθμού αναλυτών με μικρή κατανάλωση σε αντιδραστήρια και σημαντική μείωση του χρόνου της ανάλυσης σε σχέση με αυτόν που θα απαιτείτο αν οι αναλύσεις γίνονταν μεμονωμένα. Η στροφή προς τις μικροσυστοιχίες ήταν λοιπόν αναγκαία και λογική. Η διάδοση των μικροσυστοιχιών ως εργαλείων ανάλυσης διευκολύνθηκε από την κατασκευή και την διάθεση στην αγορά συσκευών με ρομποτικά συστήματα και μέγεθος που μπορούσε να προσαρμοστεί τόσο στις ανάγκες ενός ερευνητικού εργαστηρίου όσο και σε αυτές της βιομηχανικής παραγωγής. Με τα ρομποτικά αυτά συστήματα είναι δυνατή η κατασκευή μικροσυστοιχιών με αναπαραγωγίμο τρόπο διασφαλίζοντας την ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Παράλληλα αναπτύχθηκαν τα όργανα ανάγνωσης, συστήματα λογισμικού και γενικά όλα τα συστήματα που απαιτούνταν για την πραγματοποίηση των αναλύσεων και τη λήψη αποτελεσμάτων από τις μικροσυστοιχίες [85].

3.4 Κατασκευή πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών

3.4.1. Τεχνικές εναπόθεσης πρωτεϊνών στο υπόστρωμα

Για την κατασκευή των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών χρησιμοποιούνται συνήθως δυο τεχνικές εναπόθεσης: **α) με επαφή** (*contact printing*), στις οποίες πραγματοποιείται φυσική επαφή του φορέα του διαλύματος της πρωτεΐνης, που πρόκειται να ακινητοποιηθεί, με το υπόστρωμα στο οποίο παρασκευάζονται οι μικροσυστοιχίες, όπως για παράδειγμα εναπόθεση με χρήση ακίδων και μικροσφραγίδων, και **β) από απόσταση** (*non-contact printing*), όπου δε λαμβάνει χώρα επαφή των φορέων του διαλύματος της πρωτεΐνης με την επιφάνεια του υποστρώματος όπως για παράδειγμα σχηματοποίηση με φωτοχημικές μεθόδους, εναπόθεση με ψεκασμό και ηλεκτροεναπόθεση.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της εναπόθεσης των κηλίδων πάνω στον στερεό φορέα: Α) με επαφή και Β) από απόσταση

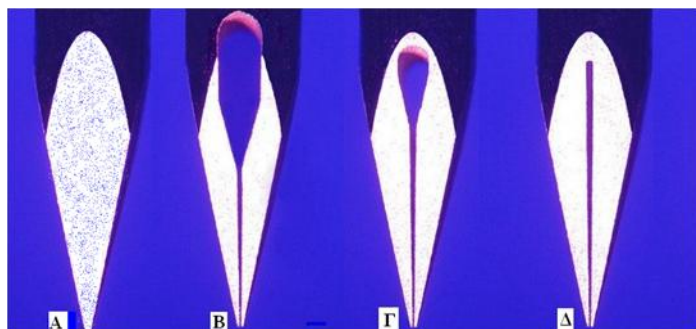
3.4.1.1. Κατασκευή μικροσυστοιχιών με επαφή

- Συμπαγείς και διάτρητες ακίδες

Η εναπόθεση των διαλυμάτων των πρωτεϊνών στα υποστρώματα με τη χρήση ακίδων είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος κατασκευής μικροσυστοιχιών. Η εναπόθεση πρέπει να είναι ομοιόμορφη και επαναλήψιμη προκειμένου να επιτυγχάνονται επαναλήψιμες και αξιόπιστες αναλύσεις. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει να ληφθούν υπόψη πολλοί παράγοντες όπως η

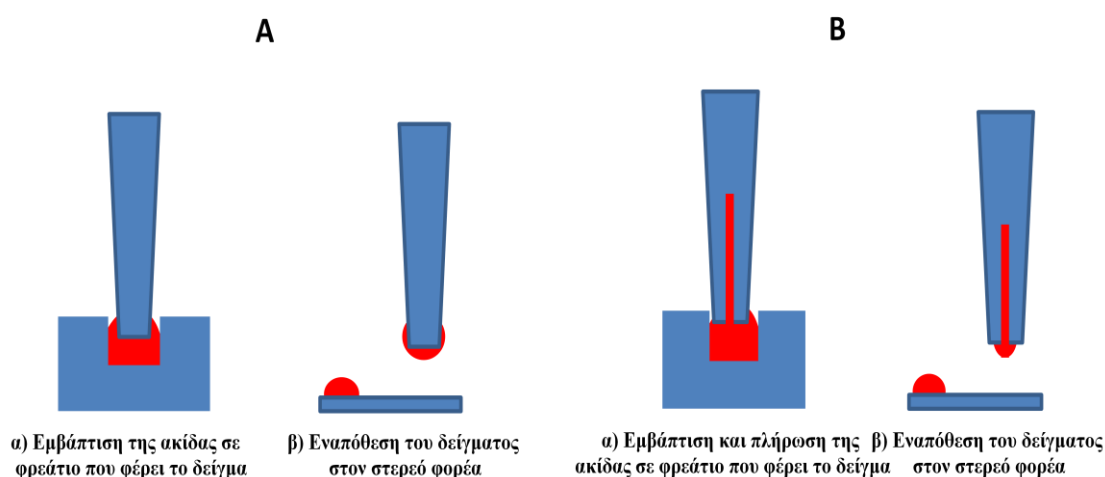
επιφανειακή τάση του διαλύματος, οι ιδιότητες της επιφάνειας επαφής της ακίδας, η υδροφιλικότητα του υποστρώματος, το πόσο επίπεδη είναι η επιφάνεια του υποστρώματος καθώς η υγρασία και η θερμοκρασία του περιβάλλοντος.

Υπάρχουν διαφόρου τύπου ακίδες κυρίως συμπαγείς ακίδες και ακίδες τύπου πένας, με διάφορα εύρη ανοίγματος και κοιλότητες συγκράτησης διαλύματος όπως φαίνεται στο Σχήμα 17.



Σχήμα 17: Ακίδες εναπόθεσης:(Α) συμπαγείς ακίδες, (Β-Γ) ακίδες τύπου πένας με διάφορα εύρη ανοίγματος και (Δ) τριχοειδείς ακίδες

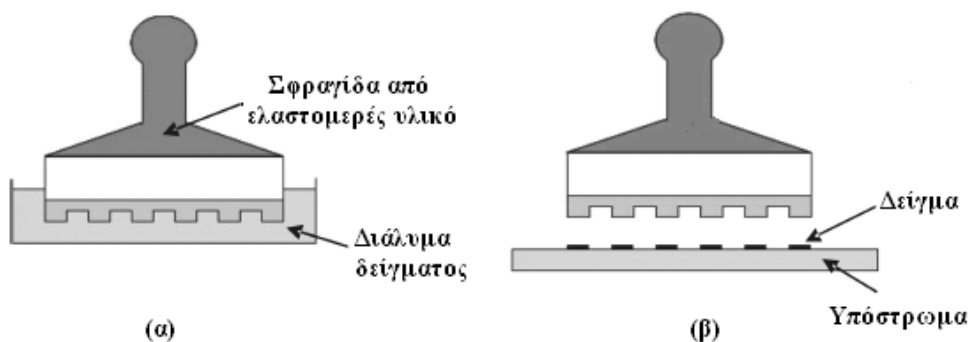
Για τη δημιουργία των μικροκηλίδων, η ακίδα εμβαπτίζεται στο διάλυμα που επιθυμούμε να εναποθέσουμε και είτε δημιουργείται στο ακροφύσιο ένα υμένιο από το διάλυμα (συμπαγείς βελόνες) είτε η κοιλότητα γεμίζει μέσω τριχοειδών φαινομένων με διάλυμα το οποίο στην συνέχεια εναποτίθεται πάνω στον στερεό φορέα (Σχήμα 18) [86].



Σχήμα 18: Πορεία εναπόθεσης με: Α) Συμπαγείς ακίδες: το ακροφύσιο της ακίδας συγκρατεί μέσω τριχοειδών δυνάμεων το διάλυμα και η εναπόθεση γίνεται μέσω απλής επαφής με το υπόστρωμα. Β) Ακίδες τύπου πένας: το εσωτερικό της ακίδας πληρώνεται με το διάλυμα μέσω τριχοειδών δυνάμεων και υπάρχει η δυνατότητα σειριακής εναπόθεσης για κάθε πλήρωση της ακίδας με διάλυμα.

• Μικροσφραγίδες

Ένας εναλλακτικός τρόπος κατασκευής μικροσυστοιχιών είναι οι μικροσφραγίδες. Η τεχνική εναπόθεσης με μικροσφραγίδες απεικονίζεται στην (Εικόνα 3). Αρχικά το δείγμα προσροφάται πάνω στις ανάγλυφες μικροδομές της σφραγίδας και στη συνέχεια μεταφέρεται στο υπόστρωμα με φυσική επαφή. Για να επιτευχθεί καλή επαφή οι μικροσφραγίδες κατασκευάζονται από ελαστομερή υλικά όπως το πολύ(διμεθυλοσιλοξιλάνιο) (PDMS). Με τη χρήση μικροσφραγίδων μπορούν να εναποτεθούν ταυτόχρονα εκατοντάδες με αποτέλεσμα γρήγορη και υψηλής απόδοσης παρασκευή. Επιπλέον η τεχνική εναπόθεσης με μικροσφραγίδες είναι μια απλή και χαμηλού κόστους πορεία που μπορεί εύκολα να διεξαχθεί σ' ένα εργαστήριο. Οι μικροσφραγίδες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν μικροσυστοιχίες με πολύ υψηλή ανάλυση με απόσταση μεταξύ των κηλίδων μικρότερη των 100 nm, ενώ με χρήση ειδικά τροποποιημένου σκληρού PDMS μπορούν να κατασκευαστούν κηλίδες διαμέτρου μικρότερης των 100 nm [40]. Μειονέκτημα της τεχνικής αποτελεί το γεγονός ότι κάθε σφραγίδα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περιορισμένο αριθμό αποθέσεων (5-10) πέραν των οποίων επηρεάζεται η ομοιομορφία και το σχήμα των κηλίδων [87].

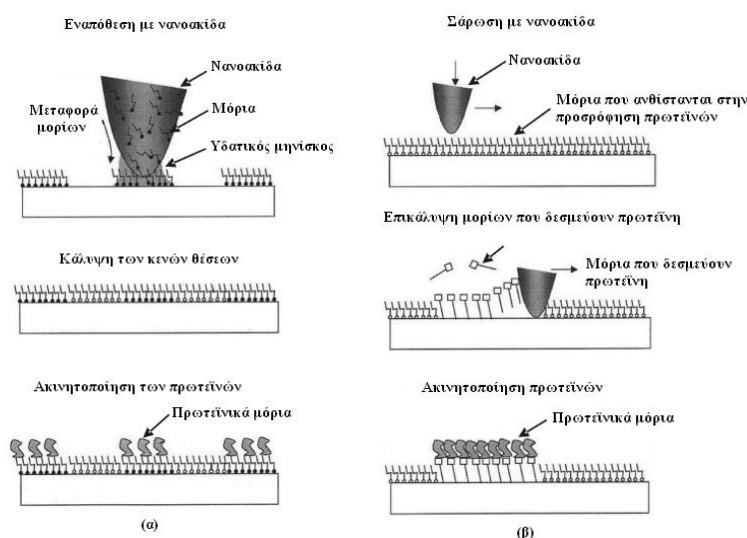


Εικόνα 3: Μέθοδος κατασκευής μικροσυστοιχιών με μικροσφραγίδες (α) η σφραγίδα εμβαπτίζεται στο διάλυμα του δείγματος, (β) το δείγμα μεταφέρεται στο υπόστρωμα μέσω φυσικής επαφής του ανάγλυφου ελαστομερούς με την επιφάνεια του υποστρώματος της μικροσυστοιχίας [86].

• Νανοακίδες

Για να επιτευχθεί υψηλότερη πυκνότητα δομών από ότι με τις συνήθεις ακίδες και τις μικροσφραγίδες, τα μεγέθη των κηλίδων έπρεπε να μειωθούν. Οι

τεχνολογίες που αναπτύχθηκαν για την δημιουργία μικροσυστοιχιών με μέγεθος κηλίδων μικρότερο του 1 μm βασίζονται στην χρήση ακίδων μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM). Οι νανοακίδες χρησιμοποιούνται είτε για την εναπόθεση του δείγματος στο υπόστρωμα (dip-pen nanolithography), είτε για την απομάκρυνση από την επιφάνεια επιστρωμένων βιομορίων (AFM grafting). Στην πρώτη εκδοχή, όταν η νανοακίδα έρθει σε επαφή με το υπόστρωμα, μεταφέρεται το διάλυμα από την επικαλυμμένη νανοακίδα στην επιφάνεια του υποστρώματος μέσω τριχοειδών δυνάμεων σχηματίζοντας κηλίδες ή άλλες δομές (π.χ. γραμμές) διαμέτρου μερικών δεκάδων νανομέτρων. Μετά από κάλυψη της ελεύθερης επιφάνειας του υποστρώματος με αδρανή μόρια, το υπόστρωμα εκτίθεται στο διάλυμα που περιέχει το προς ανάλυση δείγμα. Στην δεύτερη προσέγγιση, η νανοακίδα απομακρύνει μια στρώση ακινητοποιημένων μορίων από επιλεγμένες περιοχές και ακολουθεί ακινητοποίηση μορίων στις περιοχές που αποκαλύφθηκαν από την ακίδα όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 19 [88, 89].

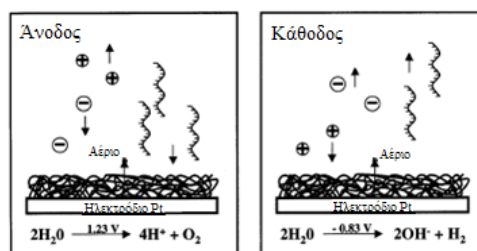


Σχήμα 19: (α) Σχηματική πορεία κατασκευής μικροσυστοιχιών με νανολιθογραφία τύπου dip-pen. (β) Σχηματική πορεία κατασκευή μικροσυστοιχιών με απομάκρυνση μορίων με ακίδες μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM grafting) [86].

3.4.1.2. Δημιουργία μικροσυστοιχιών χωρίς επαφή

- **Με ηλεκτροεναπόθεση**

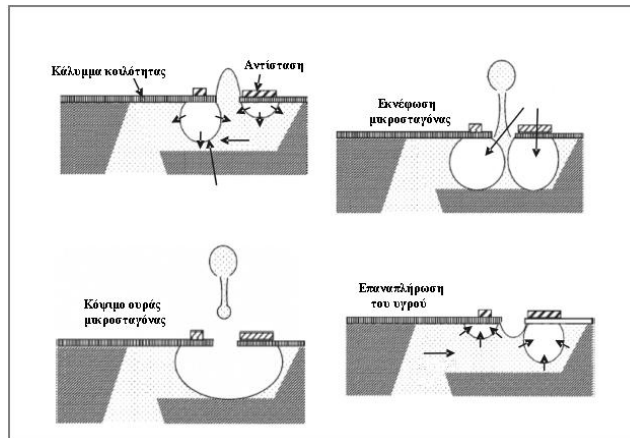
Ορισμένες ερευνητικές ομάδες έχουν αναπτύξει τεχνικές για την *in situ* κατασκευή μικροσυστοιχιών πρωτεϊνών αξιοποιώντας την ηλεκτροχημεία και τις επιδράσεις ηλεκτρικού πεδίου σε συστοιχίες ηλεκτροδίων λευκοχρύσου. Κατά την παροχή ρεύματος σε ορισμένα από τα ηλεκτρόδια της συστοιχίας φορτισμένα βιομόρια (π.χ., DNA, RNA, πρωτεΐνες, αντισώματα, νανοσφαιρίδια ακόμη και μικροσκοπικής κλίμακας συσκευές ημιαγωγών) έλκονται από το ηλεκτρικό πεδίο και μεταφέρονται στα ηλεκτρόδια όπου και ακινητοποιούνται εκλεκτικά. Βασικής σημασίας για την λειτουργία της συσκευής είναι η επίστρωση με ημιπερατή μεμβράνη αγαρόζης-στρεπταβιδίνης η οποία επικαλύπτει τα μικροηλεκτρόδια και στην οποία μπορούν να ακινητοποιηθούν βιοτυνιλιωμένα βιομόρια π.χ., αλληλουχίες DNA. Η ημιπερατή μεμβράνη, που έχει πάχος 1-10 μm , επιτρέπει σε μόρια νερού και μικρά ιόντα (Na^+ , Cl^- κ.α.) να διακινούνται ελεύθερα προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, αλλά εμποδίζει την μεταφορά ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους (DNA, πρωτεΐνες κ.α.). Επιπλέον, η ημιπερατή μεμβράνη επιτρέπει να διαπερνούν την συστοιχία ποσότητες ρεύματος ($>100 \text{ nA}$) και τάσεις ($>1,2 \text{ V}$) που εξασφαλίζουν την ηλεκτροφορητική μεταφορά των φορτισμένων μορίων, ενώ παράλληλα προστατεύει τις ειδικές δεσμευτικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα πάνω στο ηλεκτρόδιο, π.χ., αντιδράσεις υβριδισμού, από τις ηλεκτροχημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στην επιφάνεια του μικροηλεκτροδίου. Αυτές οι ηλεκτροχημικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν: i) τον σχηματισμό ιόντων υδρογόνου (H^+) και οξυγόνου στην επιφάνεια των θετικώς πολωμένων ηλεκτροδίων, ii) τον σχηματισμό ιόντων υδροξυλίου (OH^-) και υδρογόνου στην επιφάνεια των αρνητικώς πολωμένων ηλεκτροδίων, καθώς και iii) τον σχηματισμό ποικίλων ελευθέρων ριζών (Σχήμα 20) [90].



Σχήμα 20: Η λειτουργία της ημιπερατής μεμβράνης. Στο σχήμα φαίνονται οι βασικές φυσικές και χημικές λειτουργίες της ημιπερατής μεμβράνης. Αυτές οι λειτουργίες περιλαμβάνουν: (i) την διέλευση μορίων νερού και μικρών ιόντων προς την επιφάνεια του μικροηλεκτροδίου, (ii) την παρεμπόδιση μεταφοράς βιομορίων στην ενεργή επιφάνεια του μικροηλεκτροδίου, (iii) την προστασία των ειδικών δεσμευτικών αντιδράσεων από τις επιδράσεις των προϊόντων ηλεκτρόλυσης (H^+ , OH^- , H_2 , O_2 και ελεύθερες ρίζες,) και (iv) τη χρήση της για την πρόσδεση μορίων αναγνώρισης.

• Με ψεκασμό

Προκειμένου να μειωθεί το κόστος της κατασκευής πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών έχουν γίνει προσπάθειες να εφαρμοστεί η τεχνολογία εκτύπωσης με ψεκασμό (inkjet). Έτσι, εμπορικοί εκτυπωτές τροποποιούνται κατάλληλα προκειμένου να εναποθέτουν διαλύματα πρωτεϊνών αντί για μελάνι. Οι δύο βασικοί τύποι εκτυπωτών με ψεκασμό είναι οι θερμικοί και οι πιεζοηλεκτρικοί. Στους θερμικούς εκτυπωτές θερμικές αντιστάσεις ($200\text{ }^\circ\text{C}$) θερμαίνουν μια μικρή ποσότητα υγρού η οποία διογκώνεται και εξωθεί μικροσταγόνες του διαλύματος που πρόκειται να εναποτεθεί στο άκρο μιας ακίδας (Σχήμα 21). Στους πιεζοηλεκτρικούς εκτυπωτές αποφεύγεται η χρήση υψηλών θερμοκρασιών χρησιμοποιώντας πιεζοηλεκτρικούς ενεργοποιητές για την κατανομή των μικροσταγόνων [86, 91].



Σχήμα 21: Σχηματική αναπαράσταση της εναπόθεσης μικροκηλίδων με θερμική εκνέφωση. Αντιστάσεις εξατμίζουν μια μικροποσότητα υγρού η οποία στη συνέχεια αποκόπτεται και προσπίπτει στην επιφάνεια.

3.4.2 Ακίνητοποίηση των πρωτεϊνών στον στερεό φορέα

Ιδιαίτερα σημαντική για την κατασκευή των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών είναι η επιλογή της χημείας που χρησιμοποιείται για την ακίνητοποίηση των βιομορίων αναγνώρισης στο στερεό φορέα. Στόχος της κάθε μεθόδου πρόσδεσης είναι τα μόρια αναγνώρισης να ακίνητοποιούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις αλλά και βέλτιστη απόσταση μεταξύ τους ώστε να επιτυγχάνονται υψηλές αποδόσεις όσον αφορά την αντίδραση με τον αναλύτη και συνεπώς όσο το δυνατόν υψηλότερα αναλυτικά σήματα. Μερικοί παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για την ακίνητοποίηση των βιομορίων αναγνώρισης στους στερεούς φορείς είναι τα ακόλουθα:

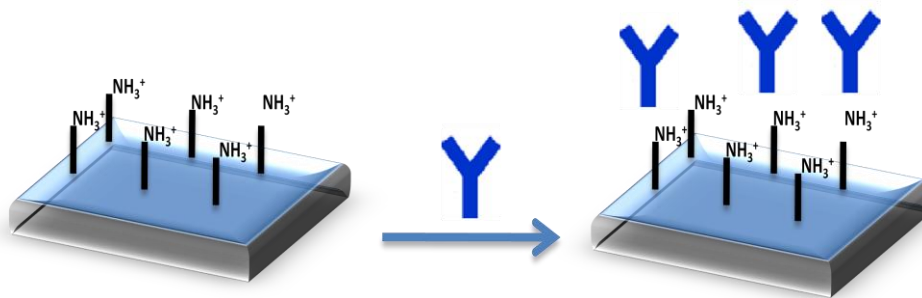
- Η χημεία ακίνητοποίησης πρέπει να είναι σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια των σταδίων ανάλυσης και εκπλύσεων
- Τα βιομόρια πρέπει μετά την ακίνητοποίησή τους να διατηρούν την λειτουργικότητά τους
- Τα βιομόρια πρέπει μετά την ακίνητοποίησή τους να έχουν κατάλληλο προσανατολισμό και διαμόρφωση ώστε να μην παρεμποδίζεται η αντίδραση με τον αναλύτη

- Η χημεία ακινητοποίησης πρέπει να είναι τέτοια ώστε τα μόρια αναγνώρισης να μπορούν να κατανέμονται ομοιόμορφα πάνω στην επιφάνεια σχηματίζοντας μια σταθερή στοιβάδα.

Οι βασικές μέθοδοι ακινητοποίησης των πρωτεϊνών είναι: η προσρόφηση, η ομοιοπολική σύνδεση και η ακινητοποίηση μέσω δεσμευτικών πρωτεϊνών όπως οι πρωτεΐνες A και G και η γέφυρα βιοτίνης-αβιδίνης (ή στρεπταβιδίνης).

3.4.2.1 Ακινητοποίηση μέσω προσρόφησης

Η προσρόφηση είναι η απλούστερη μέθοδος ακινητοποίησης πρωτεϊνών πάνω σε μια επιφάνεια επειδή δεν χρειάζεται κάποια τροποποίηση της. Η δύναμεις που συμμετέχουν στη δημιουργία αυτής της σύνδεσης είναι δευτερεύουσες δυνάμεις Van der Waals, οι οποίες αν και ασθενείς οδηγούν σε ισχυρή σύνδεση λόγω μεγάλης έκτασης (Σχήμα 22).



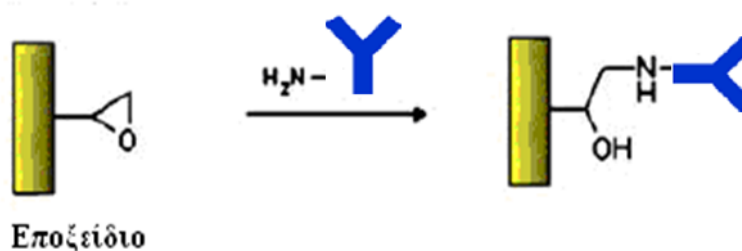
Σχήμα 22: Σχηματική αναπαράσταση της ακινητοποίησης αντισωμάτων σε επιφάνεια μέσω προσρόφησης.

Ακινητοποίηση πρωτεϊνών με προσρόφηση έχει αναφερθεί σε επιφάνειες νιτροκυτταρίνης, πολυστυρενίου, μεμβράνες νάιλον, αλουμινίου, χρυσού, καθώς και γυάλινα ηλεκτρόδια άνθρακα [92].

3.4.2.2 Ομοιοπολική ακινητοποίηση

Η ομοιοπολική ακινητοποίηση μορίων σε στερεούς φορείς πραγματοποιείται μέσω σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των βιομορίων και της επιφάνειας. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται εξαρτώνται από τις διαθέσιμες ενεργές ομάδες στην επιφάνεια και στο βιομόριο που πρόκειται να ακινητοποιηθεί. Η ενεργοποίηση των επιφανειών μπορεί να επιτευχθεί κυρίως

με συνδετικά μόρια μηδενικού μήκους. Τα συνδετικά μόρια μηδενικού μήκους εισάγουν ενεργές ομάδες απευθείας πάνω στην επιφάνεια. Η σιλιανοποίηση με ενεργά οργανολειτουργικά σιλάνια όπως (3-γλυκιδιλοξυπροπυλο) τριμεθοξυσιλάνιο (3-GOPTS), (3-αμινοπροπυλο) τριαιθοξυσιλάνιο (APTES), αμινοφαινυλοτριμεθοξυσιλάνιο και αλλοακεταμιδοσιλάνιο είναι η πιο δημοφιλής μέθοδος ενεργοποίησης υάλινων επιφανειών. Εξαιτίας των σημαντικών στερεοχημικών παρεμποδίσεων που προέρχονται από την επιφάνεια κατά την απευθείας ομοιοπολική ακινητοποίηση των πρωτεϊνών, σε αρκετές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται συνδετικά μόρια που περιλαμβάνουν πολλαπλές μονομερείς ομάδες για την απομάκρυνση των ενεργών ομάδων από την επιφάνεια. Στο Σχήμα 23 παρουσιάζεται ενδεικτικά η αντίδραση πρόσδεσης πρωτεϊνών σε επιφάνειες που φέρουν ενεργές επόξυ-ομάδες [93, 94].

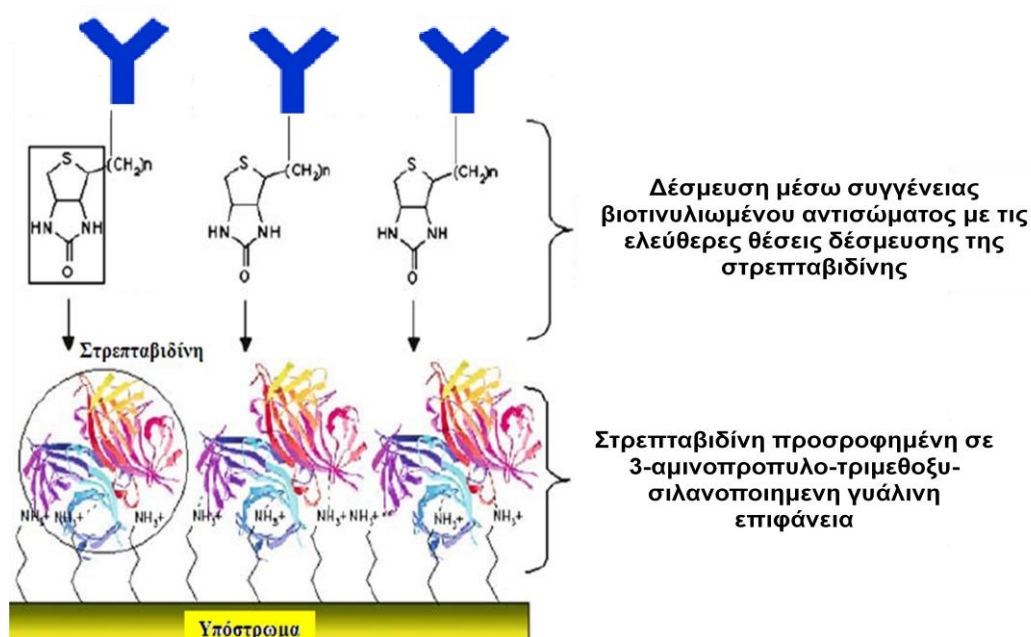


Σχήμα 23: Σχηματική αναπαράσταση της ακινητοποίησης αντισωμάτων με ομοιοπολική πρόσδεση σε επιφάνεια.

3.4.2.3 Ακινητοποίηση μέσω ειδικών δεσμευτικών πρωτεϊνών

Ως μόρια-γέφυρες μεταξύ του στερεού φορέα και του μορίου που θέλουμε να προσδέσουμε έχουν χρησιμοποιηθεί πρωτεΐνες βακτηριδίων που δεσμεύουν ανοσοσφαιρίνες όπως οι πρωτεΐνες A [95, 96] και G [97] που έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν οδηγούν στη μετουσίωσή των αντισωμάτων και έτσι διατηρείται σε μεγάλο βαθμό η ικανότητα δέσμευσης του αναλύτη [98]. Η πρωτεΐνη A, που λαμβάνεται από το *Staphylococcus aureus* και η πρωτεΐνη G, που λαμβάνεται από διάφορα στελέχη *Streptococcus*, δεσμεύουν διάφορες τάξεις ανοσοσφαιρινών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την

ακίνητοποίηση αντισωμάτων αλλά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ακίνητοποίηση αντιγόνων [98]. Μια άλλη μέθοδος εκμεταλλεύεται την υψηλή σταθερά σύνδεσης της βιοτίνης με τις πρωτεΐνες αβιδίνη και στρεπταβιδίνη. Επειδή όμως η αβιδίνη και η στρεπταβιδίνη έχουν σχετικά χαμηλή σταθερά σύνδεσης με την επιφάνεια η πρόσδεση μπορεί να επιτευχθεί μέσω της χρήσης μιας βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης όπως η βόειος πρωτεΐνη (BSA). Η γέφυρα βιοτίνης-αβιδίνης δύναται να χρησιμοποιηθεί τόσο για την ακίνητοποίηση αντισωμάτων όσο και αντιγόνων και επιπλέον παρέχει τη δυνατότητα ακίνητοποίησης μεγαλύτερου αριθμού βιομορίων ανά μονάδα επιφάνειας καθώς κάθε ένα μόριο αβιδίνης δεσμεύει έως τέσσερα μόρια βιοτίνης [99]. Ωστόσο και οι δύο μέθοδοι έμμεσης ακίνητοποίησης βιομορίων που αναφέρθηκαν πραγματοποιούνται σε δύο στάδια. Αρχικά πραγματοποιείται η ακίνητοποίηση των πρωτεϊνών A ή G και της αβιδίνης (μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης ή προσρόφησης) και εν συνεχεία των κατάλληλων ανοσοαντιδραστηρίων ή των συζευγμάτων τους με βιοτίνη, αντίστοιχα.



Σχήμα 24: Σχηματική αναπαράσταση της ακίνητοποίησης αντισωμάτων μέσω του συστήματος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης. Το αντίσωμα που φέρει μόρια βιοτίνης ακίνητοποιείται στην επιφάνεια λόγω της ισχυρής σύνδεσης μεταξύ βιοτίνης-στρεπταβιδίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη μεθόδων ταυτόχρονης ανίχνευσης βιομορίων με μικροσυστοιχίες. Συγκεκριμένα η μελέτη θα επικεντρωθεί στην ανάπτυξη μικροσυστοιχιών αντισωμάτων και την ανίχνευση των αντίστοιχων αντιγόνων μέσω οπτικού ανοσοαισθητήρα που βασίζεται σε ανάκλαση λευκού φωτός και επιτρέπει την ανίχνευση βιομοριακών αντιδράσεων χωρίς την χρήση ιχνηθετών. Στα πλαίσια της εργασίας θα βελτιστοποιηθούν διάφορες παράμετροι που αφορούν στον αισθητήρα όπως η σύσταση της αισθητήριας επιφάνειας, η μέθοδος χημικής ενεργοποίησης της και εναπόθεσης των αντισωμάτων, οι χρόνοι της αντίδρασης. Ακολουθώντας οι μέθοδοι που θα αναπτυχθούν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) και των D-διμερών (D-dimers θα αξιολογηθούν ως προς τα αναλυτικά χαρακτηριστικά τους, την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων σε δείγματα πλάσματος. Τέλος τα αποτελέσματα από την ανάλυση των δειγμάτων θα συγκριθούν με αυτά που λαμβάνονται με εμπορικά διαθέσιμες τυποποιημένες συσκευασίας ανοσοανάλυσης καθώς και με δεδομένα της βιβλιογραφίας.

Η παρουσίαση της εργασίας καλύπτει δυο ενότητες. Στην πρώτη (Θεωρητικό μέρος) παρέχονται βιβλιογραφικές πληροφορίες για τους καρδιακούς δείκτες, την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και τα D-διμερή και τις κλινικές τους εφαρμογές, καθώς επίσης και για τους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς και την χρήση των βιοαισθητήρων για την μέτρηση αναλυτών. Στο τέλος της ενότητας αυτής παρουσιάζεται η χρήση των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών στον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφορετικών αναλυτών στο ίδιο δείγμα. Στη δεύτερη ενότητα (Πειραματικό μέρος) παρουσιάζεται η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ή αναπτύχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Επίσης παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν την επιλογή των υλικών και των αντιδραστηρίων, τη βελτιστοποίηση των μεθοδολογιών που εφαρμόστηκαν όπως και η αξιολόγηση του αναπτυχθέντος βιοαισθητήρα. Τέλος παρουσιάζεται η σύνοψη των αποτελεσμάτων, τα επιτεύγματα της παρούσας διατριβής και η συσχέτισή τους με αυτά της βιβλιογραφίας.

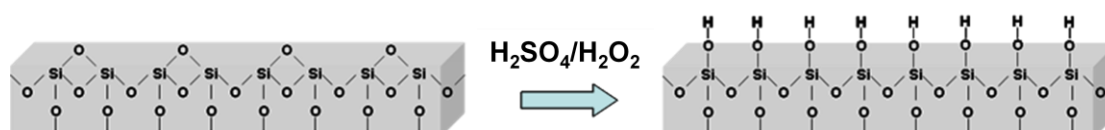
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Υδροφιλοποίηση επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την υδροφιλοποίηση των επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου βασίστηκε στη χρήση μίγματος πυκνού θειικού οξέος (H_2SO_4) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε αναλογία 1:1. Η κατεργασία με το μίγμα αυτό αποσκοπεί στην απομάκρυνση των οργανικών επιμολύνσεων και στον εμπλουτισμό της επιφάνειας με ελεύθερες σιλανόλες, ικανές να συνδεθούν με μόρια οργανοσιλανίων ή πολυμερών (Σχήμα 25).



Σχήμα 25: Υδροφιλοποίηση υάλινων επιφανειών με H_2SO_4/H_2O_2

□ ΥΛΙΚΑ

- Δισκίδια πυριτίου (Si-Mat, Kaufering, Γερμανία) στα οποία είχε αποτεθεί στρώμα SiO_2 πάχους 1000 nm
- Πυκνό θειικό οξύ, 95-97 % (v/v) (Merck, Darmstadt, Γερμανία)
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου, 30% (v/v) (CarloErba, Ιταλία)
- Υάλινα τρυβλία
- Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο.

□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Οι επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου εμβαπτίζονται σε μίγμα ίσων όγκων (1:1) π.θειικού οξέος και υπεροξειδίου του υδρογόνου σε υάλινο

τρυβλίο. Αφού παραμείνουν στο διάλυμα αυτό επί 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, εκπλένονται με περίσσεια νερού και ακολουθεί ξήρανση τους με ρεύμα αζώτου. Οι καθαρισμένες και υδροφιλοποιημένες επιφάνειες τροποποιούνται με σιλάνια ή με επίστρωση πολυμερικών υμενίων.

5.2 Χημική τροποποίηση επιφανειών πυριτίου με APTES

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η διαδικασία για τη σιλανοποίηση των επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με (3-αμινοπροπυλο)τριαθοξυσιλάνιο (APTES) απεικονίζεται στο Σχήμα 26. Σύμφωνα με τη μέθοδο, οι υδροφιλοποιημένες επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου επωάζονται με υδατικό διάλυμα (3-αμινοπροπυλο)τριαθοξυσιλανίου (APTES). Τα μόρια του σιλανίου υδρολύονται και σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις σιλανόλες της επιφάνειας του πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου. Μετά από απομάκρυνση του διαλύματος σιλανοποίησης, ακολουθεί κατεργασία σε υψηλή θερμοκρασία ώστε τα μόρια του σιλανίου να σχηματίσουν ομοιοπολικούς δεσμούς με την επιφάνεια καθιστώντας την κατάλληλη τόσο για ομοιοπολική πρόσδεση όσο και για προσρόφηση βιομορίων [100].

□ ΥΛΙΚΑ

- Υδροφιλοποιημένες επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου
- 3-(αμινοπροπυλο)τριαθοξυσιλάνιο (APTES) (Sigma, St Louis, Mo, ΗΠΑ).
- Υάλινα τρυβλία
- Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο.

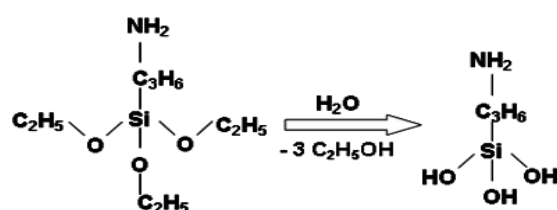
□ ΟΡΓΑΝΑ

- Επωαστικός κλίβανος, Heraus T6 (Thermo Electron, Γερμανία).

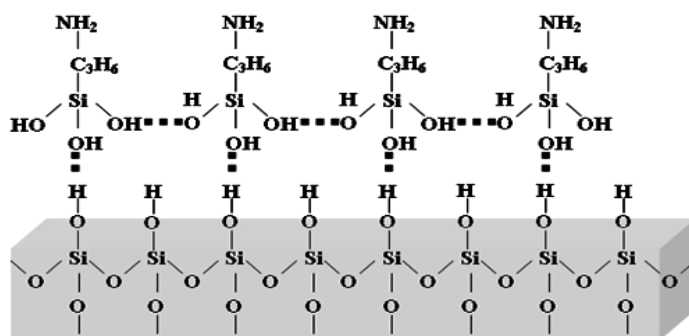
□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Για την σιλανοποίηση με APTES, οι υδροφιλοποιημένες επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου εμβαπτίζονται σε υδατικό διάλυμα APTES 2% (ο/ο) επί 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, οι επιφάνειες εκπλένονται ελαφρώς με νερό, ξηραίνονται με ρεύμα αζώτου και μεταφέρονται σε επωαστικό κλίβανο όπου παραμένουν για 20min σε θερμοκρασία 120 °C. Οι σιλανοποιημένες επιφάνειες ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου και αποθηκεύονται σε ξηραντήρα κενού έως ότου χρησιμοποιηθούν.

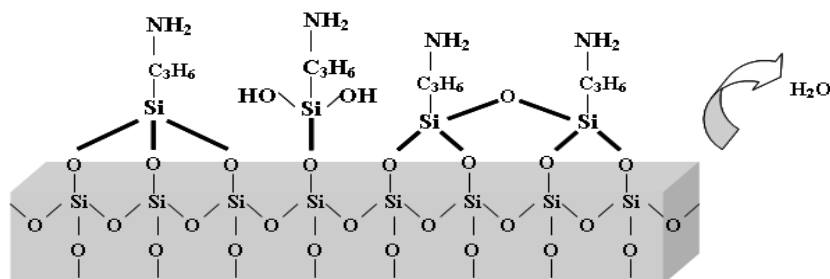
1. Υδρόλυση των αιθοξυλο-ομάδων του APTES



2. Επώαση υδροφιλοποιημένης υάλινης επιφάνειας με APTES για τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου



3. Ξήρανση για το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών



Σχήμα 26: Αρχή μεθόδου σιλανοποίησης επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με APTES.

5.3 Χημική τροποποίηση επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με γλουταραλδεΰδη.

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η τροποποίηση των επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με γλουταραλδεΰδη απεικονίζεται στο Σχήμα 27. Σύμφωνα με τη μέθοδο, οι υδροφιλοποιημένες επιφάνειες πυριτίου τροποποιούνται αρχικά με APTES όπως περιγράφεται στην ενότητα 5.2. Στη συνέχεια, τα μόρια της γλουταραλδεΰδης αντιδρούν τις αμινομάδες της επιφάνειας με αποτέλεσμα την εισαγωγή αλδεϋδομάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια για ομοιοπολική πρόσδεση βιομορίων μέσω των διαθέσιμων σε αυτά αμινομάδων [101].

□ ΥΛΙΚΑ

- Υδροφιλοποιημένες επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου
- 3-(αμινοπροπυλο)τριαθοξυσιλάνιο (APTES), (Sigma, St Louis, Mo, ΗΠΑ)
- Γλουταραλδεΰδη (GA), (Sigma, St Louis, Mo, ΗΠΑ)
- Υάλινα τρυβλία
- Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο.

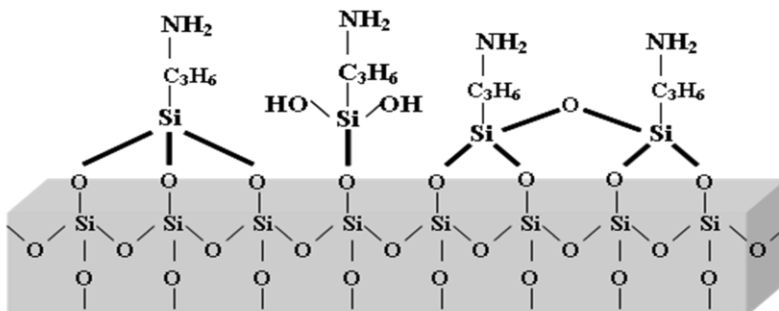
□ ΟΡΓΑΝΑ

- Επωαστικός κλίβανος, Heraus T6 (Thermo Electron, Γερμανία).

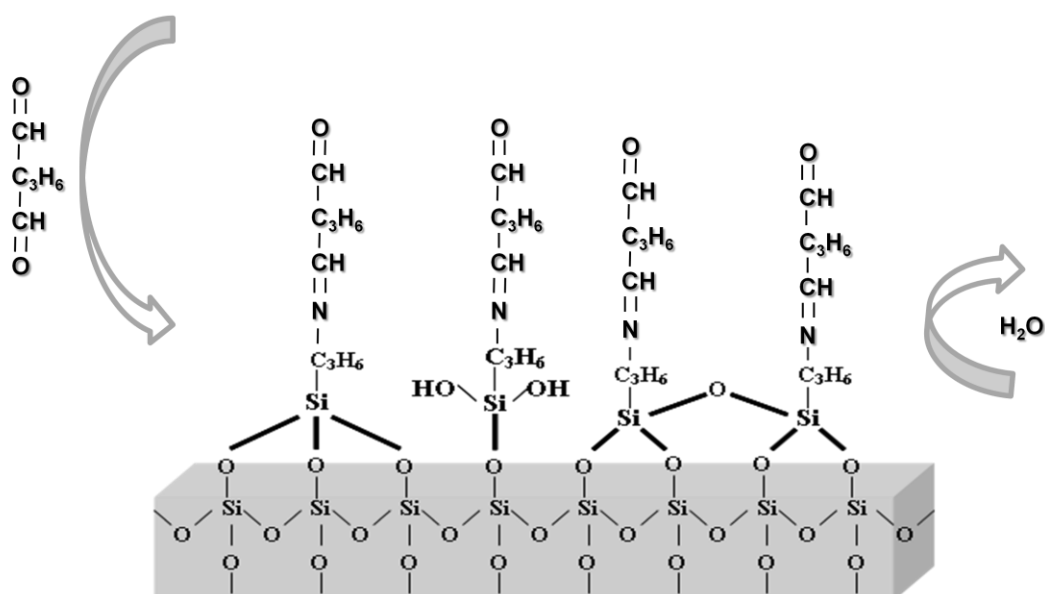
□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Οι τροποποιημένες με APTES επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου εμβαπτίζονται σε υδατικό διάλυμα γλουταραλδεΰδης συγκέντρωσης 2% (ο/ο) επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως οι επιφάνειες εκπλένονται με απεσταγμένο νερό, ξηραίνονται σε ρεύμα αζώτου και αποθηκεύονται σε ξηραντήρα κενού έως ότου χρησιμοποιηθούν.

1. Τροποποίηση επιφάνειας με σιλάνιο APTES



2. Επώαση με διάλυμα γλουταραλδεΐδης για την ομοιοπολική δέσμευση στην επιφάνεια



Σχήμα 27: Αρχή μεθόδου ενεργοποίησης επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με γλουταραλδεΐδη.

5.4 Χημική τροποποίηση επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με το GOPTS

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η σιλανοποίηση των επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με (3-γλυκιδiloξυπροπυλο)τριμεθοξυσιλάνιο (GOPTS) απεικονίζεται στο Σχήμα 28.

Σύμφωνα με τη μέθοδο, υδροφιλοποιημένες επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου επωάζονται με διάλυμα GOPTS σε άνυδρο τολουόλιο προκειμένου να αποφευχθεί η υδρόλυση των εποξειδικών ομάδων του σιλανίου. Τα μόρια του GOPTS συνδέονται ομοιοπολικά με τις σιλανόλες της επιφάνειας με αποτέλεσμα την εισαγωγή εποξειδικών ομάδων στην επιφάνειες οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια για ομοιοπολική πρόσδεση βιομορίων μέσω αντίδρασης με διαθέσιμες σε αυτά αμινομάδες [102].

□ ΥΛΙΚΑ

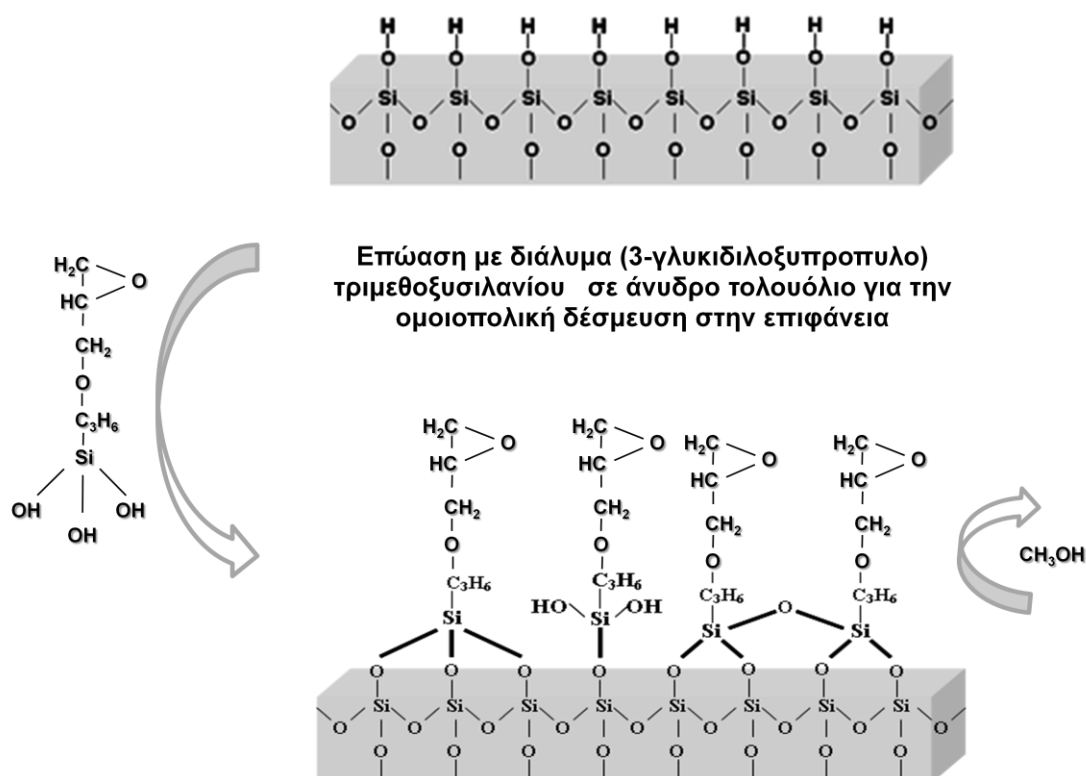
- Υδροφιλοποιημένες επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου
- (3-γλυκιδιλοξυπροπυλο) τριμεθοξυσιλάνιο (GOPTS), (Sigma, St Louis, Mo, ΗΠΑ)
- Υάλινα τρυβλία
- Άνυδρο τολουόλιο (Sigma, St Louis, Mo, ΗΠΑ)
- Απόλυτη αιθυλική αλκοόλη (VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, Γαλλία).

□ ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή παράγωγης υπερήχων (Crest Ultrasonics, Scotch Road Trenton, ΗΠΑ).

□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Οι υδροφιλοποιημένες επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου εμβαπτίζονται σε διάλυμα GOPTS συγκέντρωσης 1% (ο/ο) σε άνυδρο τολουόλιο και ακολουθεί ολονύκτια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, οι επιφάνειες εκπλένονται εις τριπλούν εναλλάξ με τολουόλιο και απόλυτη αιθανόλη, εμβαπτίζονται σε απόλυτη αιθανόλη και καθαρίζονται με υπερήχους επί 20 min. Ακολουθεί ξήρανση σε ρεύμα αζώτου και είτε χρησιμοποιούνται άμεσα για την ακινητοποίηση βιομορίων είτε αποθηκεύονται σε ξηραντήρα κενού για μελλοντική χρήση.



Σχήμα 28: Αρχή μεθόδου σιλανοποίησης επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με GOPTS.

5.5 Μέθοδος επίστρωσης υμενίων AZ σε επιφάνειες πυριτίου

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το πολυμερές AZ5214 είναι ένα φωτοευαίσθητο υλικό το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην μικροηλεκτρονική για την δημιουργία δομών σε επιφάνειες πυριτίου ή άλλες επιφάνειες. Το υλικό αυτό όταν θερμανθεί σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 180 °C λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις διασταύρωσης μεταξύ των αλυσίδων του πολυμερούς που το καθιστούν αδιάλυτο σε υδατικούς και μη διαλύτες και ταυτόχρονα ενεργοποιείται ο φωτοευαίσθητοποιητής και καθίσταται μη ευαίσθητο στο φως. Το υμένιο που δημιουργείται χαρακτηρίζεται από μεγάλη σταθερότητα με υψηλή ικανότητα δέσμευσης πρωτεϊνικών μορίων μέσω προσρόφησης. Η τροποποίηση των επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με υμένιο του πολυμερούς

AZ5214 πραγματοποιείται με επίστρωση δια περιστροφής (spin-coating) κατάλληλου διαλύματος του πολυμερούς στην επιφάνεια πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου. Κατόπιν η επιφάνεια κατεργάζεται σε υψηλή θερμοκρασία ώστε να απομακρυνθεί πλήρως ο διαλύτης και να καταστεί το υμένιο αδιάλυτο και απρόσβλητο από την ακτινοβολία.

□ ΥΛΙΚΑ

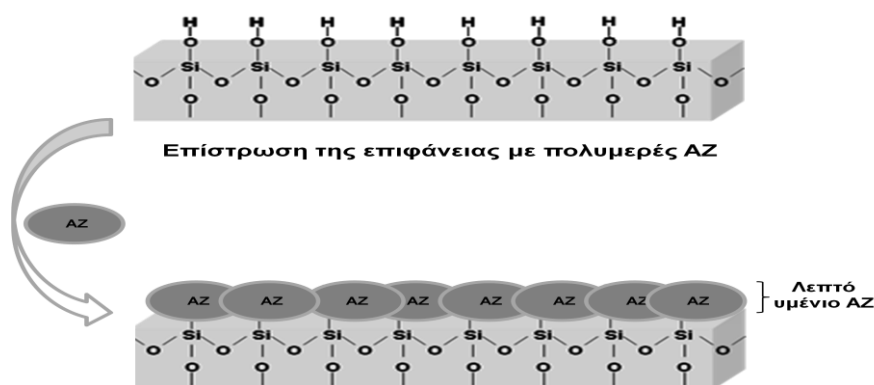
- Υδροφιλοποιημένες επιφάνειες πυριτίου.
- Εξαμεθυλοδισιλάνιο (Sigma, St Louis, Mo, ΗΠΑ)
- AZ5214 (Clariant, Wiesbaden, Γερμανία)
- AZ 726 MIF developer (AZ Electronic Materials, 70 Meister Ave., ΗΠΑ)
- Υάλινα τρυβλία.

□ ΟΡΓΑΝΑ

- AZ 726 MIF developer (AZ Electronic Materials, 70 Meister Ave., ΗΠΑ).

□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Οι υδροφιλοποιημένες επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου επιστρώνονται με διάλυμα εξαμεθυλοδισιλανίου στις 5000 rpm επί 30 sec. Κατόπιν, επιστρώνεται διάλυμα AZ5214 αραιωμένο 10 φορές σε μεθυλοισοβουτυλοκετόνη στις 3000 rpm επί 30 sec. Οι επιφάνειες μεταφέρονται σε επωαστικό κλίβανο όπου παραμένουν επί 1 ώρα σε θερμοκρασία 200 °C. Ακολούθως, ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου και χρησιμοποιούνται ως στερεοί φορείς για την ακινητοποίηση βιομορίων.

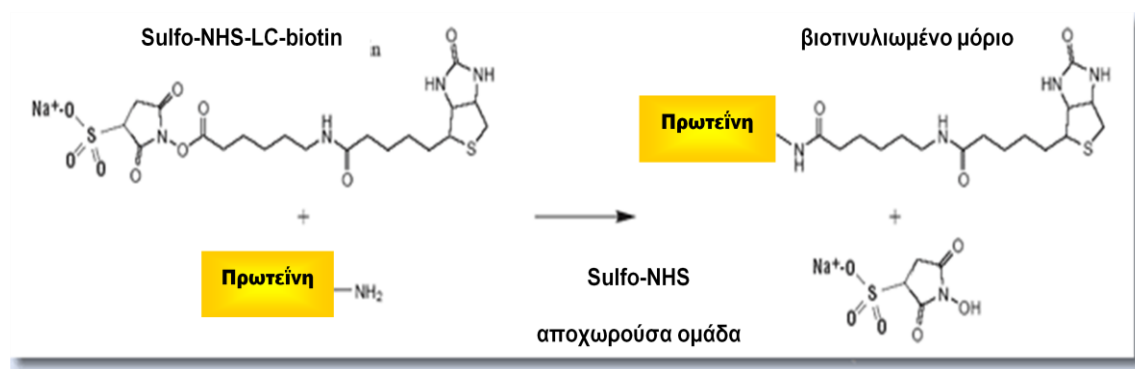


Σχήμα 29: Αρχή μεθόδου επίστρωσης επιφανειών πυριτίου με υμένιο AZ.

5.6 Τροποποίηση πρωτεϊνικών μορίων με βιοτίνη (βιοτινυλίωση)

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εισαγωγή μορίων βιοτίνης σε πρωτεϊνικά μόρια (πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων και αλβουμίνης ορού βοός) πραγματοποιήθηκε με χρήση ενός ενεργού εστέρα της βιοτίνης, του αντιδραστήριου σουλφο-ηλεκτριμηδυλο εστέρας του 6-[(βιοτινυλό)αμινο] εξανοϊκού οξέος (Sulfo-NHS-LC-biotin). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 30, το αντιδραστήριο αυτό διαθέτει μια ενεργή N-υδροξυ-ηλεκτριμηδυλοεστερική ομάδα η οποία αντιδρά με τις πρωτοταγείς αμινομάδες των πρωτεϊνών (κυρίως καταλοίπων λυσίνης) για τον σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού και την παρασκευή του βιοτινυλιωμένου παραγώγου. Η αντίδραση οδηγεί συνήθως στην εισαγωγή πολλαπλών μορίων βιοτίνης ανά μόριο πρωτεΐνης [104].



Σχήμα 30: Αντίδραση σύζευξης πρωτεϊνών με βιοτίνη.

□ ΥΛΙΚΑ

- Πολυκλωνικό και μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (Scripps, SanDiego, ΗΠΑ)
- Πολυκλωνικό αντισώματα έναντι τωνD-διμερών (MyBiosource, SanDiego, ΗΠΑ)
- Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των D-διμερών (Hytest, Turku, Φιλανδία).
- Αλβουμίνη ορού βοός υψηλής καθαρότητας, BSA (Fraction V) (Sigma, StLouis, Mo, ΗΠΑ)
- Σουλφο-ηλεκτριμηδύλο εστέρας του 6-[(βιοτινουύλο)αμινο] εξανοϊκού οξέος (Sulfo-NHS-LC-biotin) (Pierce,Rockford, IL, ΗΠΑ).
- Όξινο ανθρακικό νάτριο, NaHCO_3 , (Merck, Darmstadt, Γερμανία)
- Ανθρακικό νάτριο, Na_2CO_3 , (Merck, Darmstadt, Γερμανία)
- Χλωριούχο νάτριο, NaCl , (Merck, Darmstadt, Γερμανία)
- Νατραζίδιο, NaN_3 , (Merck, Darmstadt, Γερμανία)
- Διμεθυλοσουλφοξειδίο, DMSO, (Sigma, StLouis, Mo, ΗΠΑ)
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma, StLouis, Mo, ΗΠΑ)
- Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο.

□ ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή μέτρησης του pH, model pH 127, (Xenon, Ελλάδα).

□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Ποσότητα πρωτεΐνης (~1mg) διαπιδύεται ολονυκτίως ως προς 4L διαλύματος 0,9% (β/ο) NaCl. Στο διάλυμα που προκύπτει προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών (1 M, pH 9,2) ώστε η τελική συγκέντρωση του αντισώματος να είναι 1 mg/mL. Παράλληλα, παρασκευάζεται διάλυμα Sulfo-NHS-LC-biotin, 100 mg/mL, με διάλυση κατάλληλης ποσότητας σε DMSO.

Από το παραπάνω διάλυμα προστίθεται στο διάλυμα της πρωτεΐνης, στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση, ποσότητα τέτοια ώστε η κατά βάρος αναλογία Sulfo-NHS-LC-biotin προς πρωτεΐνη στο μίγμα να είναι ίση με 1,5:1. Στη συνέχεια το μίγμα επωάζεται επί 2 ώρες στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Στο διάστημα αυτό πραγματοποιείται έντονη ανάδευση του μίγματος κάθε 15 min. Κατόπιν το μίγμα διαπιδύεται ολονυκτίως σε θερμοκρασία 4°C ως προς διάλυμα όξινων ανθρακικών 0,1 M, pH 8,5, που περιέχει 0,15 M NaCl και 0,05% (β/ο) NaN₃.

5.7 Προσδιορισμός συγκέντρωσης βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης σε πρωτεΐνη των διαλυμάτων των βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της μεθόδου Bradford. Η μέθοδος Bradford βασίζεται στη χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Η προσδιοριζόμενη πρωτεΐνη συμπλέκεται με το αντιδραστήριο Bradford και το σύμπλοκο απορροφά ισχυρά στα 595 nm. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης πρωτεϊνών όπως η βόειος αλβουμίνη (BSA), οι γ-σφαιρίνες (IgG), ή άλλη πρωτεΐνη όμοιας δομής με αυτή του προσδιοριζόμενου δείγματος. Για την κατασκευή της καμπύλης των προτύπων χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα γ-σφαιρινών κουνελιού (Σχήμα 31). Τα διαλύματα των βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων αραιώθηκαν ώστε να προκύψουν περισσότερα του ενός διαλύματα με τιμές συγκέντρωσης εντός του εύρους της καμπύλης των προτύπων που κυμαίνεται από 1 έως 10 μg [104]. Η τιμή της συγκέντρωσής των διαλυμάτων αυτών σε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε από τη καμπύλη των προτύπων και ακολούθησε αναγωγή της συγκέντρωσης στο αρχικό διάλυμα.

□ ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα αραιώσης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών χλωριούχων (PBS), 0,01 M, pH 7.4

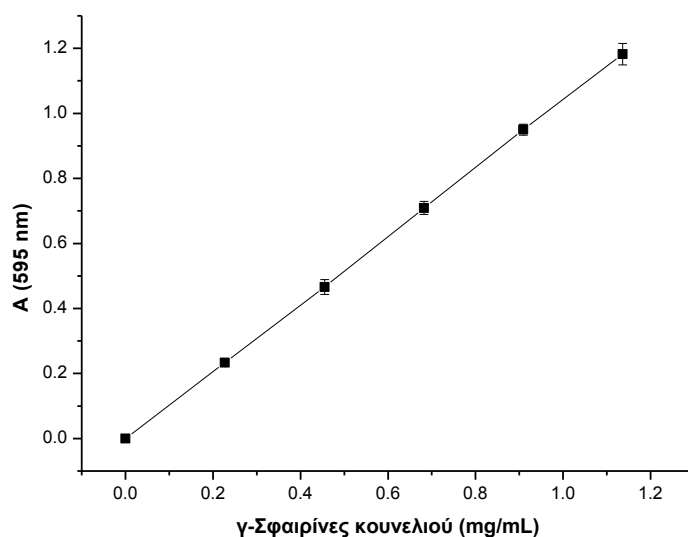
- Βιοτινιλιωμένες πρωτεΐνες (Πολυκλωνικά-μονοκλωνικά αντισώματα, Αλβουμίνη ορού βοός)
- Αντιδραστήριο Bradford: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 διαλύονται σε 50 mL διαλύματος αιθανόλης 95% (v/v). Ακολουθεί προσθήκη 100 mL διαλύματος φωσφορικού οξέος 85 % (v/v), αραίωση με νερό μέχρι 1 L και διήθηση μέσω χάρτου Whatman N° 1
- Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο

□ ΟΡΓΑΝΑ

- Φασματοφωτόμετρο ορατού – υπεριώδους, Phoenix – 2000V, UV-VIS Spectrophotometer.

□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Πρότυπα διαλύματα γ-σφαιρινών κουνελιού, τελικού όγκου 200 μ L και συγκέντρωσης 0,025, 0,050, 0,075, 0,100, 0,125, 0,150, 0,175 mg/mL παρασκευάστηκαν εις διπλούν σε διάλυμα αραίωσης. Τα διαλύματα των προς μέτρηση βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών (200 μ L) παρασκευάστηκαν με 10 φορές αραίωση στο ίδιο διάλυμα στο οποίο παρασκευάστηκαν και τα πρότυπα διαλύματα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 mL αντιδραστηρίου Bradford σε κάθε σωλήνα προτύπου ή δείγματος και ακολούθησε έντονη ανάδευση. Μετά από παραμονή 2 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης των σωλήνων στα 595 nm, και προσδιορίστηκε η τελική τιμή της συγκέντρωσης των αντισωμάτων με αντιστοίχιση στην καμπύλη των προτύπων που κατασκευάστηκε.



Σχήμα 31: Καμπύλη βαθμονόμησης γ-σφαιρινών κουνελιού με τη μέθοδο Bradford (■). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στημέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ S.D.

5.8 Έλεγχος επιτυχίας της βιοτινυλίωσης των πρωτεϊνών

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο έλεγχος της επιτυχίας της αντίδρασης βιοτινυλίωσης γίνεται με ακινητοποίηση της βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης και αντίδραση με σύζευγμα στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης της ραπανίδος, η οποία ανιχνεύεται στην συνέχεια με χρήση χρωμογόνου υποστρώματος H_2O_2 /ABTS [αζινο-δισ-(3-αιθυλοβενζο-θειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)] (Βλέπε Σχήμα 32).

□ ΥΛΙΚΑ

- Βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες (Πολυκλωνικά-μονοκλωνικά αντισώματα, Αλβουμίνη ορού βοός).
- Όξινο ανθρακικό νάτριο, NaHCO_3 (Merck, Γερμανία)
- Ανθρακικό νάτριο, Na_2CO_3 (Merck, Γερμανία)
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4 (Merck, Γερμανία)
- Μονόξινο φωσφορικό νάτριο, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Γερμανία)

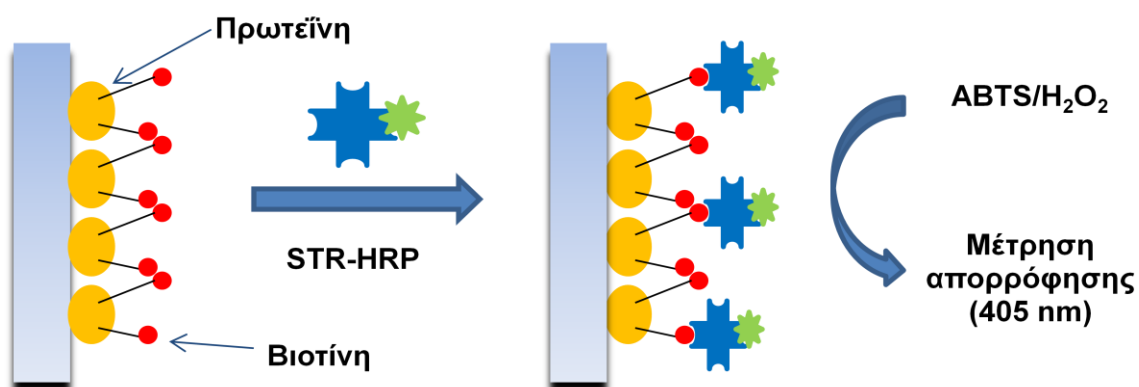
- Χλωριούχο νάτριο, NaCl (Sigma, Η.Π.Α.)
- Αιθυλο-υδραργυρο-θειο-σαλικυλικό οξύ σε μορφή άλατος με νάτριο (Thimerosal, Janssen Chimica, Βέλγιο)
- Ένυδρο υπερβορικό νάτριο ($\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, Γερμανία)
- 2,2-αζινο-δις-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-)σουλφονικό οξύ, ABTS (Sigma, Η.Π.Α.)
- Σύζευγμα στρεπταβιδίνης με υπεροξειδάση της ραπανίδος (streptavidin-HRP) (Sigma Chemical Co, Γερμανία)
- Διάλυμα προσρόφησης πρωτεϊνών: Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,2
- Διάλυμα αποκλεισμού ελεύθερων θέσεων δέσμησης του πλαστικού: διάλυμα όξινων ανθρακικών, 0,1 M, pH 8,5, 1% (w/v) BSA
- Διάλυμα αντίδρασης με τη streptavidin-HRP: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM pH 7,4, με 0,9% (w/v) NaCl, 1% (w/v) BSA, 0,02% (w/v) (Thimerosal, Βέλγιο)
- Διάλυμα υποστρώματος της υπεροξειδάσης: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/κιτρικών 50 mM, pH 4,4 που περιέχει 3,2 mM $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ και 1,9 mM ABTS.
- Διαφανή φρεάτια μικροτιτλοδότησης από πολυστυρένιο Nunc Immunomodules F8 (Nunc, Δανία.)
- Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο.

□ ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης ELISA, (Labsystems, Multiskan RC, Φιλανδία).
- Συσκευή μέτρησης του pH, model pH 127, (Xenon, Ελλάδα).

□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης προστίθενται 100 μl διαλύματος βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης 0,5 $\mu\text{g/ml}$ και επωάζονται 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Για τον προσδιορισμό του σήματος υποβάθρου, φρεάτια επωάζονται με διάλυμα μη τροποποιημένης με βιοτίνη BSA. Τα φρεάτια εκπλένονται τρεις φορές με 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0,05M, pH 7,0, 0,9% (w/v) NaCl και ακολούθως προστίθενται ανά φρεάτιο 300 μl από το διάλυμα κάλυψης των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης και ακολουθεί επώαση για 30 min. Τα φρεάτια εκπλένονται δυο φορές με 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0,05M, pH 7,4 0,9% (w/v) NaCl. Στη συνέχεια, προστίθενται σε κάθε φρεάτιο 100 μl διαλύματος αντίδρασης με streptavidin-HRP συγκέντρωσης 250 ng/ml και ακολουθεί επώαση για 30 min. Τα φρεάτια εκπλένονται τρεις φορές όπως προηγουμένως και προστίθενται 100 μl διαλύματος υποστρώματος της υπεροξειδάσης για 15 min υπό συνεχή ανάδευση, οπότε και δημιουργείται έγχρωμο προϊόν. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 405 nm. Οι τιμές απορρόφησης που ελήφθησαν όπως και οι συγκεντρώσεις των βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων που προσδιορίστηκαν με μέθοδο Bradford συνοψίζονται στον ακολουθο Πίνακα 3. Όπως προκύπτει από τις τιμές της απορρόφησης που ελήφθησαν για τα διαφορετικά αντισώματα, σε όλες τις περιπτώσεις η βιοτινυλίωση ήταν επιτυχής.



Σχήμα 32: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου ελέγχου της βιοτινυλίωσης πρωτεϊνών.

Πίνακας 3: Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης και έλεγχος βιοτινυλίωσηςαντισωμάτων

Βιοτινυλιωμένο Αντίσωμα (b-Ab)	Αναλύτης	Συγκέντρωση (mg/mL) <i>Μέθοδος Bradford</i>	Έλεγχος βιοτινυλίωσης <i>A ± S.D. (405 nm)</i>
b-GC019	CRP	1,01	1,303 ± 0,034
b-MC017	CRP	0,98	1,297 ± 0,062
b-M6404	CRP	0,97	1,357 ± 0,023
b-M6405	CRP	0,96	1,407 ± 0,040
b-GDD	D-dimers	0,95	1,324 ± 0,049
b-MDD2	D-dimers	0,92	1,225 ± 0,059
b-MDD4	D-dimers	0,91	1,356 ± 0,074
b-MDD5	D-dimers	1,03	1,296 ± 0,044
b-MDD6	D-dimers	0,99	1,277 ± 0,032
b-MDD41	D-dimers	1,02	1,377 ± 0,045

5.9 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων CRP και D-dimers σε ρυθμιστικά διαλύματα και ανθρώπινο φυσιολογικό ορό

Προκειμένου να επιλεγεί η καταλληλότερη μήτρα για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων, παρασκευάστηκαν διάφορες σειρές προτύπων διαλυμάτων των δύο αναλυτών, CRP και D-dimers, σε ρυθμιστικά διαλύματα καθώς και σε φυσιολογικό ανθρώπινο ορό αίματος ελεύθερου CRP και D-dimers, με προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων από πυκνά μητρικά διαλύματα. Η βαθμονόμηση των προτύπων πραγματοποιήθηκε για την CRP με εμπορικά διαθέσιμο μη ανταγωνιστικό ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό της εταιρείας

DIA source ImmunoAssays S.A. ενώ για τα D-dimers με εμπορικά διαθέσιμο μη ανταγωνιστικό ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό της εταιρείας RayBiotech, Inc. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες βαθμονόμησης των δύο προσδιορισμών παρουσιάζονται στο Σχήμα 33.

□ ΥΛΙΚΑ

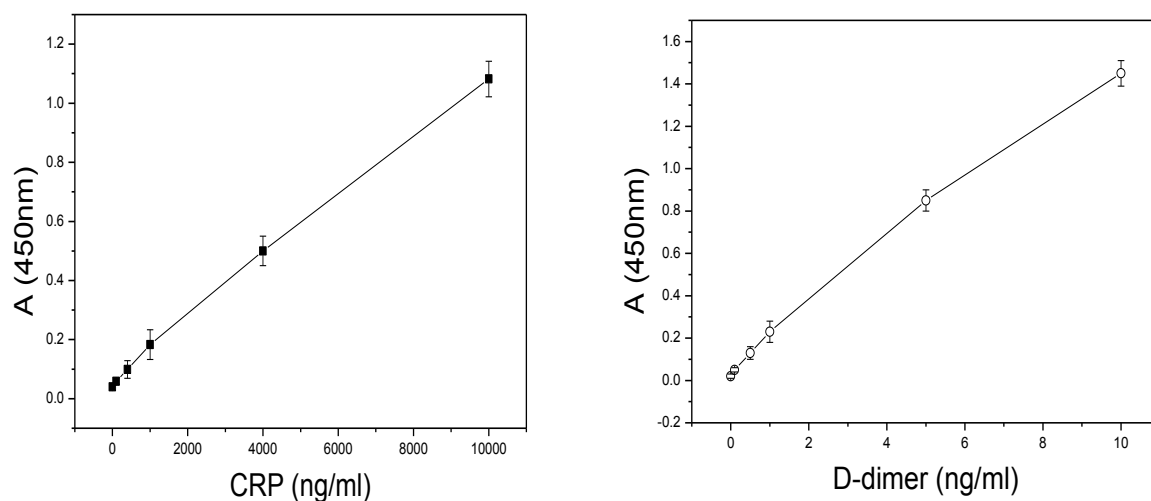
- Πρότυπο διάλυμα CRP: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, με συγκέντρωση 5,25 mg/mL, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris, 280 mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 8.0 που περιέχει NaN₃ (Scripps, San Diego, ΗΠΑ).
- Πρότυπο διάλυμα D-dimers: D-διμερές, με συγκέντρωση 1 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, 0,01 M, pH 7,4 που περιέχει NaN₃ 0,1 % (w/o) (Hytest, Turku, Finland).
- Φυσιολογικός ανθρώπινος ορός αίματος, απαλλαγμένος από CRP και D-dimers και ελεύθερος λιπιδίων (Scantibodies Laboratory, USA).
- Φίλτρα διήθησης με διάμετρο πόρων 0,22 μ m και 0,45 μ m (Millipore, Bedford, Ireland).
- Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο.

□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 που περιέχει 0,9% (w/v) NaCl και 1% (w/v) προστίθενται ποσότητες CRP και D-dimers ώστε να προκύψουν πρότυπα μητρικά με τελική συγκέντρωση να είναι 10 μ g/mL. Κατάλληλες ποσότητες από τα πρότυπα μητρικά διαλύματα προστίθενται σε ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να παρασκευαστούν πρότυπα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων για κάθε ουσία ξεχωριστά καθώς και για τις δύο ουσίες μαζί.

Για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων σε ανθρώπινο πλάσμα απαλλαγμένο από CRP και D-dimers, το πλάσμα θερμάνθηκε επί 20 min στους 57 °C ώστε να απενεργοποιηθούν τα πρωτεολυτικά ένζυμα και ακολούθησε καθαρισμός από φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,45 μ m και 0,22 μ m

για την απομάκρυνση συσσωματωμάτων. Στο διήθημα προστέθηκε συντηρητικό NaN_3 (0,05% w/v) και χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων. Για τον σκοπό αυτό προστέθηκαν στον κατεργασμένο ορό κατάλληλες ποσότητες από τα πρότυπα μητρικά διαλύματα ώστε να προκύψουν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων για κάθε ουσία ξεχωριστά καθώς και για τις δύο ουσίες μαζί. Ακολούθησε βαθμονόμηση των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν τόσο σε ρυθμιστικό διάλυμα όσο και ανθρώπινο ορό με χρήση εμπορικά διαθέσιμων συσκευασιών ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών της CRP (hs-CRP, DIA source Immunoassays S.A., Louvain-la-Neuve, Belgium) και των D-dimers (D-Dimer BioAssayTM, United States Biological, Salem, MA, ΗΠΑ) σε ανθρώπινο πλάσμα. Ο ενζυμοανοσοχημικός προσδιορισμός που χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμονόμηση των προτύπων της CRP είχε όριο ανίχνευσης 50 ng/mL και γραμμική περιοχή ως τα 10 µg/mL. Ο ανοσοχημικός προσδιορισμός που χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμονόμηση των προτύπων των D-dimers είχε όριο ανίχνευσης 0,1 pg/mL και γραμμική περιοχή ως τα 10 pg/mL. Η βαθμονόμηση προτύπων διαλυμάτων με συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τα ανώτερα όρια του δυναμικού εύρους των δύο προσδιορισμών πραγματοποιήθηκε μετά από κατάλληλη αραιώση τους. Αντίθετα για τη παρασκευή προτύπων με συγκεντρώσεις μικρότερες από τα όρια ανίχνευσης των δύο προσδιορισμών βαθμονομήθηκαν αρχικά πυκνότερα διαλύματα τα οποία στην συνέχεια αραιώθηκαν κατάλληλα. Με βάση τη βαθμονόμηση, οι σειρές των προτύπων διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν κυμαίνονταν από 0,1 έως 10000 ng/mL τόσο για τη CRP όσο και για τα D-dimers. Μετά την βαθμονόμηση τα πρότυπα διαλύματα κατανεμήθηκαν σε ποσότητες των 20 µL και φυλάχθηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Σχήμα 33: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες βαθμονόμησης των εμπορικά διαθέσιμων ενζυμοανασοχημικών προσδιορισμών της CRP(■) και D-dimers (○). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριων επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ S.D.

5.10 Μέθοδος ανοσοενζυμομετρικού προσδιορισμού της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σύμφωνα με τη μέθοδο, διαφανή φρεάτια μικροτιτλοδότησης στα οποία έχει προσροφηθεί αντίσωμα (πολυκλωνικό ή μονοκλωνικό) κατά της CRP και έχουν αποκλειστεί οι κενές θέσεις δέσμευσης με αδρανή πρωτεΐνη (BSA), επωάζονται με πρότυπα διαλύματα CRP ή δείγματα και στη συνέχεια με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της CRP το οποίο είναι βιοτινυλιωμένο. Μετά το πέρας της ανοσοαντίδρασης, προστίθεται το σύζευγμα STR-HRP το οποίο δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ανοσοσυμπλέγματα μέσω της βιοτίνης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της CRP πραγματοποιείται ύστερα από προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος της υπεροξειδάσης H_2O_2 /ABTS και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm.

□ ΥΛΙΚΑ

- Πρότυπα διαλύματα CRP (κεφάλαιο 5.9)

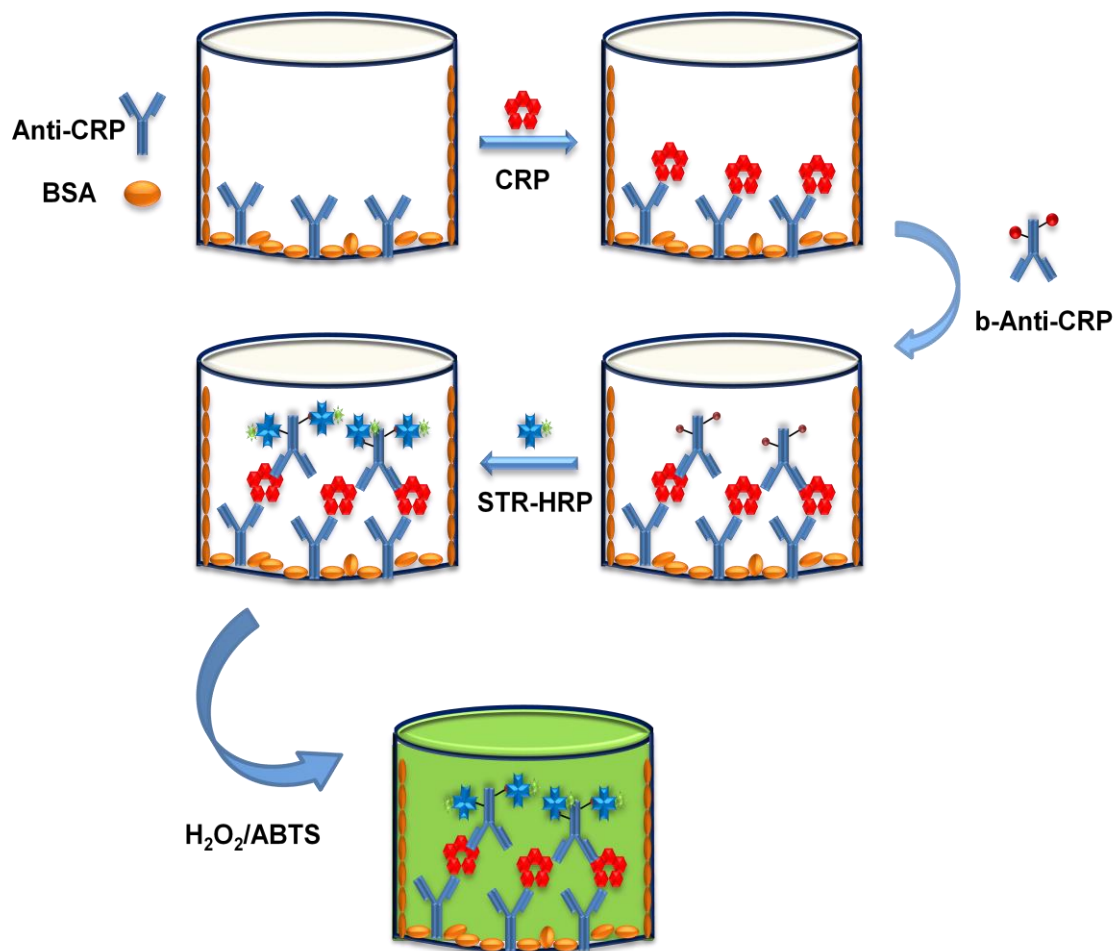
- Πολυκλωνικό ή μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της CRP
- Βιοτινυλιωμένο πολυκλωνικό αντισώματα έναντι της CRP
- Σύζευγμα streptavidin-HRP
- Διάλυμα ακινητοποίησης αντισωμάτων: Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,2
- Διάλυμα αποκλεισμού ελεύθερων θέσεων δέσμευσης του πλαστικού: διάλυμα όξινων ανθρακικών, 0,1 M, pH 8,5, 1% (β/ο) BSA
- Διάλυμα έκπλυσης 1: PBS, 0,05 M, pH 7,4
- Διάλυμα έκπλυσης 2: PBS, 0,05 M, pH 7,4 που περιέχει 0,05% (ο/ο) Tween 20
- Ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης: Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,8 που περιέχει 0,9% (β/ο) NaCl, 0,5 % (β/ο), ανοσοσφαιρίνες γ βοός και 0,5 % (β/ο) BSA
- Διάλυμα αραίωσης της streptavidin-HRP: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM pH 7,4, με 0,9% (β/ο) NaCl, 1% (β/ο) BSA, 0,02% (β/ο) Thimerosal
- Διάλυμα υποστρώματος της υπεροξειδάσης: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/κιτρικών 50 mM, pH 4,4 που περιέχει 3,2 mM $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ και 1,9 mM ABTS.
- Διαφανή φρεάτια μικροτιτλοδότησης από πολυστυρένιο NuncImmunoModulesF8 (Nunc, Δανία)
- Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο

□ ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης ELISA, (Labsystems, Multiskan RC, Φιλανδία).

□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Φρεάτια μικροτιτλοδότησης επωάστηκαν με 100 μL διαλύματος αντισώματος έναντι της CRP συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g/mL}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης ολονύχτια σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το υγρό αποχύθηκε και τα φρεάτια εκπλύθηκαν 2 φορές με 300 μL διαλύματος έκπλυσης 1. Μετά την έκπλυση, στα φρεάτια προστέθηκαν 300 μL διαλύματος αποκλεισμού των κενών θέσεων και ακολούθησε επώαση επί 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, τα φρεάτια εκπλύθηκαν όπως προηγουμένως και προστέθηκαν σε αυτά 100 μL προτύπου διαλύματος ή αγνώστου δείγματος κατάλληλα αραιωμένου σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Ακολούθησε επώαση επί 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα φρεάτια εκπλύθηκαν όπως προηγουμένως και ακολούθησε προσθήκη 100 μL διαλύματος βιοτινυλιωμένου πολυκλωνικού αντισώματος κατά της CRP συγκέντρωσης 5,0 $\mu\text{g/mL}$ σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση, επί 60 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια, αποχύθηκε η υγρή φάση και τα φρεάτια εκπλύθηκαν 4 φορές με 300 μL διαλύματος έκπλυσης 2. Ακολούθησε προσθήκη 100 μL διαλύματος STR-HRP συγκέντρωσης 250 ng/mL στο αντίστοιχο διάλυμα αραιώσης και επώαση υπό ανάδευση, επί 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα φρεάτια εκπλήθηκαν 4 φορές με 300 μL διαλύματος έκπλυσης 2. Μετά την τελική έκπλυση σε κάθε φρεάτιο προστέθηκαν 100 μL διαλύματος υποστρώματος της HRP και ακολούθησε ανάδευση επί 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 405 nm με συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης (ELISAreader).



Σχήμα 34: Σχηματική αναπαράσταση ανοσοενζυμικού προσδιορισμού της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

5.11 Μέθοδος ανοσοενζυμομετρικού προσδιορισμού των D-διμερών (D-dimers) σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σύμφωνα με τη μέθοδο, διαφανή φρεάτια μικροτιτλοδότησης, στα οποία έχει ακινητοποιηθεί αντίσωμα (πολυκλωνικό ή μονοκλωνικά) έναντι των D-dimers και έχουν αποκλειστεί οι κενές θέσεις δέσμευσης με αδρανή πρωτεΐνη (BSA), επωάζονται με πρότυπα διαλύματα D-dimers ή κατάλληλα αραιωμένα δείγματα και στη συνέχεια με μίγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των D-dimers τα οποία είναι βιοτινυλιωμένα. Μετά το πέρας της ανοσοαντίδρασης, προστίθεται σύζευγμα STR-HRP το οποίο δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ανοσοσυμπλέγματα μέσω της βιοτίνης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των D-

dimers πραγματοποιείται ύστερα από προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος της υπεροξειδάσης H_2O_2 /ABTS και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm (Σχήμα 35).

□ ΥΛΙΚΑ

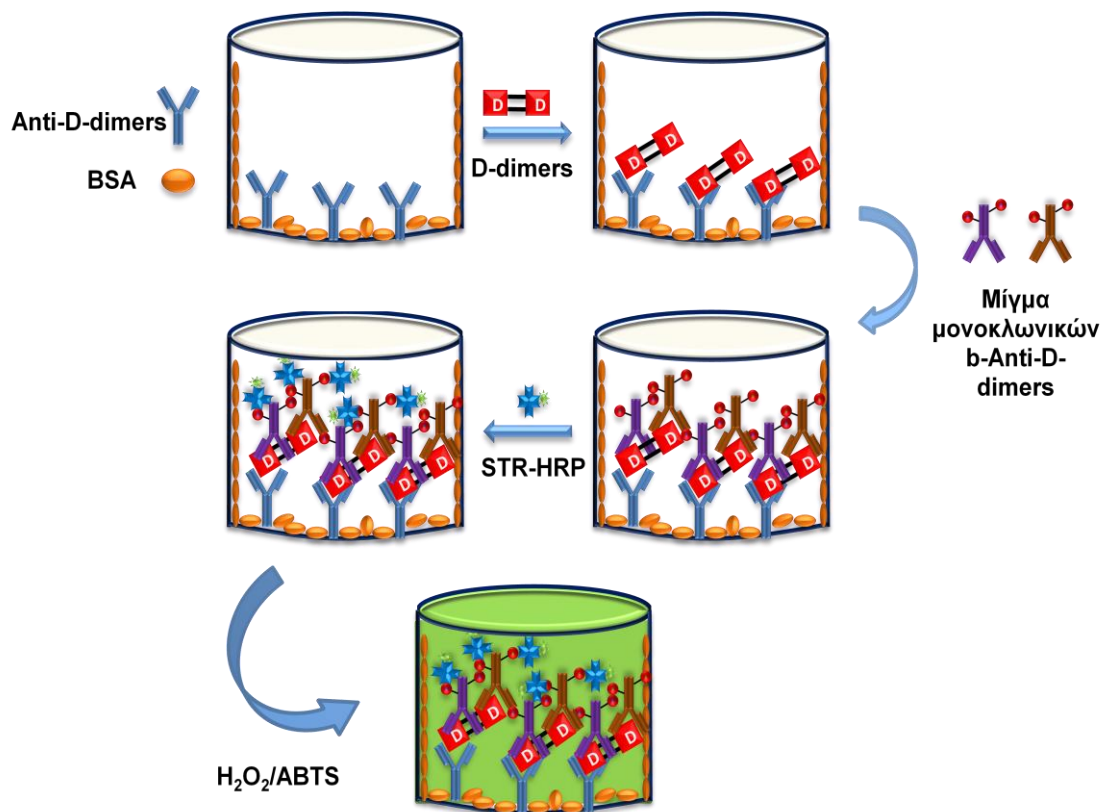
- Πρότυπα διαλύματα D-dimers(κεφάλαιο 5.9)
- Πολυκλωνικό ή μονοκλωνικά αντισώματα έναντι τωνD-dimers
- Βιοτινυλιωμένα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των D-dimers
- Σύζευγμα streptavidin-HRP
- Διάλυμα ακινητοποίησης αντισωμάτων: Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,2
- Διάλυμα αποκλεισμού ελεύθερων θέσεων δέσμευσης του πλαστικού: διάλυμα όξινων ανθρακικών, 0,1 M, pH 8,5, 1% (β/o) BSA
- Διάλυμα έκπλυσης 1: PBS, 0,05 M, pH 7,4
- Διάλυμα έκπλυσης 2: PBS, 0,05 M, pH 7,4 που περιέχει 0,05% (o/o) Tween 20
- Ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης: Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,8 που περιέχει 0,9% (β/o) NaCl, 0,5 %_o (β/o) ανοσοσφαιρίνες γ βοός και 0,5 % (β/o) BSA
- Διάλυμα αραίωσης της streptavidin-HRP: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM pH 7,4, με 0,9% (β/o) NaCl, 1% (β/o) BSA, 0,02% (β/o) Thimerosal
- Διάλυμα υποστρώματος της υπεροξειδάσης: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/κιτρικών 50 mM, pH 4,4 που περιέχει 3,2 mM $NaBO_2 \cdot H_2O_2 \cdot 3H_2O$ και 1,9 mM ABTS.
- Διαφανή φρεάτια μικροτιτλοδότησης από πολυστυρένιο NuncImmunoModulesF8 (Nunc, Δανία)
- Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο.

□ ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης ELISA, (Labsystems, Multiskan RC, Φιλανδία).

□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Φρεάτια μικροτιτλοδότησης επωάστηκαν με 100 μL διαλύματος αντισώματος έναντι των D-dimers συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g/mL}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης ολονύχτια σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το υγρό αποχύθηκε και τα φρεάτια εκπλύθηκαν 2 φορές με 300 μL διαλύματος έκπλυσης 1. Μετά την έκπλυση, στα φρεάτια προστέθηκαν 300 μL διαλύματος αποκλεισμού των κενών θέσεων και ακολούθησε επώαση επί 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, τα φρεάτια εκπλύθηκαν όπως προηγουμένως και προστέθηκαν σε αυτά 100 μL προτύπου διαλύματος ή αγνώστου δείγματος κατάλληλα αραιωμένου σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Ακολούθησε επώαση επί 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα φρεάτια εκπλύθηκαν όπως προηγουμένως και ακολούθησε προσθήκη 100 μL μίγματος βιοτινυλιωμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά των D-dimers συγκέντρωσης 5,0 $\mu\text{g/mL}$ σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση, επί 60 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια, αποχύθηκε η υγρή φάση και τα φρεάτια εκπλύθηκαν 4 φορές με 300 μL διαλύματος έκπλυσης 2. Ακολούθησε προσθήκη 100 μL διαλύματος STR-HRP συγκέντρωσης 250 ng/mL στο αντίστοιχο διάλυμα αραίωσης και επώαση υπό ανάδευση, επί 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα φρεάτια εκπλήθηκαν 4 φορές με 300 μL διαλύματος έκπλυσης 2. Μετά την τελική έκπλυση σε κάθε φρεάτιο προστέθηκαν 100 μL διαλύματος υποστρώματος της HRP και ακολούθησε ανάδευση επί 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 405 nm με συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης (ELISAreader).



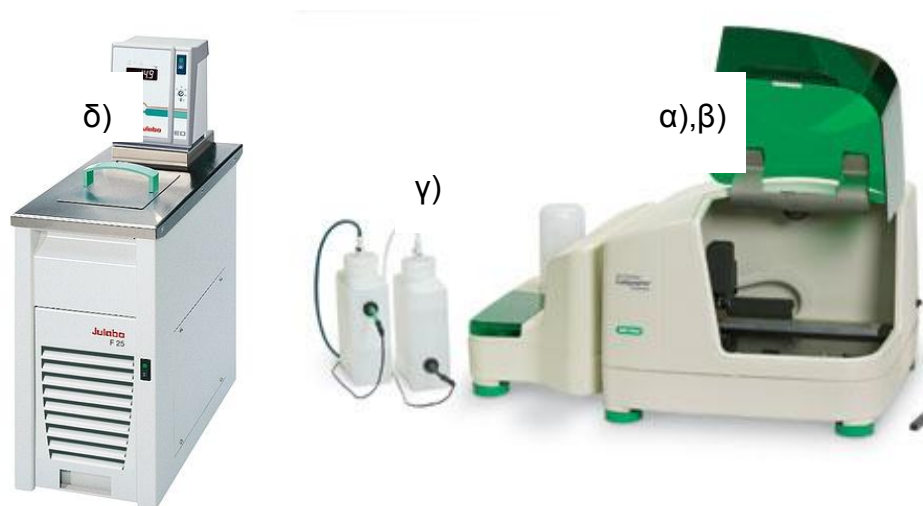
Σχήμα 35: Σχηματική αναπαράσταση του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού των D-διμερών σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

5.12 Μέθοδος εναπόθεσης βιομορίων αναγνώρισης σε επιφάνειες πυριτίου και κατασκευή πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση αυτόματης συσκευής εναπόθεσης μικροκηλίδων με την οποία μικρός όγκος διαλύματος του βιοδραστικού μορίου τοποθετείται σε προκαθορισμένες θέσεις στην ενεργοποιημένη επιφάνεια του πυριτίου. Στην παρούσα εργασία η μέθοδος εφαρμόστηκε για την δημιουργία ζωνών αντισωμάτων στην επιφάνεια πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με διαστάσεις $5 \times 1 \text{ mm}^2$. Αυτό επιτεύχθηκε με την εναπόθεση στην επιφάνεια πολλαπλών αλληλεπικαλυπτόμενων κηλίδων διαμέτρου περίπου $300 \mu\text{m}$. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τον σχηματισμό των ζωνών στις επιφάνειες είναι η BioOdyssey Calligrapher™ MiniArrayer της Bio-Rad (Εικόνα 4). Η συσκευή αποτελείται από τα ακόλουθα:

- έναν στεγανό θάλαμο (α) με ενσωματωμένη μονάδα για τον έλεγχο της υγρασίας (β) και ρομποτικό σύστημα κίνησης των ακίδων
- δύο πλαστικούς περιέκτες για την αποθήκευση του διαλύματος έκπλυσης της βελόνας και τη συλλογή των υγρών της έκπλυσης (γ),
- μια εξωτερικά συνδεδεμένη αντλία που διοχετεύει αέρα κατά τη διάρκεια των εκπλύσεων για το στέγνωμα της ακίδας, καθώς και μια μονάδα για τον έλεγχο της θερμοκρασίας στο εσωτερικό του θαλάμου (δ).
- ρομποτικό βραχίονα ο οποίος κινείται καθέτως και οριζοντίως με ακρίβεια $\pm 2,5 \mu\text{m}$ και φέρει κεφαλή στην οποία τοποθετούνται ακίδες (τριχοειδείς ή συμπαγείς) μέσω των οποίων πραγματοποιείται η μεταφορά του διαλύματος από τα φρεάτια μικροτιτλοδότησης στην επιφάνεια του πλακιδίου.



Εικόνα 4 : Συσκευή αυτόματης εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey Calligrapher™ MiniArrayer της Bio-Rad.

□ ΥΛΙΚΑ

- Ενεργοποιημένες επιφάνειες πυριτίου.
- Πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της CRP και των D-dimers.

- Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 0,05M, pH 9,2 ακινητοποίησης αντισωμάτων.
- Διάλυμα έκπλυσης των ακίδων μεταφοράς των βιομορίων 1% (v/v) Triton X100 σε απεσταγμένο νερό.
- Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο.

□ ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή αυτόματης εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey CalligrapherTM MiniArrayer της Bio-Rad, (Bio-Rad Laboratories inc., California, Η.Π.Α.).

□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Εντός του θαλάμου της συσκευής τοποθετούνται οι επιφάνειες στις οποίες πρόκειται να γίνει η εναπόθεση καθώς και το πλακίδιο με τα φρεάτια που φέρουν τα διαλύματα για εναπόθεση. Για την έκπλυση των ακίδων υπάρχει εντός του θαλάμου λουτρό στο οποίο τοποθετείται διάλυμα 1% (o/o) TritonX100 σε απεσταγμένο νερό, καθώς και μια διάταξη για την έκπλυση των ακίδων με απεσταγμένο νερό και στέγνωμα με ρεύμα αέρα. Για την κατασκευή των μικροσυστοιχιών χρησιμοποιήθηκαν συμπαγείς ακίδες που διέθεταν πεπλατυσμένη κεφαλή διαμέτρου 375 μm (Εικόνα 5). Η ακίδα καθοδηγείται μέσω του λογισμικού ελέγχου της συσκευής στο φρεάτιο που περιέχει το δείγμα που θέλουμε να εναποθέσουμε και εμβαπτίζεται. Δημιουργείται έτσι ένα υμένιο από το διάλυμα στην άκρη της ακίδας. Στη συνέχεια, η ακίδα οδηγείται στο πλακίδιο όπου εναποθέτει με επαφή το διάλυμα σε συγκεκριμένη θέση δημιουργώντας μια κηλίδα μεγέθους περίπου 300-400 μm . Οι τιμές των διαφόρων παραμέτρων εναπόθεσης που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.



Εικόνα 5 : Συμπαγής ακίδα εναπόθεσης μικροκηλίδων για την κατασκευή μικροσυστοιχιών.

Πίνακας 4 : Παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την εναπόθεση των διαλυμάτων στις επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου.

Θάλαμος	
Θερμοκρασία	15 °C
Υγρασία	72 % (v/v)
Πλήρωση ακίδας	
Ταχύτητα προσέγγισης ακίδας στο φρεάτιο	15 mm/s
Χρονική διάρκεια εμβάπτισης της ακίδας στο φρεάτιο	1000 ms
Ταχύτητα απομάκρυνσης της ακίδας από το φρεάτιο	15 mm/s
Εναπόθεση διαλύματος	
Ταχύτητα προσέγγισης ακίδας στο πλακίδιο	10 mm/s
Χρονική διάρκεια εναπόθεσης του διαλύματος	25 ms
Θέση z-άξονα	0 mm

5.13 Ακίνητοποίηση των βιομορίων στις επιφάνειες πυριτίου

□ ΥΛΙΚΑ

- Ενεργοποιημένες επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου
- Πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα, βιοτινυλιωμένα και μη, έναντι της CRP και των D-dimers
- Διάλυμα ακίνητοποίησης αντισωμάτων: Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,2

- Διάλυμα αποκλεισμού ελεύθερων θέσεων δέσμευσης του πλαστικού: διάλυμα όξινων ανθρακικών, 0,1 M, pH 8,5, 1% (β/o) BSA
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50mM, pH 7,4, που περιέχει 0,9% (β/o) NaCl
- Στρεπταβιδίνη (ImmunoPure Streptavidin, Pierce, Η.Π.Α.)
- Βιοτινυλιωμένη αλβουμίνη ορού βοός
- Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο.

□ ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή αυτόματης εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey Calligrapher™ MiniArrayer της Bio-Rad, (Bio-Rad Laboratories inc., California, Η.Π.Α.).

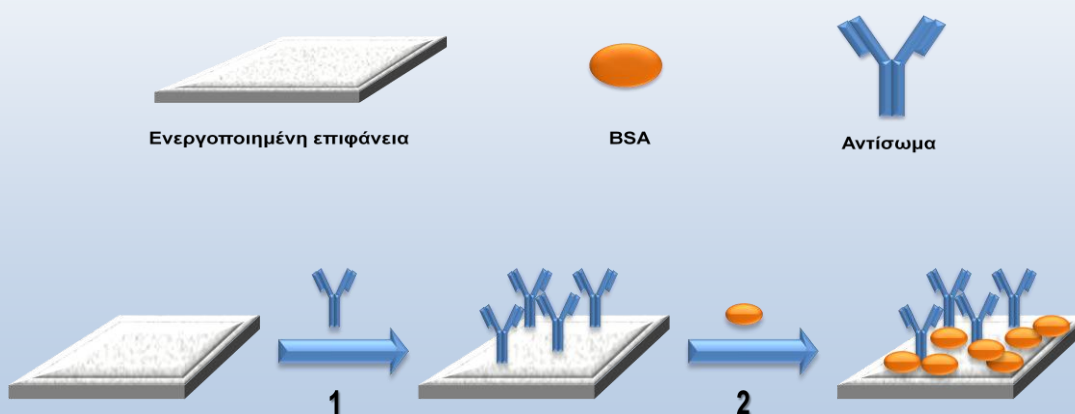
5.13.1 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης I: Απευθείας ακινητοποίηση αντισώματος σε ενεργοποιημένη επιφάνεια πυριτίου

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η απευθείας ακινητοποίηση των αντισωμάτων στις ενεργοποιημένες επιφάνειες πυριτίου συνίσταται στην εναπόθεση διαλυμάτων των αντισωμάτων στις επιφάνειες και επώαση κατά την οποία τα αντισώματα προσδένονται στην επιφάνεια είτε μέσω φυσικής προσρόφησης ή ομοιοπολικής σύνδεσης.

Πρωτόκολλο ακινητοποίησης I

- 1) Ακινητοποίηση του αντισώματος στην ενεργοποιημένη επιφάνεια πυριτίου.
- 2) Επώαση με διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης πάνω στην επιφάνεια.



□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Εντός του θαλάμου της συσκευής εναπόθεσης μικροκηλίδων τοποθετούνται οι τροποποιημένες επιφάνειες καθώς και το πλακίδιο με τα φρεάτια που φέρουν τα διαλύματα για εναπόθεση. Τα προς ακινητοποίηση αντισώματα είναι αραιωμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης σε συγκέντρωση 200 $\mu\text{g/mL}$. Ακολουθεί μεταφορά του διαλύματος των αντισωμάτων από τα φρεάτια σε καθορισμένες περιοχές στην επιφάνεια πυριτίου με χρήση συμπαγούς ακίδας και ολονύχτια επώαση σε θάλαμο σταθερής υγρασίας (~70%) ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύματος που έχει αποτεθεί. Στην συνέχεια οι επιφάνειες εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και ακολουθεί ολονύκτια επώαση με το διάλυμα αποκλεισμού. Ακολούθως οι επιφάνειες εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του αναλύτη το αντίσωμα έναντι του οποίου έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια.

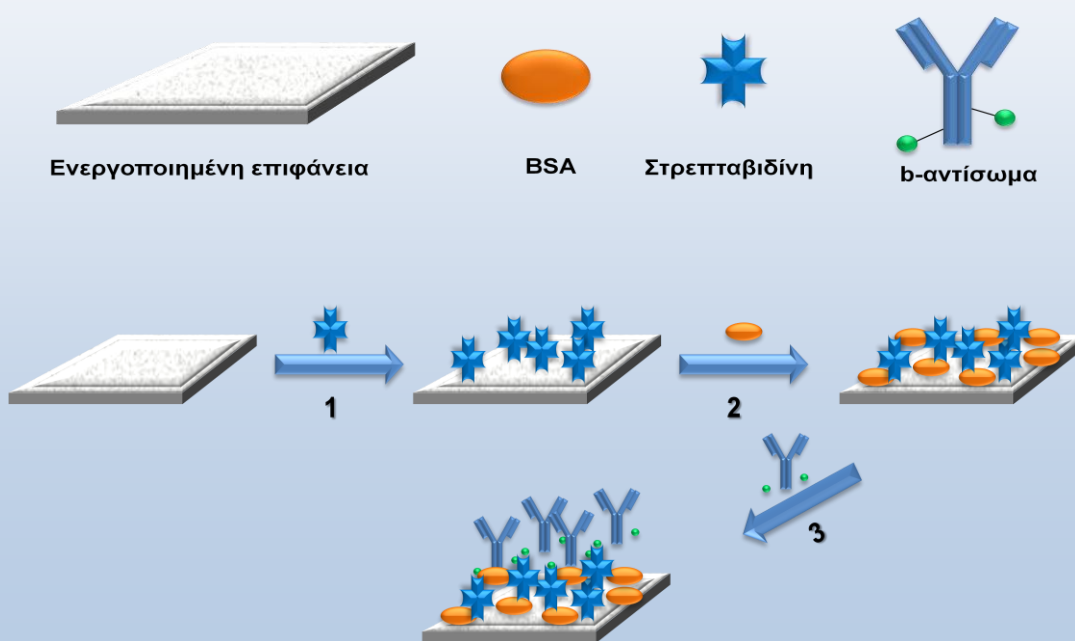
5.13.2 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης II: Ακινητοποίηση βιοτινυλιωμένου αντισώματος μέσω στρεπταβιδίνης προσροφημένης σε στερεό φορέα

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ακινητοποίηση αντισωμάτων μέσω στρεπταβιδίνης προσροφημένης στις ενεργοποιημένες επιφάνειες πραγματοποιείται μετά από τροποποίηση του αντισώματος με εισαγωγή μορίων βιοτίνης. Με αυτό τον τρόπο εκμεταλλευόμαστε την υψηλή σταθερά σύνδεσης της βιοτίνης με την στρεπταβιδίνη για την σταθερή ακινητοποίηση των αντισωμάτων στις επιφάνειες. Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί της απευθείας ακινητοποίησης των ειδικών αντισωμάτων στον στερεό φορέα ως προς την διατήρηση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου αντισώματος. Αυτό είναι αποτέλεσμα του γεγονότος ότι το αντίσωμα διατηρεί σε μεγάλο βαθμό την τριτοταγή δομή που έχει στο διάλυμα καθώς δεν αλληλεπιδρά με την στερεά επιφάνεια. Επίσης το αντίσωμα είναι πιο διαθέσιμο για αντίδραση καθώς μειώνονται σημαντικά οι στερεοχημικές παρεμποδίσεις από την επιφάνεια.

Πρωτόκολλο ακινητοποίησης II

- 1) Ακινητοποίηση της στρεπταβιδίνης στην ενεργοποιημένη επιφάνεια πυριτίου μέσω προσρόφησης
- 2) Επώαση με διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης πάνω στην επιφάνεια.
- 3) Ακινητοποίηση του βιοτινυλιωμένου αντισώματος στην επιφάνεια μέσω σύνδεσης βιοτίνης-στρεπταβιδίνης.



□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Αρχικά πραγματοποιείται ολονύκτια επώαση της ενεργοποιημένης επιφάνειας με διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g/mL}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Ακολουθεί έκπλυση της επιφάνειας με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και απεσταγμένο νερό και ξήρανση με ρεύμα αζώτου. Στην συνέχεια η επιφάνεια επωάζεται ολονύκτια με το διάλυμα αποκλεισμού. Ακολουθεί έκπλυση της επιφάνειας όπως προηγουμένως με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και απεσταγμένο νερό και ξήρανση σε ρεύμα αζώτου. Η επιφάνεια και το πλακίδιο με τα φρεάτια που φέρουν τα διαλύματα προς εναπόθεση τοποθετούνται στον θάλαμο της συσκευής εναπόθεσης κηλίδων. Τα προς ακινητοποίηση βιοτινυλιωμένα αντισώματα είναι αραιωμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε συγκέντρωση 200 $\mu\text{g/mL}$. Ακολουθεί εναπόθεση του διαλύματος των αντισωμάτων από τα φρεάτια σε

καθορισμένες περιοχές στην τροποποιημένη με στρεπταβιδίνη επιφάνεια πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου με χρήση συμπαγούς ακίδας και επώαση επί 2 ώρες σε θάλαμο με σταθερή υγρασία (~ 70%). Στην συνέχεια η επιφάνεια εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του αναλύτη το αντίσωμα έναντι του οποίου έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια.

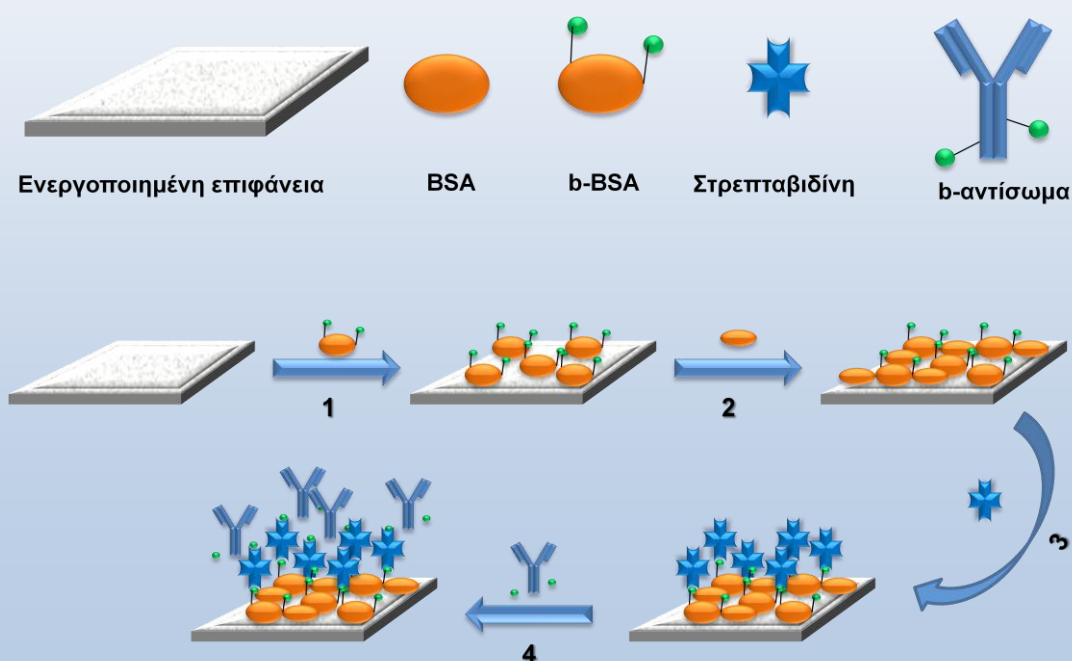
5.13.3 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης III: Ακινητοποίηση βιοτινυλιωμένου αντισώματος σε στρεπταβιδίνη δεσμευμένη σε επιφάνεια επιστρωμένη με b-BSA.

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Στην μέθοδο αυτή, πραγματοποιείται αρχικά ακινητοποίηση μιας βιοτινυλιωμένης αδρανούς πρωτεΐνης όπως είναι η αλβουμίνη ορού βοός (b-BSA) και ακολουθεί πρόσδεση της στρεπταβιδίνης μέσω αντίδρασης με τα ακινητοποιημένα στο στερεό μόρια βιοτίνης και στη συνέχεια ακινητοποίηση του αντισώματος μετά από βιοτινυλίωση του μέσω αντίδρασης με την ακινητοποιημένο στο στερεό στρεπταβιδίνη. Η συγκεκριμένη μέθοδος ακινητοποίησης βασίζεται στο γεγονός ότι το μόριο της στρεπταβιδίνης έχει τέσσερις θέσεις δέσμευσης για την βιοτίνη και έτσι μπορεί να λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ δύο βιοτινυλιωμένων μορίων. Και σε αυτή την περίπτωση όπως και στο Πρωτόκολλο ακινητοποίησης II ελαττώνονται σημαντικά οι στρεοχημικές παρεμποδίσεις στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος από τον στερεό φορέα και διατηρείτε σε μεγάλο βαθμό η ικανότητα δέσμευσης του ακινητοποιημένου αντισώματος.

Πρωτόκολλο ακινητοποίησης III

- 1) Ακινητοποίηση της b-BSA στην ενεργοποιημένη επιφάνεια πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου μέσω προσρόφησης.
- 2) Επώαση με διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης της επιφάνειας.
- 3) Ακινητοποίηση της στρεπταβιδίνης μέσω αντίδρασης με τα ακινητοποιημένα στην επιφάνεια μόρια βιοτίνης (b-BSA).
- 4) Ακινητοποίηση του βιοτινυλιωμένου αντισώματος στην επιφάνεια μέσω αντίδρασης με την ακινητοποιημένη στρεπταβιδίνη.



□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Αρχικά πραγματοποιείται ολονύκτια επώαση της ενεργοποιημένης επιφάνειας με διάλυμα b-BSA συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g/mL}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Ακολουθεί έκπλυση της επιφάνειας με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και απεσταγμένο νερό και ξήρανση με ρεύμα αζώτου. Στην συνέχεια η επιφάνεια επωάζεται ολονύκτια με το διάλυμα αποκλεισμού, εκπλένεται όπως προηγουμένως με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και απεσταγμένο νερό και ξηραίνεται σε ρεύμα αζώτου. Ακολουθεί επώαση με διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g/mL}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 2 ώρες. Μετά από έκπλυση και ξήρανση, η επιφάνεια τοποθετείται στην συσκευή εναπόθεσης κηλίδων και ακολουθεί εναπόθεση

διαλυμάτων βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων τα οποία έχουν παρασκευαστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Η επιφάνεια επωάζεται επί 2 ώρες σε θάλαμο σταθερής υγρασίας (~70%), εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του αναλύτη το αντίσωμα έναντι του οποίου έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια.

5.14 Ανίχνευση των αναλυτών στις επιφάνειες πυριτίου

□ ΥΛΙΚΑ

- Ενεργοποιημένες επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου
- Πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα, βιοτινυλιωμένα και μη, έναντι της CRP και των D-dimers
- Πρότυπα διαλύματα CRP και D-dimers
- Διάλυμα ακινητοποίησης αντισωμάτων: Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,2
- Διάλυμα αποκλεισμού ελεύθερων θέσεων δέσμησης της επιφάνειας: διάλυμα όξινων ανθρακικών, 0,1 M, pH 8,5, 1% (β/o) BSA
- Διάλυμα έκπλυσης: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4 που περιέχει 0,9% (β/o) NaCl
- Ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών mM, pH 7,4 που περιέχει 0,9% (β/o) NaCl και 1% (β/o) BSA
- Στρεπταβιδίνη (ImmunoPure Streptavidin, Pierce, H.Π.Α.)
- Διάλυμα αναγέννησης: Ρυθμιστικό γλυκίνη/HCl 0,1 M, pH 2.5
- Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο

□ ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή αυτόματης εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey Calligrapher™ MiniArrayer της Bio-Rad, (Bio-Rad Laboratories inc., California, H.Π.Α.).
- Αντλία σύριγγας, 74900 series (Cole Parmer Inc, Ιλινόις, ΗΠΑ)

- Συσκευή φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (Thetametrisis, Αθήνα, Ελλάδα) που αποτελείται από:

Α) Το μικροροϊκό κανάλι και τη βάση του. Το μικροροϊκό κανάλι είναι κατασκευασμένο από PDMS (cured Sylgard 184) το οποίο έχει σχηματοποιηθεί σε κατάλληλο καλούπι από Teflon. Το κανάλι αυτό σχεδιάστηκε έτσι ώστε να διασφαλίζεται η απρόσκοπτη ροή των διαλυμάτων των διαφόρων αντιδραστηρίων καθώς και η αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων. Στο κανάλι έχουν ενσωματωθεί κατά τη διάρκεια της κατασκευής του κατάλληλα σωληνάκια ώστε να είναι δυνατή η διασύνδεση τόσο με την εξωτερική αντλία όσο και με δοχεία που περιέχουν το διάλυμα της προς ανάλυση ουσίας ή άλλα διαλύματα (π.χ., έκπλυσης, αναγέννησης, κ.α.). Η βάση στην οποία συγκρατείται το μικροροϊκό κανάλι είναι κατασκευασμένη από ανοδιωμένο αλουμίνιο και εξασφαλίζει την διατήρηση του δείγματος σε σταθερή θέση κατά την διάρκεια της αντίδρασης.

Β) Αισθητήρια επιφάνεια. Μέσα στο μικροροϊκό κανάλι τοποθετείται η επιφάνεια επάνω στην οποία λαμβάνει χώρα η βιομοριακή αντίδραση. Πρόκειται για επιφάνεια πυριτίου διάστασης $2 \times 2 \text{ cm}^2$ και πάχους $\sim 500 \mu\text{m}$ η οποία φέρει στρώμα διοξειδίου ή νιτριδίου του πυριτίου και έχει ενεργοποιηθεί κατάλληλα ώστε να προσδένονται τα βιομόρια για τα οποία γίνεται η μελέτη. Η στεγάνωση του δείγματος και του μικροροϊκού καναλιού γίνεται με δυο γυάλινα πλακίδια μικροσκοπίου τα οποία τοποθετούνται επάνω και κάτω από το δείγμα, ενώ ο φωτισμός του δείγματος γίνεται εξωτερικά μέσω του επάνω γυάλινου πλακιδίου μικροσκοπίου.

Γ) Σύστημα οπτικών ινών. Τοποθετείται σε κατάλληλο ικρίωμα επάνω από το μικροροϊκό κανάλι και αποτελείται από έξι ίνες φωτισμού διαμέτρου $200 \mu\text{m}$ κατανεμημένες σε περιφέρεια κύκλου, στο κέντρο του οποίου βρίσκεται η ίνα συλλογής του φάσματος ανάκλασης. Η κατασκευή έχει γίνει με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι δυνατή η ρύθμιση της θέσης του συστήματος των οπτικών ινών κατά τον άξονα Z προκειμένου να επιτυγχάνεται η βέλτιστη οπτική διαδρομή.

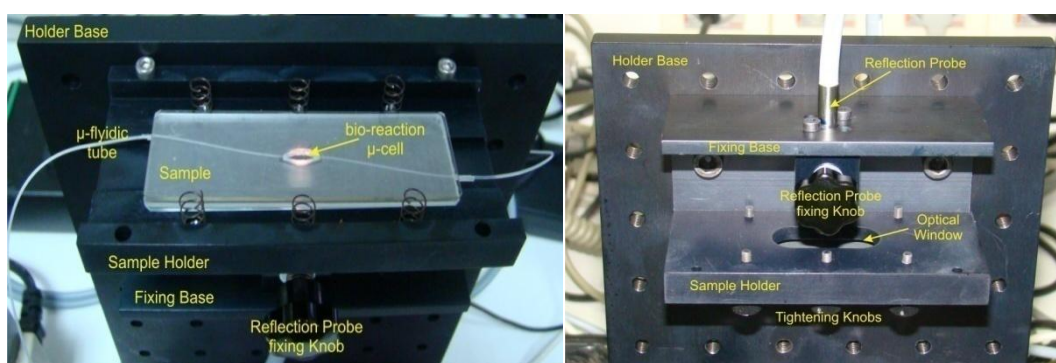
Δ) Φασματοφωτόμετρο και οπτική πηγή. Η οπτική πηγή αποτελείται από λάμπα βολφραμίου που εκπέμπει λευκό φως σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από τα 360 nm , το οποίο δεν είναι καταστρεπτικό για τα βιομόρια. Η

τροφοδοσία της πηγής γίνεται διαμέσου κατάλληλου ηλεκτρονικού κυκλώματος που διασφαλίζει σταθερότητα λειτουργίας για μεγάλα χρονικά διαστήματα χαρακτηριστικό που είναι απαραίτητο για την ανίχνευση πολύ μικρών μεταβολών στο φάσμα ανάκλασης λόγω της πρόσδεσης των βιομορίων. Το φασματοφωτόμετρο είναι το Maya 2000Pro της εταιρείας OceanOptics το οποίο επελέγη μετά από αξιολόγηση μιας σειράς φασματοφωτομέτρων από προηγούμενες μελέτες.

Ε) Περισταλτική αντλία ή αντλία μικροσύριγγας. Χρησιμοποιείτε για τη παροχή με σταθερή ταχύτητα των προς ανάλυση δειγμάτων και των διαφόρων διαλυμάτων μέσω σύνδεσης με τα σωληνάκια του μικροροϊκού καναλιού.

ΣΤ) Μετακινούμενη X-Y τράπεζα. Η βάση που φέρει το μικροροϊκό κανάλι και την αισθητήρια επιφάνεια τοποθετείτε σε μια X-Y κινούμενη τράπεζα. Η διάταξη της X-Y τράπεζας συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ελέγχεται από το λογισμικό πρόγραμμα που περιγράφεται ακολούθως προκειμένου να γίνεται ανάλυση κατά μήκος της επιφάνειας παρέχοντας μας έτσι την δυνατότητα για ταυτόχρονη ανάλυση περισσότερο του ενός αναλυτών.

Ζ) Λογισμικό. Το λογισμικό είναι βασισμένο στο λογισμικό FR-Monitor της ThetaMetrisis.



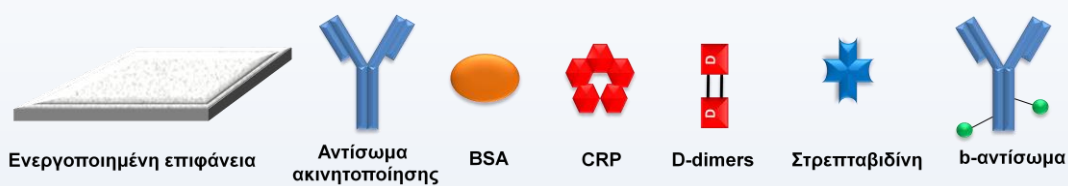
Εικόνα 6 : Διάταξη φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

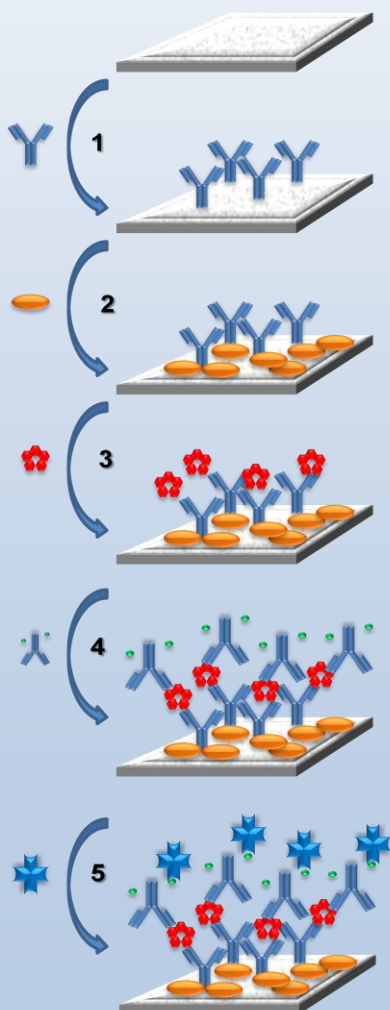
Η ανίχνευση αναλυτών με φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός στηρίζεται στην ακινητοποίηση των ειδικών αντισωμάτων σε συγκεκριμένες θέσεις της ενεργοποιημένης επιφάνειας πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου. Η επιφάνεια συναρμολογείται στην συνέχεια με το μικροροϊκό κανάλι και τοποθετείται κάτω από την οπτική ίνα. Κατά την δέσμευση των αναλυτών στα ακινητοποιημένα ειδικά αντισώματα αυξάνεται το πάχος της πρωτεϊνικής στοιβάδας στην επιφάνεια της ενεργοποιημένης επιφάνειας πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου. Αυτή η αύξηση προκαλεί μεταβολή του δείκτη διάθλασης και μετατόπιση του φάσματος ανάκλασης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος η οποία καταγράφεται από το λογισμικό. Η αύξηση του πάχους του πρωτεϊνικού υμενίου είναι ανάλογη του αριθμού των μορίων που προσδένονται στην επιφάνεια και κατά συνέπεια ανάλογη με την συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου αναλύτη στο δείγμα. Όταν η συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου αναλύτη στο δείγμα είναι σχετικά μικρή, είναι πιθανό να μην είναι δυνατή η ανίχνευσή τους παρακολουθώντας μόνο την αντίδραση του αναλύτη με το ακινητοποιημένο αντίσωμα για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα αντίσωμα που δεσμεύεται σε διαφορετικό επίτοπο από αυτόν που αναγνωρίζει το ακινητοποιημένο αντίσωμα ως αντίσωμα ανίχνευσης ή αν απαιτείται ακόμα μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης το αντίσωμα ανίχνευσης μπορεί να είναι βιοτινυλιωμένο και να ακολουθήσει αντίδραση με στρεπταβιδίνη. Αυτό το σχήμα ανάλυσης εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία για τον προσδιορισμό τόσο της CRP όσο και των D-dimers σε δείγματα ορού.

Πορεία ανίχνευσης αναλυτών

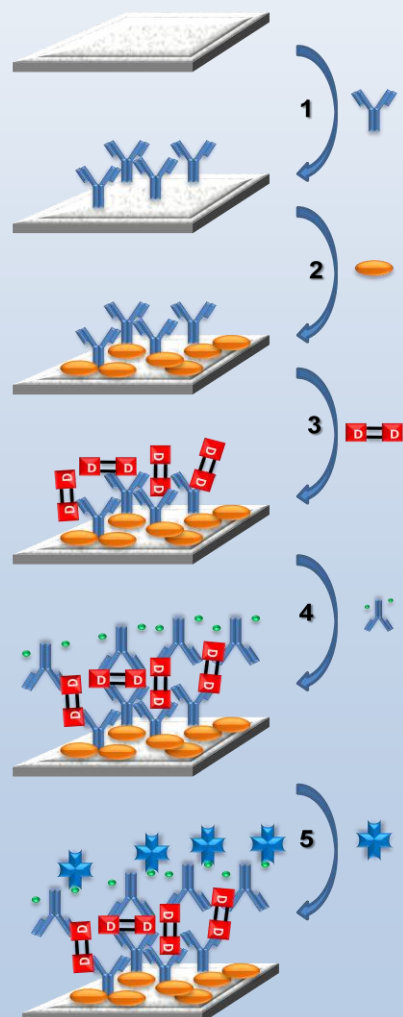
- 1) Ακίνητοποίηση του ειδικού αντισώματος έναντι του αναλυτή στην ενεργοποιημένη επιφάνεια πυριτίου/διοξειδίου μέσω προσρόφησης.
- 2) Επώαση με διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης της επιφάνειας.
- 3) Δέσμευση του αναλύτη από τα ειδικά αντισώματα.
- 4) Αντίδραση του ακίνητοποιημένου αναλύτη με βιοτυνιλιωμένο αντίσωμα.
- 5) Πρόσδεση στρεπταβιδίνης στις ομάδες βιοτίνης του αντισώματος.



Πορεία ανίχνευσης CRP



Πορεία ανίχνευσης D-dimers



□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Με χρήση της συσκευής εναπόθεσης μικροκηλίδων εναποτίθενται διαλύματα των ειδικών αντισωμάτων κατά των αναλυτών συγκέντρωσης 200 µg/mL σε διάλυμα ακινητοποίησης στις ενεργοποιημένες επιφάνειες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου ώστε να καλυφτεί μια περιοχή με διαστάσεις περίπου 4x5 mm. Μετά από ολονύχτια επώαση σε θάλαμο με σταθερή υγρασία (~ 70%), οι επιφάνειες εκπλένονται με διάλυμα έκπλυσης και εμβαπτίζονται σε διάλυμα αποκλεισμού. Ακολουθεί ολονύχτια επώαση, έκπλυση με διάλυμα έκπλυσης και απεσταγμένο νερό και ξήρανση με ρεύμα αζώτου. Στην συνέχεια οι επιφάνειες συναρμολογούνται με το μικροροϊκό σύστημα στην ειδική βάση και τοποθετούνται στην συσκευή ανάκλασης λευκού φωτός, όπου πραγματοποιείτε καταγραφή του φάσματος ανάκλασης σε πραγματικό χρόνο. Αρχικά, διοχετεύεται στην επιφάνεια ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοανάλυσης έως ότου επιτευχθεί σταθερό σήμα βάσης. Ακολουθεί παροχέτευση διαδοχικά: προτύπου διαλύματος αναλύτη ή δείγματος ορού αραιωμένου σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης, διάλυμα βιοτινυλιωμένου αντισώματος συγκέντρωσης 10 µg/mL σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης, διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 2 µg/mL σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης, και τέλος διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Ακολούθως πραγματοποιείται αναγέννηση του ακινητοποιημένου στην επιφάνεια αντισώματος με διέλευση διαλύματος αναγέννησης επί 5 λεπτά και εκ νέου εξισορρόπηση με διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Η ταχύτητα ροής όλων των διαλυμάτων ήταν 20 µL/mL.

5.15 Ταυτόχρονη ανίχνευση CRP και D-dimers σε επιφάνειες πυριτίου

□ ΥΛΙΚΑ

- Βλέπε κεφάλαιο 5.14.

□ ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή αυτόματης εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey Calligrapher™ MiniArrayer της Bio-Rad, (Bio-Rad Laboratories inc., California, Η.Π.Α.).

- Συσκευή φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (Thetametrisis, Αθήνα, Ελλάδα)

□ ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

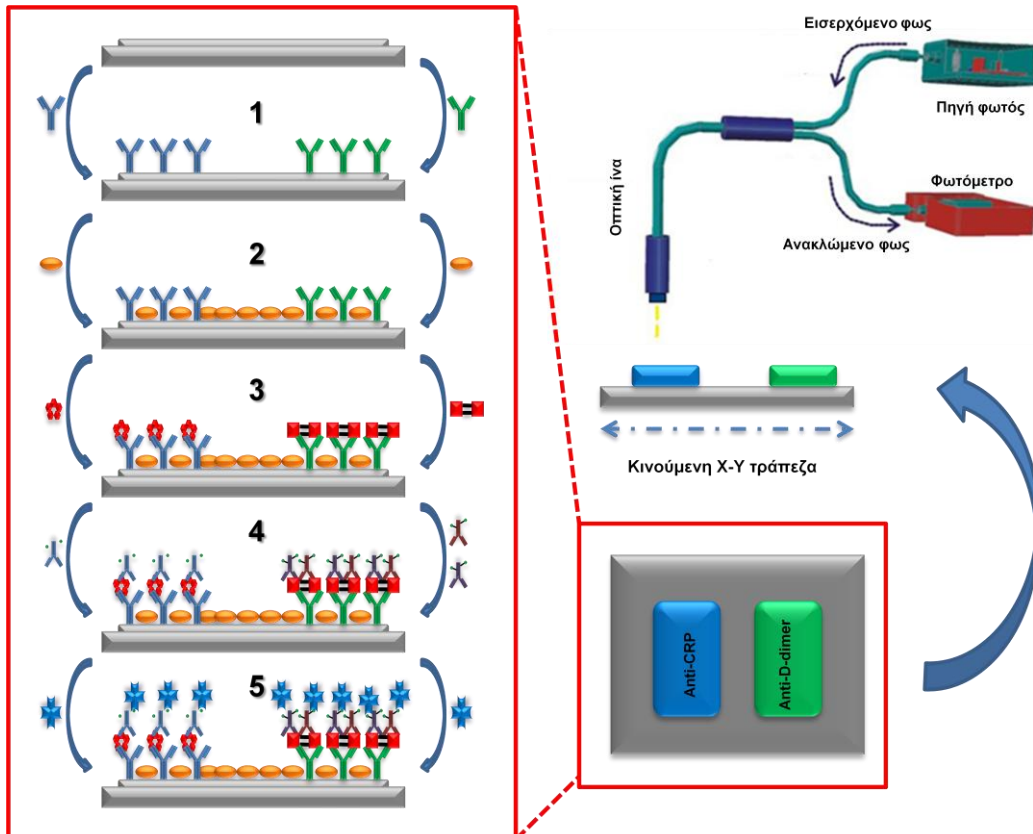
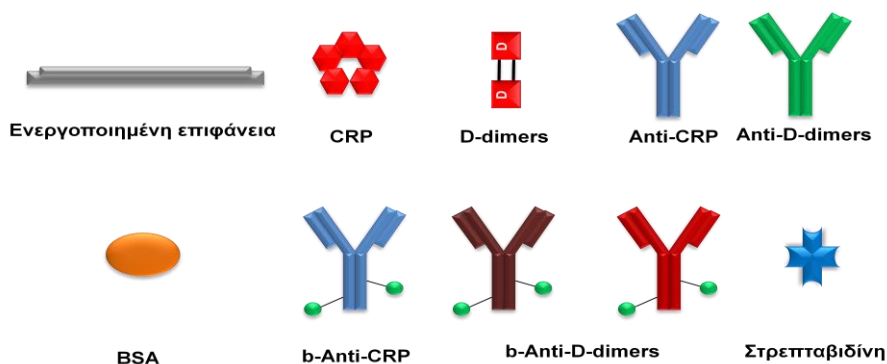
Η ταυτόχρονη ανίχνευση της CRP και των D-dimers στηρίζεται στην ίδια αρχή ανίχνευσης των μεμονωμένων αναλυτών που περιγράφηκε στο εδάφιο 5.1, με την διαφορά ότι σε διακριτές θέσεις στην ενεργοποιημένη επιφάνεια έχουν ακινητοποιηθεί τα αντίστοιχα ειδικά αντισώματα και η βάση που συγκρατεί την ενεργοποιημένη επιφάνεια με το μικροροϊκό κανάλι τοποθετείται σε κινούμενη τράπεζα X-Y. Με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, η τράπεζα κινείται σε συγκεκριμένες θέσεις σε σχέση με την οπτική ίνα έτσι ώστε να καταγράφεται το φάσμα ανάκλασης από διαφορετικά σημεία της ενεργοποιημένης επιφάνειας τόσο εντός όσο και εκτός των βιοδραστικών περιοχών.

□ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Η πορεία εκτέλεσης του πειράματος είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε στο εδάφιο 5.14. Καθ' όλη την διάρκεια της μέτρησης η τράπεζα X-Y κινείται κατά μήκος του X άξονα και λαμβάνονται μετρήσεις σε προκαθορισμένα σημεία. Συγκεκριμένα, η τράπεζα κινείται κάθε 1 s και οι μετρήσεις λαμβάνονται επίσης ανά 1 s. Οι μετρήσεις καταγράφονται σε αρχείο τύπου TXT και στην συνέχεια επεξεργάζονται με κατάλληλο λογισμικό MATLAB ώστε να ληφθούν τα τελικά γραφήματα μεταβολής του πάχους στις βιοδραστικές ζώνες συναρτήσει του χρόνου.

Πορεία ταυτόχρονου προσδιορισμού CRP και D-dimers

- 1) Ακίνητοποίηση του ειδικού αντισώματος εναντι του αναλυτή στην ενεργοποιημένη επιφάνεια πυριτίου μέσω προσρόφησης.
- 2) Επώαση με διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης πάνω στην επιφάνεια.
- 3) Δέσμευση του αναλύτη από τα ειδικά αντισώματα.
- 4) Αντίδραση μη ανταγωνιστικού τύπου του ακίνητοποιημένου αναλύτη με βιοτυνιλιωμένο αντίσωμα.
- 5) Πρόσδεση στρεπταβιδίνης στις ομάδες βιοτίνης του αντισώματος.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδων ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού της CRP και των D-dimers σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

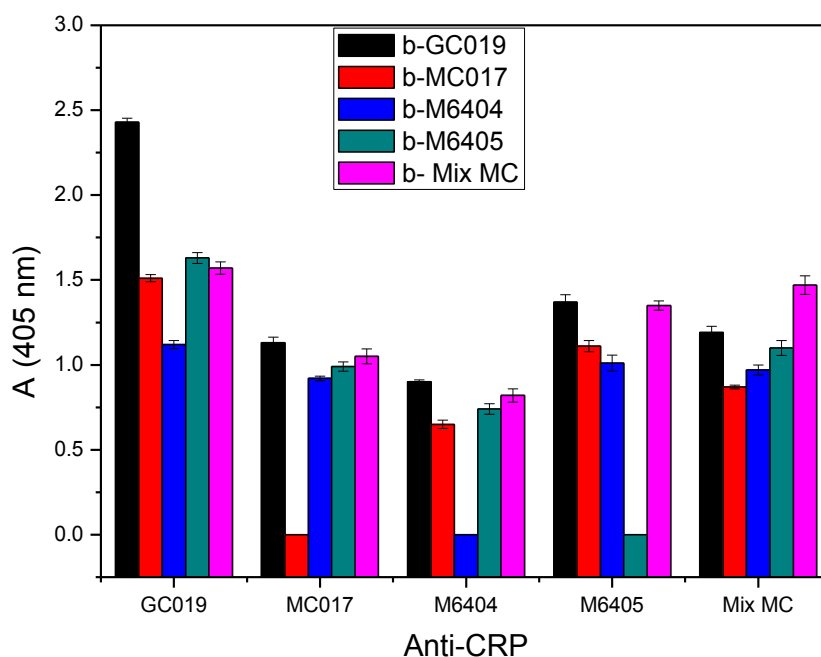
Στα πλαίσια της ανάπτυξης του οπτικού βιοαισθητήρα για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της CRP και των D-dimers, αναπτύχθηκαν αρχικά μη ανταγωνιστικοί ενζυμοανοσοπροσδιορισμοί για κάθε αναλύτη σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης ώστε να χρησιμοποιηθούν ως συγκριτικές μέθοδοι αλλά και για να επιλεγούν τα ανοσοαντιδραστήρια (αντισώματα στερεάς φάσης και ανίχνευσης) και για να προσδιοριστούν οι καταρχήν συνθήκες της ανάλυσης (ρυθμιστικά διαλύματα, κ.α.). Οι συνθήκες των δύο ανοσοπροσδιορισμών βελτιστοποιήθηκαν με κριτήρια την ευαισθησία ανίχνευσης και το σήμα της μη ειδικής δέσμευσης. Επίσης, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε ώστε στις ανοσοχημικές μεθόδους που αναπτύχθηκαν για τους δύο αναλύτες να χρησιμοποιούνται κοινές συνθήκες ανάλυσης προκειμένου να διευκολυνθεί η μεταφορά τους στον υπό ανάπτυξη βιοαισθητήρα και ο ταυτόχρονος προσδιορισμός τους.

6.1.1 Επιλογή αντισωμάτων έναντι της CRP και των D-dimers

Επιλογή αντισωμάτων έναντι της CRP

Για την ανάπτυξη του μη ανταγωνιστικού ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού της CRP δοκιμάστηκαν ένα πολυκλωνικό αντίσωμα (GC019) και τρία μονοκλωνικά αντισώματα (MC017, M6404, M6405) τόσο ως αντισώματα δέσμευσης όσο και ως αντισώματα ανίχνευσης (μετά από βιοτινυλίωση τους). Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί των τεσσάρων αντισωμάτων αλλά και η χρήση ενός μίγματος των 3 μονοκλωνικών αντισωμάτων ως αντισωμάτων δέσμευσης και ως αντισωμάτων ανίχνευσης, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των αντισωμάτων δέσμευσης ήταν 5 µg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης (ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 50 mM, pH 9,2), ενώ των βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων 2 µg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, που περιείχε 0,9 g/L NaCl και 1% β/ο BSA). Στο Σχήμα 36 παρουσιάζονται οι

αποκρίσεις για πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 10 ng/mL που ελήφθησαν ύστερα από επώαση με STR-HRP και προσθήκη υποστρώματος H_2O_2 /ABTS. Από τις τιμές αυτές έχουν αφαιρεθεί οι τιμές που ελήφθησαν για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (σήμα μη-ειδικής δέσμευσης).

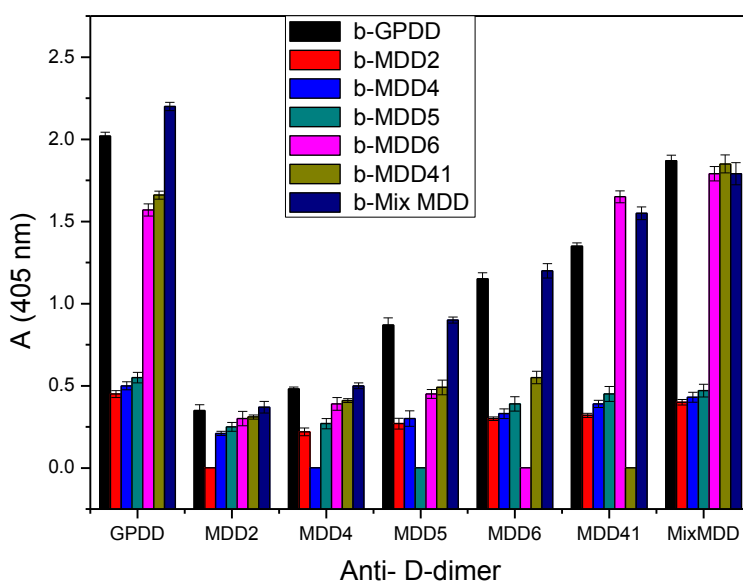


Σχήμα 36: Ειδικό αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται για πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 10 ng/mL χρησιμοποιώντας διαφόρους συνδυασμούς αντισωμάτων δέσμευσης και ανίχνευσης. Κάθε στήλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Από το σχήμα προκύπτει ότι τα υψηλότερα αναλυτικά σήματα ελήφθησαν όταν χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα GC019 ως αντίσωμα ακινητοποίησης και ως αντίσωμα ανίχνευσης στην βιοτινυλιωμένη του μορφή. Ως εκ τούτου, το συγκεκριμένο αντίσωμα επιλέχθηκε για την συνέχεια της μελέτης. Τα σήματα μη ειδικής δέσμευσης ήταν πολύ χαμηλά ($A_{405\text{ nm}} < 0,1$) για όλους τους συνδυασμούς που μελετήθηκαν.

Επιλογή αντισωμάτων έναντι των D-dimers

Για την ανάπτυξη του μη ανταγωνιστικού ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού των D-dimers δοκιμάστηκαν ένα πολυκλωνικό αντίσωμα (GPDD) και πέντε μονοκλωνικά αντισώματα (MDD2, MDD4, MDD5, MDD6, MDD41) τόσο ως αντισώματα δέσμευσης όσο και ως αντισώματα ανίχνευσης (μετά από βιοτινυλίωση τους). Όπως και στην περίπτωση της CRP, εξετάστηκαν όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί των τεσσάρων αντισωμάτων αλλά και η χρήση ενός μίγματος των 5 μονοκλωνικών αντισωμάτων ως αντισωμάτων δέσμευσης και ως αντισωμάτων ανίχνευσης, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των αντισωμάτων δέσμευσης ήταν 5 $\mu\text{g/mL}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης (ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 50 mM, pH 9,2), ενώ των βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων 2 $\mu\text{g/mL}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, που περιείχε 0,9 g/L NaCl και 1% β /o BSA).



Σχήμα 37: Ειδικό αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται για πρότυπο διάλυμα D-dimers συγκέντρωσης 50 ng/mL χρησιμοποιώντας διαφόρους συνδυασμούς αντισωμάτων δέσμευσης και ανίχνευσης. Κάθε στήλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Στο Σχήμα 37 παρουσιάζονται οι αποκρίσεις για πρότυπο διάλυμα D-dimers συγκέντρωσης 50 ng/mL που ελήφθησαν ύστερα από επώαση με STR-HRP και προσθήκη υποστρώματος H_2O_2 /ABTS. Από τις τιμές αυτές έχουν αφαιρεθεί οι τιμές που ελήφθησαν για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (σήμα μη-ειδικής δέσμευσης). Όπως προκύπτει από το σχήμα, τα υψηλότερα αναλυτικά σήματα ελήφθησαν όταν χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα GPDD ως αντίσωμα ακινητοποίησης και ως αντίσωμα ανίχνευσης στην βιοτινυλιωμένη του μορφή. Επίσης παρατηρείται ότι τα αντισώματα MDD2, MDD4 και MDD5 δίνουν πολύ χαμηλό αναλυτικό σήμα όταν χρησιμοποιούνται είτε σαν αντίσωμα ακινητοποίησης ή ανίχνευσης. Όταν χρησιμοποιείτε ως αντίσωμα ανίχνευσης το μίγμα όλων των βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων το μεγαλύτερο αναλυτικό σήμα λαμβάνεται όταν χρησιμοποιείτε ως αντίσωμα δέσμευσης, το πολυκλωνικό αντίσωμα, ο συνδυασμός όλων των μονοκλωνικών ή τα μεμονωμένα αντισώματα b-MDD6 και b-MDD41. Για τον λόγο αυτό, δοκιμάστηκε εκ νέου μίγμα μόνο των b-MDD6 και b-MDD41 σε συνδυασμό με το πολυκλωνικό αντίσωμα ώστε να διατηρηθεί το υψηλό σήμα αλλά να μειωθεί ο αριθμός των απαιτούμενων αντισωμάτων και κατά συνέπεια το κόστος της ανάλυσης. Προέκυψε ότι ο συνδυασμός των δύο μονοκλωνικών παρείχε σήμα εφάμιλλο με αυτό που λαμβανόταν από τον συνδυασμό των 5 μονοκλωνικών αντισωμάτων και ως εκ τούτου, επιλέχθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα ως αντίσωμα δέσμευσης σε συνδυασμό με τα αντισώματα b-MDD6 και b-MDD41 ως αντισώματα ανίχνευσης για την συνέχεια της μελέτης. Τα σήματα μη ειδικής δέσμευσης ήταν πολύ χαμηλά ($A_{405\text{ nm}} < 0,1$) για όλους τους συνδυασμούς που μελετήθηκαν. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις τα σήματα μη ειδικής δέσμευσης ήταν πολύ μικρά ($A_{405\text{ nm}} < 0,1$) για όλους τους συνδυασμούς αντισωμάτων που μελετήθηκαν.

6.1.2 Επιλογή σύστασης διαλυμάτων ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού της CRP και των D-dimers

Χρησιμοποιώντας τα αντισώματα που επιλέχθηκαν για την ανάπτυξη των ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών των δύο αναλυτών, βελτιστοποιήθηκαν διάφορες παράμετροι των ανοσοχημικών προσδιορισμών συμπεριλαμβανομένων της σύστασης του διαλύματος ακινητοποίησης των αντισωμάτων, του διαλύματος αποκλεισμού των ελευθέρων θέσεων του στερεού φορέα καθώς και του διαλύματος ανοσοαντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα:

A) Ως ρυθμιστικά διαλύματα ακινητοποίησης (P.Δ.ΑΚ) των αντισωμάτων δέσμευσης εξετάστηκαν τα ακόλουθα: (i) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, και (ii) ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 50 mM, pH 9,2.

B) Ως διαλύματα αποκλεισμού των ελευθέρων θέσεων δέσμευσης (P.Δ.ΑΠ.) του στερεού φορέα μελετήθηκαν τα: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, που περιείχε 1% (β/o) BSA και (ii) διάλυμα όξινων ανθρακικών, 0,1 M, pH 8,5, που περιείχε 1% (β/o) BSA.

Γ) Ως διαλύματα ανοσοαντίδρασης (P.Δ.ΑΝ.) εξετάστηκαν τα: (i) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, που περιείχε 1 % (β/o) BSA, 0,9% (β/o) NaCl, και 0,05% (w/v) γ-ανοσοσφαιρίνες βοός (β-IgG), και (ii) Tris-HCl, 50 mM, pH 7,8, που περιείχε 0,5% (β/o) BSA, NaCl 0,9% (β/o) και 0,05% (β/o) γ-ανοσοσφαιρίνες βοός (β-IgG).

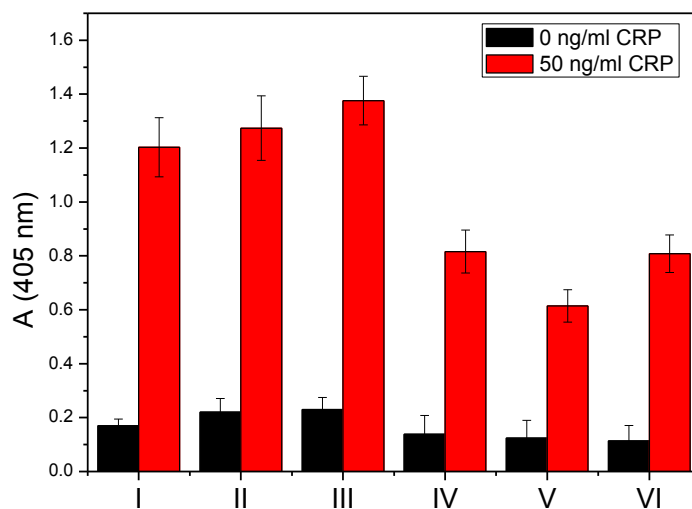
Η επιλογή του βέλτιστου συνδυασμού διαλυμάτων βασίστηκε στο σήμα της μη ειδικής δέσμευσης δηλαδή το σήμα που αντιστοιχεί στο πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης καθώς και στο σήμα που λήφθηκε για πρότυπα διαλύματα CRP και D-dimers συγκέντρωσης 5 και 50 ng/mL, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκε ήταν 2 μg/mL για το αντίσωμα κατά της CRP (b-GC019) και 1 μg/mL για καθένα από τα δύο αντισώματα κατά των D-dimers (b-MDD6 και b-MDD41), έτσι ώστε η συνολική συγκέντρωση του αντισώματος να είναι επίσης 2 μg/mL.

Στο Σχήμα 38, παρουσιάζονται οι τιμές που ελήφθησαν τόσο για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης καθώς όσο και για τα υπόλοιπα πρότυπα διαλύματα με τους διάφορους συνδυασμούς ρυθμιστικών διαλυμάτων για τον

ανοσοχημικό προσδιορισμό της CRP. Οι συνδυασμοί που χρησιμοποιήθηκαν και παρίστανται στο ακόλουθο σχήμα είναι οι εξής:

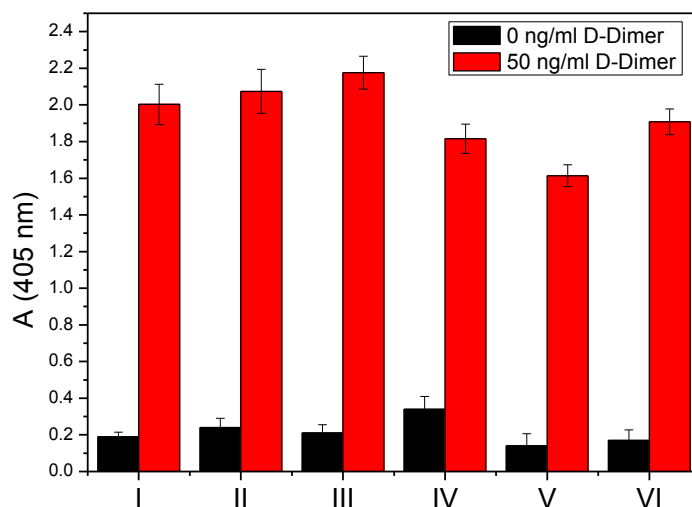
- I) P.Δ.AK - PBS με P.Δ.AΠ – PBS 1 % (w/v) BSA και P.Δ.AN - PBS 1 % (w/v) BSA, 0,9% (w/v) NaCl.
- II) P.Δ.AK - PBS 0,05 M, pH 7,4 με P.Δ.AΠ - PBS 0,05 M, pH 7,4, 1 % (w/v) BSA και P.Δ.AN - Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,8, 0,05 % (w/v) IGG 0,5 % (w/v) BSA, 0,9% (w/v) NaCl.
- III) P.Δ.AK - PBS 0,05 M, pH 7,4 με P.Δ.AΠ - CBS, 0,1 M, pH 8,5, 1 % (w/v) BSA και P.Δ.AN - PBS 0,05 M, pH 7,4 1 % (w/v) BSA, 0,9% (w/v) NaCl.
- IV) P.Δ.AK - CBS, 0,05 M, pH 9,2 με P.Δ.AΠ - PBS 0,05 M, pH 7,4, 1 % (w/v) BSA και P.Δ.AN - PBS 0,05 M, pH 7,4 1 % (w/v) BSA, 0,9% (w/v) NaCl.
- V) V) P.Δ.AK - CBS, 0,05 M, pH 9,2 με P.Δ.AΠ - PBS 0,05 M, pH 7,4, 1 % (w/v) BSA και P.Δ.AN - Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,8, 0,05 % (w/v) IGG 0,5 % (w/v) BSA, 0,9% (w/v) NaCl..
- VI) VI) P.Δ.AK - CBS, 0,05 M, pH 9,2 με P.Δ.AΠ - CBS, 0,1 M, pH 8,5, 1 % (w/v) BSA και P.Δ.AN - Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,8, 0,05 % (w/v) IGG 0,5 % (w/v) BSA, 0,9% (w/v) NaCl.

Όπως προκύπτει από το σχήμα, το υψηλότερο αναλυτικό σήμα σε συνδυασμό με το χαμηλότερο σήμα μη ειδικής ελήφθη όταν χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα ακινητοποίησης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, ως διάλυμα αποκλεισμού διάλυμα όξινων ανθρακικών, 0.1 M, pH 8,5, και ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, που περιείχε που περιείχε 1 % (β/ο) BSA, 0,9% (β/ο) NaCl, και 0,05% (w/v) γ-ανοσοσφαιρίνες βοός.



Σχήμα 38: Ειδικό αναλυτικό σήμα αντισώματος GC019 με πρότυπα διαλύματα CRP 0 και 50 ng/mL χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συνδυασμούς ρυθμιστικών διαλυμάτων. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Στο Σχήμα 39, παρουσιάζονται οι τιμές που ελήφθησαν για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης καθώς και για πρότυπο διάλυμα D-dimers 50 ng/ml με τους διάφορους συνδυασμούς ρυθμιστικών διαλυμάτων για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό των D-dimers. Όπως προκύπτει από το σχήμα, το υψηλότερο αναλυτικό σήμα σε συνδυασμό με το χαμηλότερο σήμα μη ειδικής ελήφθη όταν χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα ακινητοποίησης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, ως διάλυμα αποκλεισμού διάλυμα όξινων ανθρακικών, 0.1 M, pH 8,5, και ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, που περιείχε 1 % (β/ο) BSA, 0,9% (β/ο) NaCl, και 0,05% (w/v) γ-ανοσοσφαιρίνες βοός.



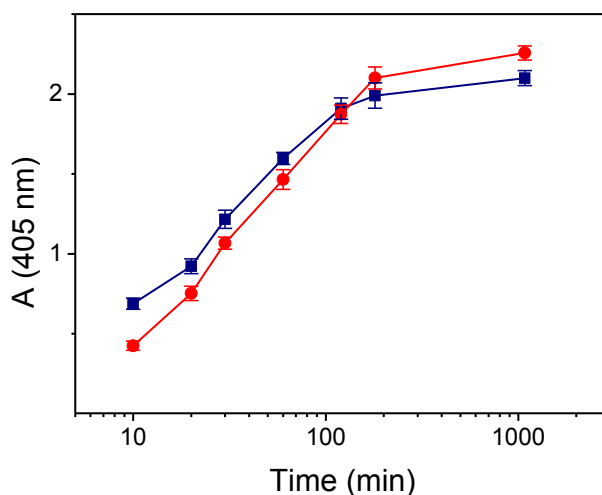
Σχήμα 39: Ειδικό αναλυτικό σήμα αντισωμάτων GPDD, b-MDD6, b-MDD41 με πρότυπα διαλύματα D-dimers 0 και 50 ng/mL χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συνδυασμούς ρυθμιστικών διαλυμάτων. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και στα πλαίσια της υιοθέτησης κοινών συνθηκών και για τους δύο ανοσοπροσδιορισμούς επιλέχθηκαν τα ακόλουθα: διάλυμα ακινητοποίησης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, διάλυμα αποκλεισμού διάλυμα όξινων ανθρακικών, 0.1 M, pH 8,5, και διάλυμα ανοσοαντίδρασης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, που περιείχε 1 % (β/ο) BSA, 0,9% (β/ο) NaCl, και 0,05% (w/v) γ-ανοσοσφαιρίνες βοός.

6.1.3 Χρονική μελέτη ανοσοαντιδράσεων

Μια άλλη σημαντική παράμετρος που μελετήθηκε και για τους δύο ανοσοχημικούς προσδιορισμούς ήταν η χρονική διάρκεια των δύο σταδίων της ανοσοαντίδρασης, δηλαδή της αντίδρασης των προτύπων διαλυμάτων ή των δειγμάτων με το ακινητοποιημένο στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης αντίσωμα (1^ο στάδιο) καθώς και της αντίδρασης των δεσμευμένων στο ακινητοποιημένο αντίσωμα αντιγόνων με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης (2^ο στάδιο).

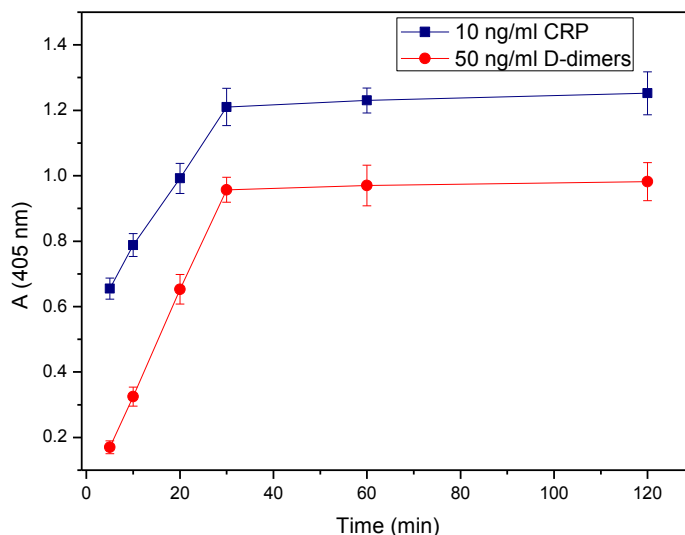
Στο Σχήμα 40 παρουσιάζεται η μεταβολή του ειδικού αναλυτικού σήματος για συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων 10 ng/mL της CRP και 50 ng/mL των D-dimers σε σχέση με τη διάρκεια του πρώτου σταδίου της ανοσοαντίδρασης. Η χρονική διάρκεια του 2^{ου} σταδίου ήταν 60 min. Από το σχήμα προκύπτει ότι μέγιστες τιμές οροφής και για τα δυο υπό μελέτη μόρια λαμβάνονται για χρόνο μεγαλύτερο ή ίσο των 3 ωρών. Ωστόσο για χρόνο ανοσοαντίδρασης 30 min λαμβάνονται ικανοποιητικά σήματα για τον προσδιορισμό των δυο μορίων (τιμή απορρόφησης στα 405 nm περίπου ίση με 1). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, υιοθετήθηκε ως χρονική διάρκεια για το 1^ο στάδιο της ανοσοαντίδρασης για το προσδιορισμό της CRP και των D-dimers τα 30 min.



Σχήμα 40: Μεταβολή ειδικού αναλυτικού σήματος που ελήφθη για πρότυπα διαλύματα CRP συγκέντρωσης 10 ng/mL (■) και D-dimers 50 ng/mL (●) συναρτήσει του χρόνου της αντίδρασης των προτύπων διαλυμάτων με το ακινητοποιημένο στα φρεάτια αντίσωμα. Η χρονική διάρκεια του δευτέρου σταδίου της αντίδρασης ήταν 1 ώρα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Αντίστοιχα, για το δεύτερο στάδιο της ανοσοαντίδρασης, η μεταβολή του σήματος για πρότυπα διαλύματα CRP και D-dimers συγκέντρωσης 10 ng/mL και 50 ng/mL, αντίστοιχα, και συγκέντρωση βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων έναντι των δυο αναλυτών 5 μ g/mL, παρουσιάζεται στο Σχήμα 41. Η χρονική διάρκεια του 1^{ου} σταδίου ήταν 30 min. Από το σχήμα προκύπτει ότι μέγιστες τιμές οροφής και για τα δυο υπό μελέτη μόρια λαμβάνονται για χρόνο

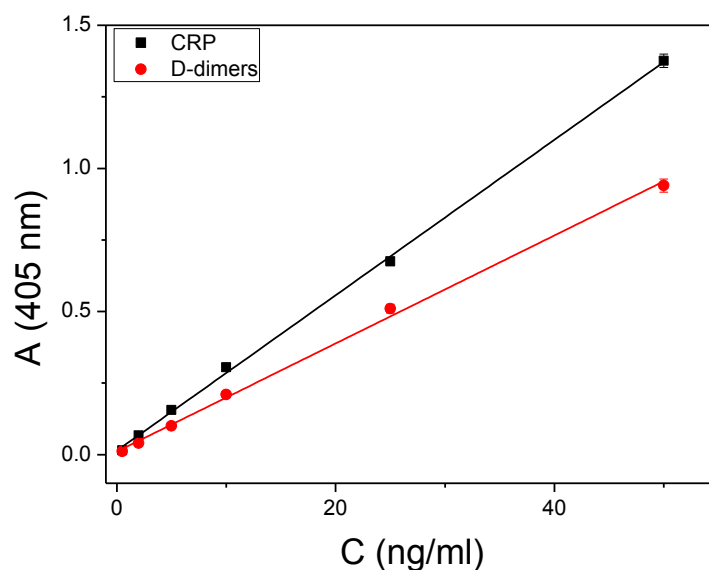
μεγαλύτερο ή ίσο των 30 λεπτών. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, υιοθετήθηκε ως χρονική διάρκεια για το 2^ο στάδιο της ανοσοαντίδρασης για το προσδιορισμό της CRP και των D-dimers τα 30 λεπτά



Σχήμα 41: Μεταβολή ειδικού αναλυτικού σήματος που ελήφθη για πρότυπα διαλύματα CRP συγκέντρωσης 10 ng/mL (■) και D-dimers 50 ng/mL (●) συναρτήσει του χρόνου της αντίδρασης των προτύπων διαλυμάτων με το ακινητοποιημένο στα φρεάτια αντίσωμα. Η χρονική διάρκεια του δευτέρου σταδίου της αντίδρασης ήταν 1 ώρα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

6.1.4 Καμπύλες προτύπων ενζυμοανοσοπροσδιορισμών των CRP και D-dimers σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

Εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες κατασκευάστηκαν οι αντιπροσωπευτικές καμπύλες προτύπων των ενζυμοανοσοπροσδιορισμών των CRP και D-dimers σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης όπως παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα 42.



Σχήμα 42: Καμπύλες προτύπων CRP (■) και D-dimers (●) που ελήφθησαν με μη ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανασοπροσδιορισμό σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

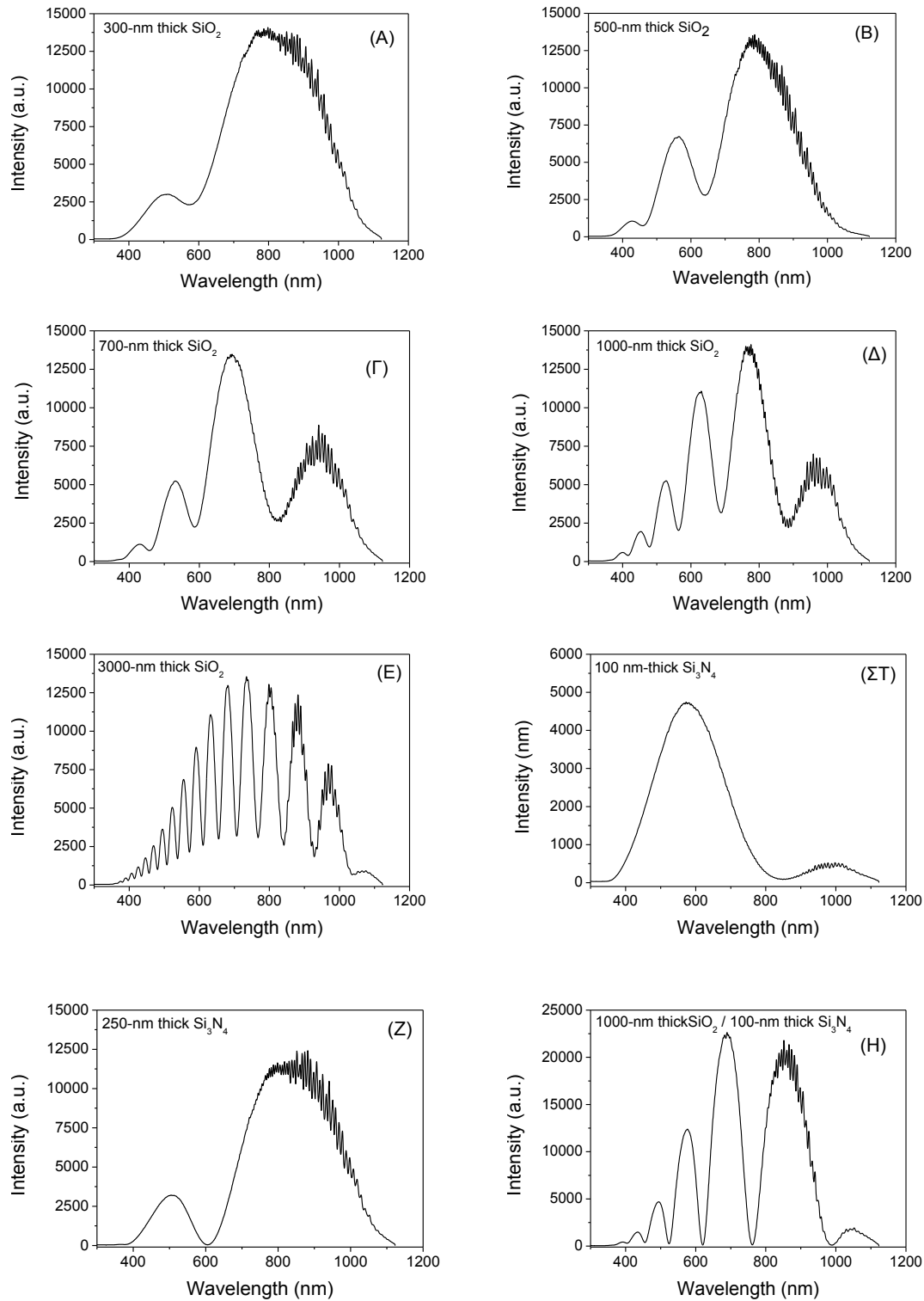
Οι εξισώσεις των ευθειών παλινδρόμησης που ελήφθησαν ήταν:

$$\begin{aligned} \text{CRP:} \quad A &= 0,0272(\pm 0,0004)C + 0,013(\pm 0,008), \quad R^2=0,999 \\ \text{D-dimer:} \quad A &= 0,0189(\pm 0,0004)C + 0,0108(\pm 0,014) \quad R^2= 0,998 \end{aligned}$$

6.2 Προσδιορισμός βέλτιστης σύστασης και πάχους διάφανου στρώματος που εναποτίθεται στην επιφάνεια πυριτίου

Ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία του υπό ανάπτυξη αισθητήρα είναι η αισθητήρια επιφάνεια επάνω στην οποία ακινητοποιούνται τα ειδικά αντισώματα κατά των μορίων τη συγκέντρωση των οποίων θέλουμε να προσδιορίσουμε. Η επιφάνεια αυτή είναι τμήμα από δισκίδιο πυριτίου πάνω στο οποίο έχει εναποτεθεί στρώμα από διαφανές υλικό. Το στρώμα αυτό πρέπει να έχει διαφορετικό δείκτη διάθλασης από το πυρίτιο ώστε κατά την ανάκλαση του λευκού φωτός από την επιφάνεια του πυριτίου να δημιουργείται ένα φάσμα συμβολής. Στο πλαίσιο της ανάπτυξης του ανοσοαισθητήρα μελετήθηκε η σύσταση του διάφανου στρώματος στην επιφάνεια του πυριτίου. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δύο διαφορετικά υλικά, το οξειδίο του πυριτίου (SiO_2) και το νιτρίδιο του πυριτίου (Si_3N_4), που μπορούν να

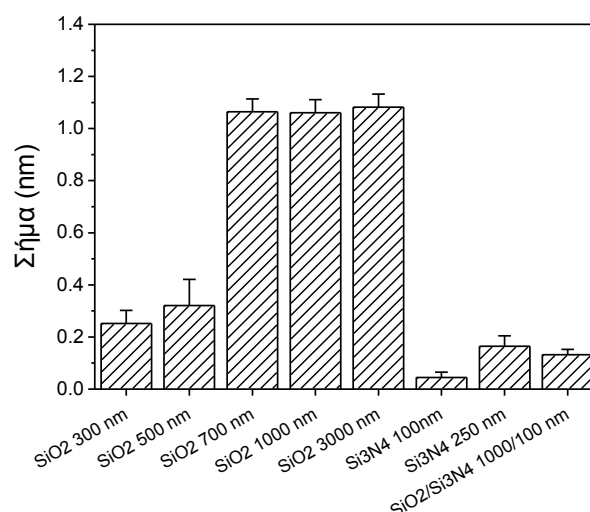
εναποτεθούν πάνω σε δισκίδια πυριτίου (Si) με μεθόδους μικροηλεκτρονικής οδηγώντας στην δημιουργία υμενίων υψηλής ομοιομορφίας. Επίσης δοκιμάστηκαν επιφάνειες με συνδυασμούς υμενίων SiO_2 και Si_3N_4 . Δεδομένου ότι η θέση και ο αριθμός των ελαχίστων και των μεγίστων του φάσματος συμβολής εξαρτώνται από το πάχος και το δείκτη διάθλασης του υμενίου του διαφανούς υλικού, μελετήθηκε ταυτόχρονα και η επίδραση του πάχους του υμενίου στο σήμα που λαμβάνεται. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα υμένια SiO_2 δημιουργούνται με θερμική οξείδωση του υποστρώματος πυριτίου και έτσι είναι δυνατή η παρασκευή υμενίων με μεγάλο εύρος παχών χωρίς ανομοιγένεια πάνω στα δισκίδια πυριτίου. Αντιθέτως, τα υμένια Si_3N_4 δημιουργούνται με την τεχνική της χημικής εναπόθεσης από ατμό σε χαμηλή πίεση (Low Pressure Chemical Vapour Deposition, LPCVD) με την οποία δεν είναι δυνατόν να δημιουργηθούν υμένια πάχους μεγαλύτερου από 250 nm με υψηλή ομοιομορφία στην επιφάνεια των δισκιδίων Si. Για τον λόγο αυτό, κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν επιφάνειες πυριτίου με υμένια SiO_2 πάχους 300, 500, 700, 1000 και 3000 nm, καθώς και επιφάνειες με υμένια Si_3N_4 πάχους 100 και 250 nm. Επίσης δοκιμάστηκαν και επιφάνειες με διαφανές υμένιο που αποτελούνταν από υμένιο SiO_2 πάχους 1000 nm και υμένιο Si_3N_4 πάχους 100 nm. Στο Σχήμα 43 παρουσιάζονται τα φάσματα ανάκλασης που λαμβάνονται από επιφάνειες Si που φέρουν υμένια SiO_2 με πάχος που κυμαίνεται από 300-3000 nm, Si_3N_4 με πάχος 100 και 250 nm, καθώς και από την επιφάνεια με υμένιο $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ πάχους 1000 και 100 nm, αντίστοιχα.



Σχήμα 43: Φάσματα ανάκλασης που ελήφθησαν από υποστρώματα Si που είχαν στην επιφάνεια τους υμένιο SiO_2 πάχους 300 (A), 500 (B), 700 (Γ), 1000 (Δ) ή 3000 nm (E), ή υμένιο Si_3N_4 πάχους 100 (ΣΤ) ή 250 nm (Ζ), ή διπλό υμένιο $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ πάχους 1000/100 nm (H).

Από τα φάσματα ανάκλασης που παρουσιάζονται στο Σχήμα 43, διαπιστώνεται ότι όταν χρησιμοποιείται SiO_2 ως υλικό για την κατασκευή του διαφανούς υμενίου στα υποστρώματα πυριτίου λαμβάνεται αυξανόμενος αριθμός ελαχίστων και μεγίστων στην περιοχή μηκών κύματος από 400 έως 800 nm καθώς το πάχος του υμενίου αυξάνεται από τα 300 στα 3000 nm. Από την άλλη, και οι δύο επιφάνειες με υμένιο Si_3N_4 παρουσίασαν ένα μόνο μέγιστο και ελάχιστο σε μήκη κύματος 600/850 nm και 600/850 nm για πάχος στοιβάδας Si_3N_4 100 και 250 nm, αντίστοιχα. Μια ακόμα σημαντική διαφορά μεταξύ των φασμάτων ανάκλασης που λαμβάνονται από επιφάνειες με υμένιο Si_3N_4 αντί SiO_2 είναι το γεγονός ότι η ένταση του ανακλώμενου φωτός στα σημεία του ελαχίστου συμβολής προσεγγίζει την τιμή 0 ενώ κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει για καμία από τις επιφάνειες με διαφανή υμένια SiO_2 . Από την επιφάνεια που φέρει την διπλοστοιβάδα SiO_2 και Si_3N_4 λαμβάνεται ένα φάσμα ανάκλασης με αριθμό μεγίστων και ελαχίστων ίσο με την επιφάνεια με υμένιο SiO_2 ιδίου πάχους και επιπροσθέτως το σήμα στην περιοχή των ελαχίστων προσεγγίζει τιμές κοντά στο μηδέν, όπως και στην περίπτωση των επιφανειών με υμένιο Si_3N_4 .

Προκειμένου να επιλεγεί τόσο το υλικό όσο και το πάχος του διαφανούς υμενίου, οι επιφάνειες τροποποιήθηκαν χημικά με APTES, ακινητοποιήθηκε με προσρόφηση πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός έναντι της CRP, και ακολούθησε αντίδραση με πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL. Στο Σχήμα 44, παρουσιάζονται οι αποκρίσεις που ελήφθησαν κατά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης από τις διαφορετικές επιφάνειες.



Σχήμα 44: Φαινόμενο πάχος της βιομοριακής στοιβάδας που σχηματίζεται σε υποστρώματα Si στα οποία έχουν εναποτεθεί υμένια SiO₂ ή Si₃N₄ διαφορετικού πάχους καθώς και συνδυασμός αυτών και τα οποία έχουν τροποποιηθεί με πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός έναντι της CRP μετά από αντίδραση με διάλυμα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Για τα υποστρώματα Si που φέρουν υμένιο από SiO₂ μέγιστες τιμές οροφής λαμβάνονται για υμένια με πάχη από 700-3000 nm. Από την άλλη πλευρά, τα υποστρώματα Si τα οποία φέρουν υμένιο Si₃N₄ ή συνδυασμό SiO₂/Si₃N₄ παρέχουν σημαντικά χαμηλότερες αποκρίσεις σε σχέση με τις τιμές που λαμβάνονται από επιφάνειες με υμένια SiO₂. Το αποτέλεσμα αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι ενώ στην περίπτωση των επιφανειών με υμένια SiO₂ παρατηρείτε μια διακριτή μετατόπιση του φάσματος ως αποτέλεσμα της αντίδρασης του αναλύτη με το ακινητοποιημένο αντίσωμα, στα υποστρώματα με υμένια Si₃N₄ ή συνδυασμό SiO₂/Si₃N₄, παρατηρήθηκε κυρίως μια μικρή μεταβολή του ύψους των κορυφών των μεγίστων παρά σε μετατόπιση τους σε υψηλότερα μήκη κύματος. Όσο αφορά δε τον θόρυβο της μέτρησης ήταν περίπου 0,01 nm για τα υποστρώματα με βέλτιστο πάχος υμενίου SiO₂ (από 700 έως 3000 nm) και κατά μέσο όρο 0,005 nm για τα υποστρώματα με υμένια Si₃N₄. Πρέπει να σημειωθεί ότι λόγω της μεγάλης διαφοράς στο μέγεθος του ειδικού σήματος, το χαμηλότερο σήμα θορύβου που λαμβάνεται για τα υμένια Si₃N₄ δεν μπορεί να αντισταθμίσει, το χαμηλό αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται κατά την μέτρηση. Για τον λόγο αυτό, αποφασίστηκε να

χρησιμοποιηθούν υποστρώματα Si με θερμικό SiO₂ πάχους 1000 nm για την συνέχιση της μελέτης.

6.3 Επιλογή μεθόδου ενεργοποίησης της αισθητήριας επιφάνειας

Η ακινητοποίηση βιομορίων στις επιφάνειες πυριτίου απαιτεί τροποποίηση της επιφάνειας με κατάλληλα αντιδραστήρια ώστε η επιφάνεια που προκύπτει να επιτρέπει την πρόσδεση τους είτε μέσω προσρόφησης ή με σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών. Για τον σκοπό αυτό, στην παρούσα εργασία συγκρίθηκαν πέντε διαφορετικά πρωτόκολλα χημικής τροποποίησης της επιφάνειας Si/SiO₂. Συγκεκριμένα τα πρωτόκολλα που μελετήθηκαν περιελάμβαναν τροποποίηση της επιφάνειας με:

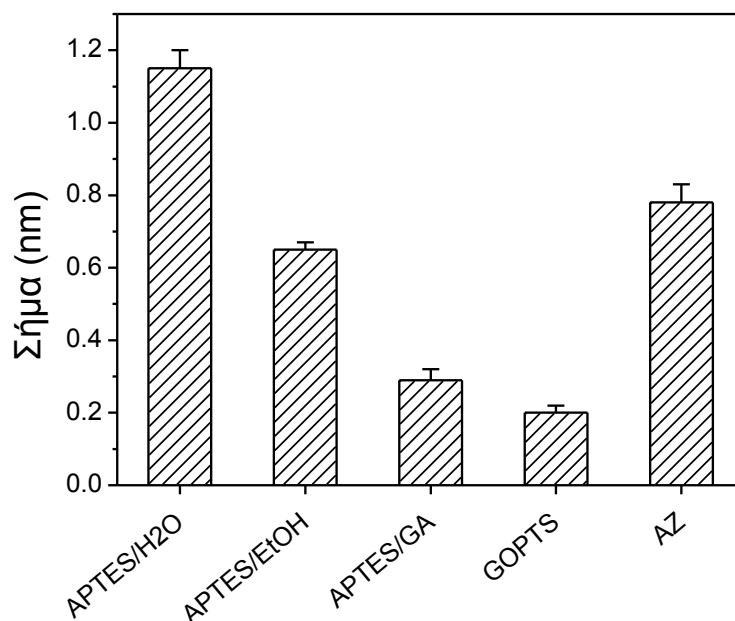
- 3-αμινοπροπυλοτριαιθοξυσιλάνιο (APTES) από υδατικό διάλυμα
- 3-αμινοπροπυλοτριαιθοξυσιλάνιο (APTES) από οργανικό διάλυμα
- 3-αμινοπροπυλοτριαιθοξυσιλάνιο (APTES) από υδατικό διαλύτη και ακολούθως αντίδραση με γλουταραλδεΐδη
- 3-γλυκιδυλοξυπροπυλτριμεθοξυσιλάνιου (GOPTS) από οργανικό διάλυμα
- οργανικό πολυμερές (AZ5214)

Η τροποποίηση της επιφάνειας με αλκοξυ-οργανοσιλάνια όπως το APTES και το GOPTS έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μονομοριακών υμενίων τα οποία ανάλογα με τις ομάδες που φέρει το σιλάνιο εισάγουν στην επιφάνεια δραστικές ομάδες όπως αμινο- και επόξυ-ομάδες όταν χρησιμοποιείται APTES και GOPTS, αντίστοιχα. Στις τροποποιημένες με APTES επιφάνειες τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να ακινητοποιηθούν είτε μέσω φυσικής προσρόφησης είτε μέσω αντίδρασης με τις αμινομάδες που έχουν εισαχθεί στην επιφάνεια. Προκειμένου να εξεταστούν και οι δύο περιπτώσεις, επιφάνειες Si/SiO₂ τροποποιημένες με APTES χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν για ακινητοποίηση πρωτεϊνικών μορίων με προσρόφηση και μετά από αντίδραση με γλουταραλδεΐδη με ομοιοπολική αντίδραση. Στην δεύτερη περίπτωση, μετά την αντίδραση με γλουταραλδεΐδη, στην επιφάνεια εισάγονται αλδεΐδο-ομάδες που αντιδρούν ομοιοπολικά με ελεύθερες

αμινομάδες των πρωτεϊνών (κυρίως πλευρικές αμινο-ομάδες καταλοίπων λυσίνης).

Παρομοίως η τροποποίηση της επιφάνειας Si/SiO₂ με GOPTS οδηγεί στην εισαγωγή επόξυ-ομάδων, οι οποίες αντιδρούν ομοιοπολικά με ελεύθερες αμινο-ομάδες των πρωτεϊνικών μορίων σχηματίζοντας ιμίνες (βάσεις Schiff). Τέλος, η τροποποίηση της επιφάνειας Si/SiO₂ με ένα υμένιο πάχους περίπου 50 nm του πολυμερούς AZ5214, οδηγεί σε επιφάνειες που παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα ακινητοποίησης πρωτεϊνικών μορίων με φυσική προσρόφηση [114]. Το AZ5214 είναι ένα φωτοευαίσθητο υλικό που χρησιμοποιείται ευρέως στην μικροηλεκτρονική για την μικροσχηματοποίηση επιφανειών πυριτίου. Η χρήση του ως πολυμερικό υμένιο για την προσρόφηση πρωτεϊνών στηρίζεται στο γεγονός ότι αν το υμένιο αυτό μετά την επίστρωση του στην επιφάνεια θερμανθεί σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 180 °C, καταστρέφεται ο φωτοευαίσθητοποιητής και το υμένιο καθίσταται αδιάλυτο σε υδατικούς ή άλλους διαλύτες προσφέροντας μια επιφάνεια στην οποία μπορούν να προσροφηθούν πρωτεϊνικά μόρια.

Η αξιολόγηση των διαφορετικών πρωτοκόλλων χημικής τροποποίησης της επιφάνειας Si/SiO₂ πραγματοποιήθηκε με ακινητοποίηση του ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος αιγός έναντι της CRP και καταγραφή του σήματος κατά την αντίδραση με πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL. Στο σχήμα 45 παρουσιάζονται οι αποκρίσεις που λαμβάνονται από τις επιφάνειες που τροποποιήθηκαν ακολουθώντας τα 5 διαφορετικά πρωτόκολλα χημικής τροποποίησης που αναφέρθηκαν παραπάνω.



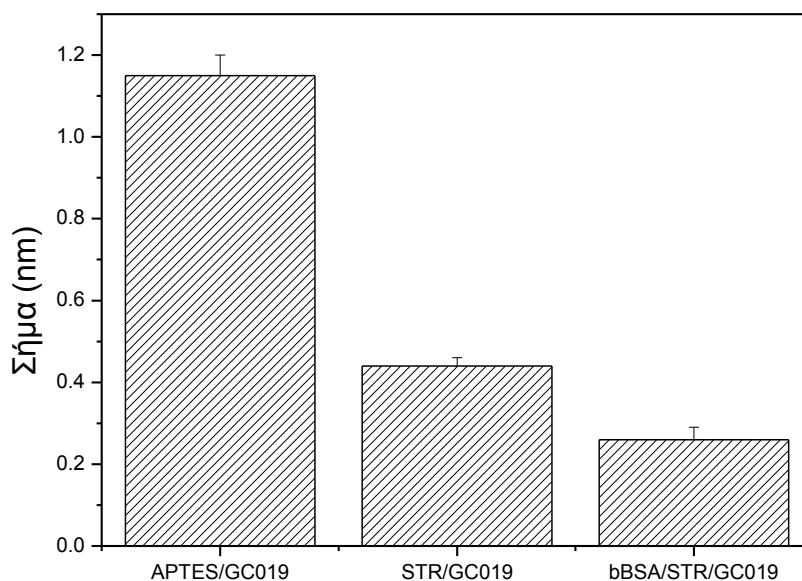
Σχήμα 45: Φαινόμενο πάχος της βιομοριακής στοιβάδας που σχηματίζεται σε υποστρώματα Si/SiO₂ τα οποία έχουν υποστεί διαφορετικές τροποποιήσεις και στις οποίες έχει ακινητοποιηθεί πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός έναντι της CRP κατά την αντίδραση με διάλυμα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL. Οι διαφορετικές τροποποιήσεις που παρουσιάζονται είναι: APTES σε υδατικό διάλυμα (APTES/H₂O, πρώτη στήλη), APTES σε διάλυμα αιθανόλης (APTES/EtOH, δεύτερη στήλη), APTES σε υδατικό διάλυμα και ενεργοποίηση με γλουταραλδεϋδη (APTES/GA, τρίτη στήλη), GOPTS σε άνυδρο τολουόλιο (GOPTS, τέταρτη στήλη), και AZ5214 (AZ, πέμπτη στήλη). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο σχήμα 45, η τροποποίηση της επιφάνειας με υδατικό διάλυμα APTES παρέχει το υψηλότερο αναλυτικό σήμα. Υψηλά σήματα λαμβάνονται επίσης και από τις επιφάνειες που έχουν τροποποιηθεί με διάλυμα APTES σε αιθανόλη καθώς και με το πολυμερές AZ, όπου τα αντισώματα ακινητοποιούνται μέσω προσρόφησης. Αποφασίστηκε λοιπόν για τη συνέχεια της μελέτης μας να χρησιμοποιηθούν υποστρώματα Si όπου έχει γίνει χημική τροποποίηση της επιφάνειας με υδατικό διάλυμα APTES.

6.4 Επιλογή μεθόδου ακινητοποίησης των ειδικών αντισωμάτων στην αισθητήρια επιφάνεια

Μετά την επιλογή της μεθόδου ενεργοποίησης της επιφάνειας Si/SiO₂ διερευνήθηκαν τρόποι για την ακινητοποίηση του αντισώματος στην ενεργοποιημένη αισθητήρια επιφάνεια. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η ακινητοποίηση του πολυκλωνικού αντισώματος αιγός κατά της CRP τόσο με απευθείας προσρόφηση όσο και διάφορες μεθόδους έμμεσης ακινητοποίησης με τη χρήση του συστήματος στρεπταβιδίνης/βιοτίνης ή αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών αιγός. Για την ακινητοποίηση του αντισώματος με το σύστημα στρεπταβιδίνης/βιοτίνης το αντίσωμα κατά της CRP βιοτινυλιώθηκε και ακολούθως διερευνήθηκε η ακινητοποίηση τους στην επιφάνεια με δύο τρόπους: α) πρόσδεση σε απευθείας προσροφημένη στην ενεργοποιημένη επιφάνεια Si/SiO₂ στρεπταβιδίνη ή β) τροποποίηση της ενεργοποιημένης επιφάνειας με βιοτινυλιωμένη BSA, πρόσδεση της στρεπταβιδίνης μέσω αντίδρασης με την ακινητοποιημένη βιοτίνη και σε επόμενο στάδιο πρόσδεση του βιοτινυλιωμένου αντισώματος μέσω αντίδρασης με την ακινητοποιημένη στην επιφάνεια στρεπταβιδίνη. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών αιγός για την ακινητοποίηση του ειδικού αντισώματος κατά της CRP, αρχικά ακινητοποιείται το αντίσωμα αυτό με προσρόφηση και ακολουθεί πρόσδεση του ειδικού αντισώματος.

Στο Σχήμα 46 παρουσιάζονται οι αποκρίσεις που ελήφθησαν ακολουθώντας τα διαφορετικά πρωτοκόλλα ακινητοποίησης του αντισώματος κατά της CRP στην επιφάνεια Si/SiO₂ κατά την αντίδραση με πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL.

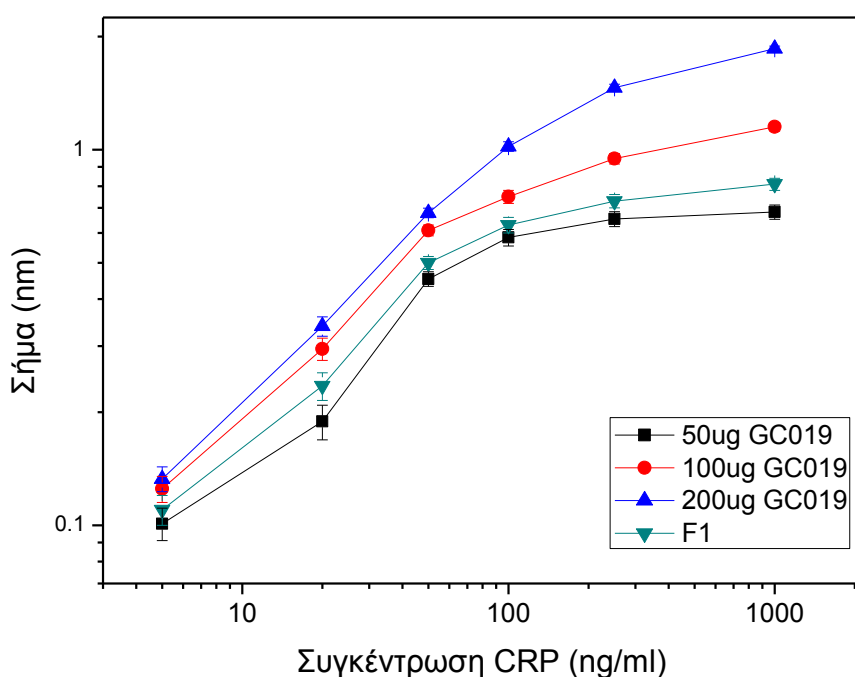


Σχήμα 46: : Φαινόμενο πάχος της βιομοριακής στοιβάδας (σήμα) που σχηματίζεται σε υποστρώματα Si/SiO_2 τα οποία έχουν τροποποιηθεί με APTES και στην συνέχεια έχει ακινητοποιηθεί πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός κατά της CRP κατά την αντίδραση με πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 100 ng /mL. Οι διαφορετικοί τρόποι ακινητοποίησης του ειδικού αντισώματος που παρουσιάζονται είναι: πρώτη στήλη: απευθείας προσρόφηση του αντισώματος, δεύτερη στήλη: πρόσδεση βιοτινυλιωμένου αντισώματος σε προσροφημένη στρεπταβιδίνη, τρίτη στήλη: πρόσδεση βιοτινυλιωμένου αντισώματος σε δεσμευμένη στρεπταβιδίνη σε προσροφημένη bBSA (bBSA/STR/GC019, τρίτη στήλη). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Παρατηρούμε ότι, ακινητοποίηση των αντισωμάτων απευθείας στην επιφάνεια με προσρόφηση μας δίνει το μεγαλύτερο αναλυτικό σήμα. Αντίθετα σε όλες τις άλλες τις περιπτώσεις τα αναλυτικά σήματα είναι εμφανώς μικρότερα. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα αποφασίστηκε για τη συνέχεια της μελέτης η ακινητοποίηση του αντισώματος στην επιφάνεια να γίνεται απευθείας με προσρόφηση όπως περιγράφεται στο σχετικό Πρωτόκολλο Ακινητοποίησης I (εδάφιο 5.13.1).

6.5 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του αντισώματος στην αισθητήρια επιφάνεια

Στη συνέχεια της μελέτης, χρησιμοποιώντας την βέλτιστη μέθοδο ενεργοποίησης της επιφάνειας Si/SiO₂ και ακινητοποίησης του ειδικού αντισώματος, προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση αντισώματος που χρησιμοποιείται για την ακινητοποίηση. Για τον σκοπό αυτό, το πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός έναντι της CRP ακινητοποιήθηκε με απευθείας προσρόφηση από διαλύματα συγκέντρωσης 50 έως 400 µg/mL. Για κάθε συγκέντρωση αντισώματος προσδιορίστηκαν οι αποκρίσεις του αισθητήρα για μια σειρά προτύπων διαλυμάτων της CRP με συγκεντρώσεις 0, 5, 20, 50, 100, 250 και 1000 ng/mL, προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση αντισώματος που παρέχει το υψηλότερο δυνατό ειδικό σήμα σε συνδυασμό με το χαμηλότερο σήμα μη ειδικής δέσμευσης.



Σχήμα 47: Μεταβολή του φαινόμενου πάχους της βιομοριακής στοιβάδας (σήμα) που σχηματίζεται σε υποστρώματα Si/SiO₂ τα οποία έχουν τροποποιηθεί με APTES και στην συνέχεια έχει ακινητοποιηθεί πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός από διαλύματα συγκεντρώσεων: 50 (μαύρα τετράγωνα), 100 (κόκκινοι κύκλοι), 200 (μπλέ τρίγωνα) και 400 µg/mL (πράσινα τρίγωνα) συναρτήσει της συγκέντρωσης της CRP. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.

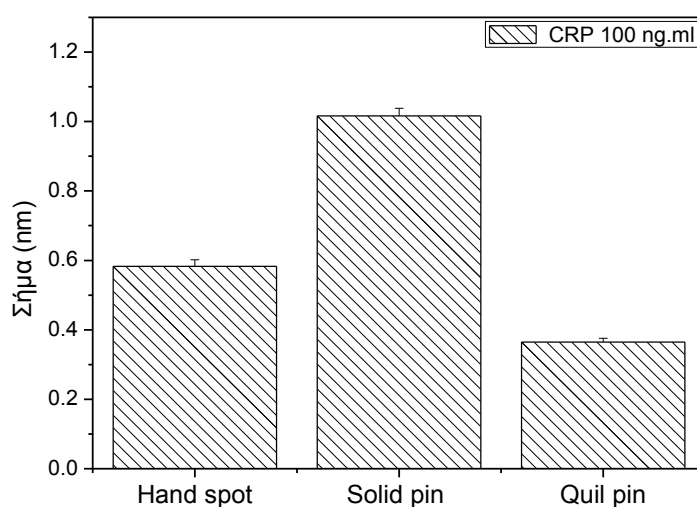
Στο Σχήμα 47, παρουσιάζονται οι καμπύλες σημάτων που ελήφθησαν συναρτήσει της συγκέντρωσης της CRP από επιφάνειες που είχαν ενεργοποιηθεί με αντισώμα GC019 σε συγκεντρώσεις 50, 100, 200 και 400 $\mu\text{g/mL}$. Όπως φαίνεται στο σχήμα αυτό, μέγιστες αποκρίσεις λαμβάνονται από επιφάνειες που είχαν τροποποιηθεί με διάλυμα αντισώματος GC019 200 $\mu\text{g/mL}$, ενώ αύξηση της συγκέντρωσης στα 400 $\mu\text{g/mL}$ οδήγησε σε μείωση των σημάτων που ελήφθησαν για όλη την περιοχή συγκεντρώσεων CRP. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές μη ειδικής δέσμευσης ήταν παρόμοιες για όλες τις συγκεντρώσεις αντισώματος που χρησιμοποιήθηκαν, Έτσι, για τη συνέχεια της μελέτης μας αποφασίστηκε η συγκέντρωση του αντισώματος κατά της CRP που χρησιμοποιείτε για την τροποποίηση της επιφάνειας να είναι 200 $\mu\text{g/mL}$.

6.6 Επιλογή μεθόδου εναπόθεσης του αντισώματος δέσμευσης στην επιφάνεια για την δημιουργία των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών

Για την επιλογή της μεθόδου εναπόθεσης των διαλυμάτων των αντισωμάτων δέσμευσης στην αισθητήρια επιφάνεια μελετήθηκαν δύο διαφορετικοί τρόποι εναπόθεσης. Αρχικά η εναπόθεση έγινε με τοποθέτηση κηλίδων 0,5 μl με το χέρι και χρήση κατάλληλης πιπέτας (hand spot). Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε αυτόματη συσκευή εναπόθεσης κηλίδων (microarray spotter) σε συνδυασμό με δύο τύπους ακίδων: ακίδα τύπου πέννας (διάτρητες ακίδες) και συμπαγή ακίδα. Προκειμένου να καλυφθεί μια περιοχή 2x2 mm στη επιφάνεια με το διάλυμα του αντισώματος με το χέρι και τη χρήση μικροπιπέτας απαιτούνταν περίπου 20 κηλίδες δηλ. μια συνολική ποσότητα διαλύματος περίπου 10 μl . Αντιθέτως, με την αυτόματη συσκευή εναπόθεσης κηλίδων για να καλυφθεί η ίδια επιφάνεια απαιτούνταν 2500 κηλίδες όγκου 1.25 nL, με την ακίδα τύπου πέννας και 1200 κηλίδες όγκου 4.4 nL με τη συμπαγή ακίδα. Η χρήση της ακίδας τύπου πέννας έχει το πλεονέκτημα σε σχέση με τη συμπαγή ακίδα ότι είναι δυνατό με μια μόνο βύθιση στο διάλυμα του αντισώματος να εναποτεθούν πολλαπλές κηλίδες πάνω στην επιφάνεια. Από την άλλη, ο όγκος του διαλύματος που εναποτίθεται με την ακίδα τύπου πέννας είναι τέσσερις φορές μικρότερος από αυτόν που εναποτίθεται με τη συμπαγή κηλίδα. Έτσι αφενός απαιτείται πολύ μεγαλύτερος αριθμός κηλίδων

προκειμένου να πραγματοποιηθεί ομοιόμορφη κάλυψη της επιφάνειας με διάλυμα.

Στο Σχήμα 48, παρουσιάζονται οι τιμές του ειδικού σήματος που ελήφθησαν κατά την αντίδραση με πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL από επιφάνειες που έχει ακινητοποιηθεί πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της CRP με τρεις τρόπους, δηλ., με το χέρι, με αυτόματη συσκευή εναπόθεσης και ακίδα τύπου πέννας και τέλος με την αυτόματη συσκευή εναπόθεσης και συμπαγή κηλίδα. Όπως προκύπτει από το σχήμα, με την χρήση της συμπαγούς ακίδας λαμβάνουμε πολύ μεγαλύτερο αναλυτικό σήμα σε σχέση με το σήμα που λαμβάνεται από επιφάνεια στην οποία το ειδικό αντίσωμα έχει εναποτεθεί με ακίδα τύπου πέννας. Επίσης, το σήμα είναι σχεδόν διπλάσιο από αυτό που λαμβάνεται όταν η εναπόθεση γίνεται με το χέρι. Αποφασίστηκε λοιπόν ότι για την εναπόθεση του διαλύματος του αντισώματος δέσμευσης στη αισθητήρια επιφάνεια θα χρησιμοποιείται η αυτόματη συσκευή εναπόθεσης με τη συμπαγή ακίδα.

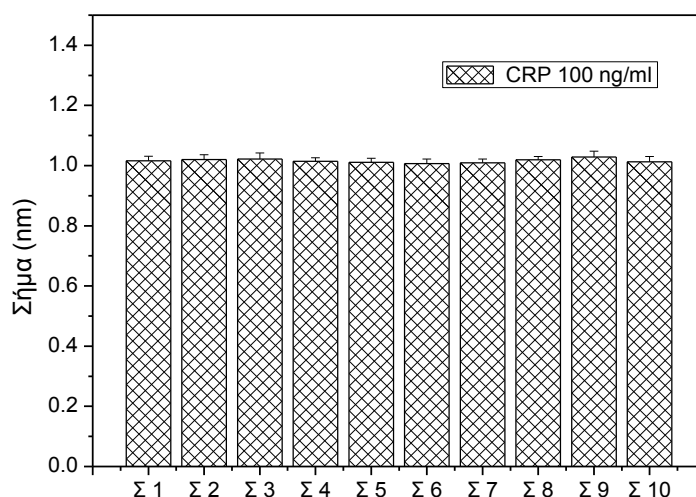


Σχήμα 48: Φαινόμενο πάχος της βιομοριακής στοιβάδας (σήμα) που σχηματίζεται σε ενεργοποιημένα υποστρώματα Si/SiO₂ στα οποία το ειδικό κατά της CRP έχει εναποτεθεί με το χέρι (hand spot), ή με αυτόματη συσκευή εναπόθεσης κηλίδων με τη συμπαγή (solid pin) ή την ακίδα τύπου πέννας (quill pin). Οι τιμές αφορούν πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

6.7 Έλεγχος της ομοιογένειας της ακινητοποίησης αντισώματος στην αισθητήρια επιφάνεια

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη λήψη αξιόπιστων μετρήσεων με την διάταξη του αισθητήρα που αναπτύχτηκε στην παρούσα μελέτη είναι η ομοιογενής εναπόθεση και ακινητοποίηση των αντισωμάτων στην αισθητήρια επιφάνεια. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν οι επιλεγθείσες συνθήκες εναπόθεσης των διαλυμάτων αντισωμάτων στην αισθητήρια επιφάνεια εξασφαλίζουν ομοιογενή κάλυψη της επιφάνειας με αντίσωμα πολυκλωνικό αντίσωμα (GC019) έναντι της CRP ακινητοποιήθηκε σε περιοχή με διαστάσεις 2 mm x 2 mm με την αυτόματη συσκευή εναπόθεσης κηλίδων και χρήση συμπαγούς κηλίδας. Ακολούθως έγινε καταγραφή του σήματος που λαμβάνεται κατά τη διέλευση πρότυπου διαλύματος CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL σε 10 διαφορετικά σημεία εντός της περιοχής που είχε ακινητοποιηθεί το ειδικό αντίσωμα.

Στο Σχήμα 49, παρουσιάζονται οι τιμές του σήματος που ελήφθησαν για το πρότυπο διάλυμα CRP από τα 10 διαφορετικά σημεία της ίδιας επιφάνειας στην οποία είχε εναποτεθεί αντίσωμα GC019. Όπως προκύπτει από το σχήμα, υπάρχει εξαιρετική επαναληψιμότητα μεταξύ των μετρήσεων που λαμβάνονται από τα διαφορετικά σημεία της βιοδραστικής επιφάνειας καθώς η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (coefficient of variation) είναι μικρότερη από 2%. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι υπάρχει υψηλή ομοιογένεια ακινητοποίησης του αντισώματος στην αισθητήρια επιφάνεια με τη μέθοδο και τις συνθήκες που επιλέχθηκαν.

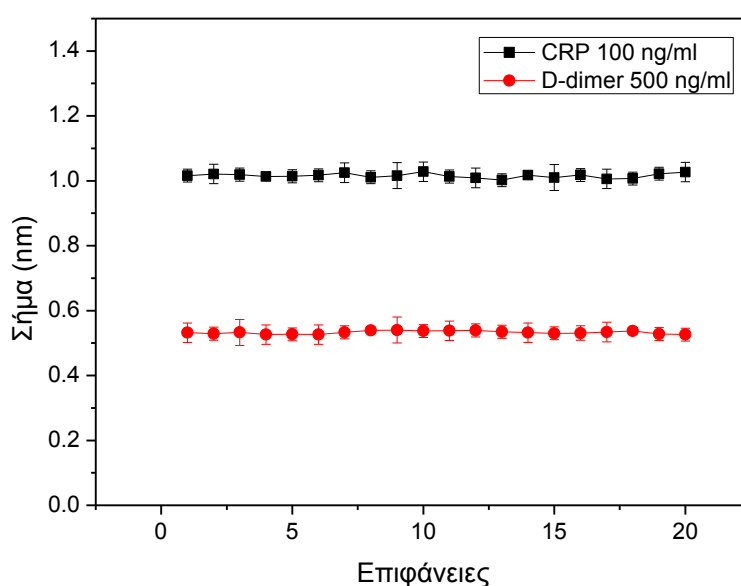


Σχήμα 49: Φαινόμενο πάχος βιομοριακής στοιβάδας (σήμα) που λαμβάνεται από 10 διαφορετικά σημεία μιας επιφάνειας Si/SiO₂ στην οποία έχει ακινητοποιηθεί αντίσωμα έναντι της CRP. Τα αποτελέσματα αφορούν συγκέντρωση CRP 100 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

6.8 Έλεγχος επαναληψιμότητας της μέτρησης μεταξύ διαφορετικών επιφανειών

Εκτός από την υψηλή ομοιογένεια της ακινητοποίησης του αντισώματος δέσμευσης και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων στην ίδια αισθητήρια επιφάνεια, υψηλή επαναληψιμότητα πρέπει να υπάρχει και μεταξύ των μετρήσεων που λαμβάνονται από διαφορετικές επιφάνειες. Για τον λόγο αυτόν, ελέγχθηκε επίσης η επαναληψιμότητα των μετρήσεων που λαμβάνονται από διαφορετικές επιφάνειες. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε και για τους δυο αναλύτες στόχους δηλ., την CRP και τα D-dimers. Για τον σκοπό αυτό, τροποποιήθηκαν με ειδικά αντισώματα 40 επιφάνειες οι οποίες προέρχονταν από 4 διαφορετικές παρτίδες. Σε 20 από αυτές εναποτέθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός (GC019) έναντι της CRP και στις άλλες 20 πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός (GDD) έναντι των D-dimers. Στην συνέχεια οι επιφάνειες χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των αναλυτών σε πρότυπα διαλύματα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL και D-dimers 500 ng/mL, αντίστοιχα.

Στο Σχήμα 50, παρουσιάζονται οι τιμές του ειδικού σήματος που ελήφθησαν από τις διαφορετικές επιφάνειες που είχαν εναποτεθεί τα αντισώματα δέσμευσης GC019 και GDD κατά την διέλευση διαλύματος CRP (A) και των D-dimers (B), αντίστοιχα. Όπως φαίνεται από το σχήμα, υπάρχει εξαιρετική επαναληψιμότητα μεταξύ των μετρήσεων που λαμβάνονται από τις διαφορετικές επιφάνειες, ακόμα και για επιφάνειες που δεν έχουν κατασκευαστεί σε μια παρτίδα. Και για τους δυο αναλύτες, η διακύμανση των τιμών του σήματος που ελήφθη από τις 20 διαφορετικές επιφάνειες είναι μικρότερη από 5%. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι όταν έχει επιτευχθεί υψηλή ομοιογένεια ακινητοποίησης του αντισώματος εντός της ίδιας επιφάνειας, τα αναλυτικά σήματα που λαμβάνονται και από διαφορετικές επιφάνειες θα είναι επίσης επαναλήψιμα.

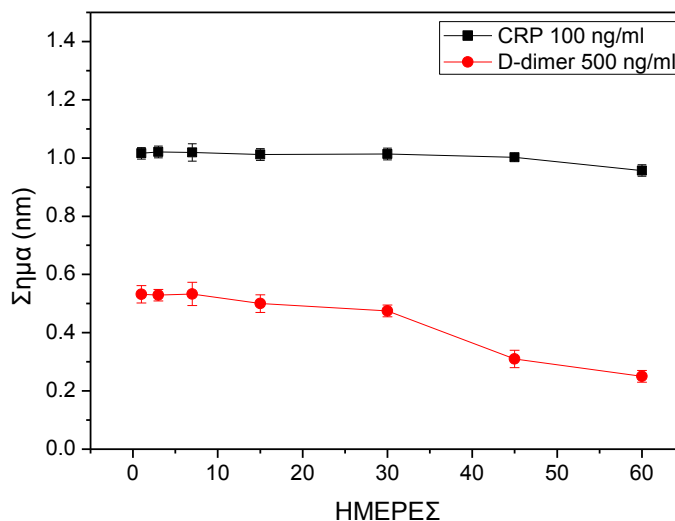


Σχήμα 50: Τιμές φαινόμενου πάχους βιομοριακής στοιβάδας (σήμα) που ελήφθησαν από διαφορετικές επιφάνειες στις οποίες είχε ακινητοποιηθεί αντίσωμα έναντι της CRP ή των D-dimers (20 επιφάνειες για κάθε αναλύτη). Τα αποτελέσματα αφορούν συγκέντρωση CRP 100 ng/mL και D-dimers 500 ng/mL, αντίστοιχα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

6.9 Σταθερότητα τροποποιημένων αισθητήριων επιφανειών

6.9.1 Σταθερότητα ακινητοποιημένων αντισωμάτων σε τροποποιημένες αισθητήριες επιφάνειες κατά την αποθήκευσή τους

Μία σημαντική παράμετρος που ελέγχθηκε επίσης στα πλαίσια της βελτιστοποίησης των τροποποιημένων με αντίσωμα αισθητήριων επιφανειών ήταν η σταθερότητά του σήματος κατά την αποθήκευση μετά την Παρασκευή τους. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν δυο σειρές επιφανειών τροποποιημένων με APTES και στην μια σειρά εναποτέθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός έναντι της CRP ενώ στην άλλη κατά των D-dimers. Στην συνέχεια έγινε αποκλεισμός των ελευθέρων θέσεων (διάλυμα ανθρακικών που περιείχε 1% (β/ο) BSA) και οι επιφάνειες αφού εκπλύθηκαν, ξηράνθηκαν σε ρεύμα αζώτου και αποθηκεύτηκαν σε ξηραντήρα υπό κενό σε θερμοκρασία 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Στο Σχήμα 51 παρουσιάζονται οι τιμές αναλυτικού σήματος που ελήφθησαν από τροποποιημένες με αντίσωμα επιφάνειες συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης των επιφανειών. Η τιμή στον χρόνο 0 αντιστοιχεί σε επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν μετά την παρασκευή τους για πρώτη φορά.

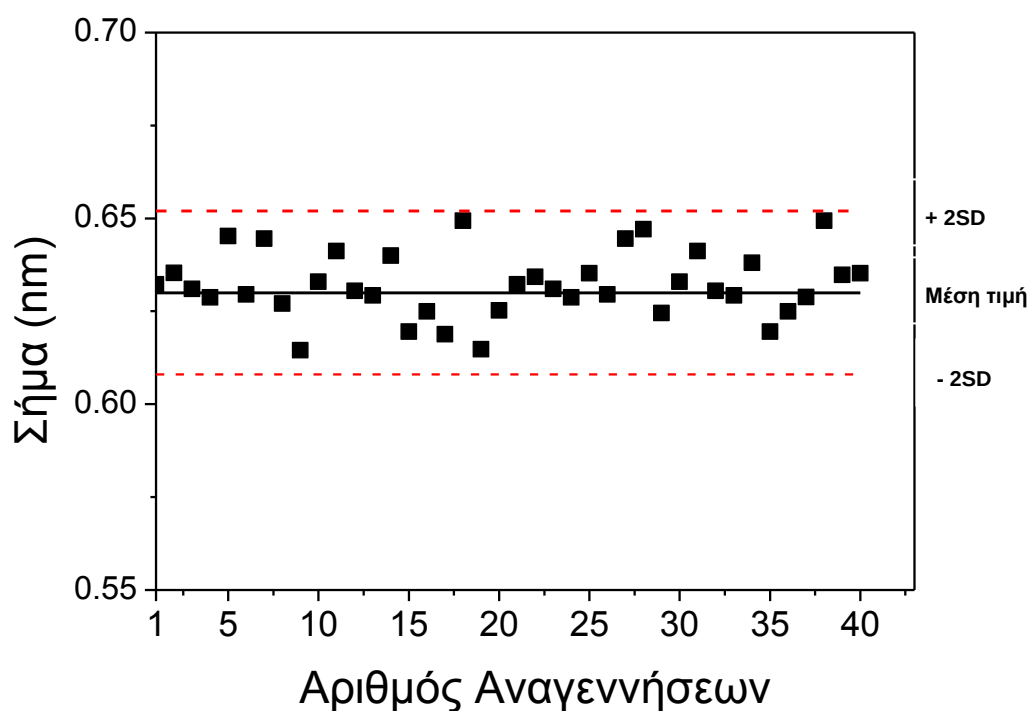


Σχήμα 51: Τιμές σήματος που ελήφθησαν από επιφάνειες στις οποίες είχε ακινητοποιηθεί αντίσωμα έναντι της CRP και των D-dimers και φυλάχθηκαν σε ξηραντήρα υπό κενό σε θερμοκρασία 4 °C συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης. Οι τιμές αντιστοιχούν σε πρότυπα διαλύματα CRP 100 ng/mL και D-dimers 500 ng/mL. Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Όπως προκύπτει από το σήμα, οι επιφάνειες στις οποίες είχε εναποτεθεί αντίσωμα έναντι της CRP ήταν σταθερές για τουλάχιστον 40 ημέρες καθώς τόσο το σήμα όσο και η διακύμανση του σήματος εντός της ίδιας μέτρησης ($CV = 3,4-5,1\%$) ήταν ίδια στατιστικά με τις αντίστοιχες τιμές που ελήφθησαν από επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν αμέσως μετά την παρασκευή τους (φρέσκιες επιφάνειες). Μετά από αποθήκευση για χρονικό διάστημα 60 ημερών παρατηρήθηκε μια πτώση περίπου 10% ως προς το σήμα που ελήφθη από φρέσκιες επιφάνειες. Οι επιφάνειες στις οποίες είχε εναποτεθεί αντίσωμα έναντι των D-dimers παρουσίασαν απώλεια σήματος κατά περίπου 10% της τιμής του αρχικού σήματος μετά από δυο εβδομάδες αποθήκευσης ενώ ήταν στατιστικά σταθερές για τουλάχιστον μια εβδομάδα. Μετά από αποθήκευση για χρονικό διάστημα 60 ημερών, οι τιμές που ελήφθησαν ήταν μειωμένες κατά 50% σε σχέση με τη τιμή που ελήφθη την ημέρα παρασκευής τους (φρέσκια επιφάνεια). Παρατηρείται λοιπόν μια μεγαλύτερη σταθερότητα του αντισώματος έναντι της CRP σε σχέση με αυτό έναντι των D-dimers κατά την αποθήκευση των τροποποιημένων με αντίσωμα επιφανειών. Ως εκ τούτου, οι επιφάνειες που θα χρησιμοποιηθούν για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των δυο αναλυτών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εντός χρονικού διαστήματος μιας εβδομάδας από την παρασκευή τους.

6.9.2 Διερεύνηση δυνατότητας αναγέννησης των τροποποιημένων με αντίσωμα αισθητήριων επιφανειών

Μελετήθηκε η δυνατότητα αναγέννησης του ακινητοποιημένου στην επιφάνεια αντισώματος και η επαναχρησιμοποίηση της επιφάνειας χρησιμοποιώντας επιφάνεια Si/SiO_2 τροποποιημένη με APTES και πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός έναντι της CRP. Η αναγέννηση του ακινητοποιημένου στην επιφάνεια αντισώματος πραγματοποιήθηκε με διάλυμα γλυκίνης-HCl 0,1M, pH 2,5, ενώ για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 50 ng/mL. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 40 κύκλοι αντίδρασης/αναγέννησης με την ίδια επιφάνεια. Στο Σχήμα 52 παρουσιάζονται οι τιμές που ελήφθησαν από τους επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης/αναγέννησης για διάλυμα 50 ng/mL CRP.



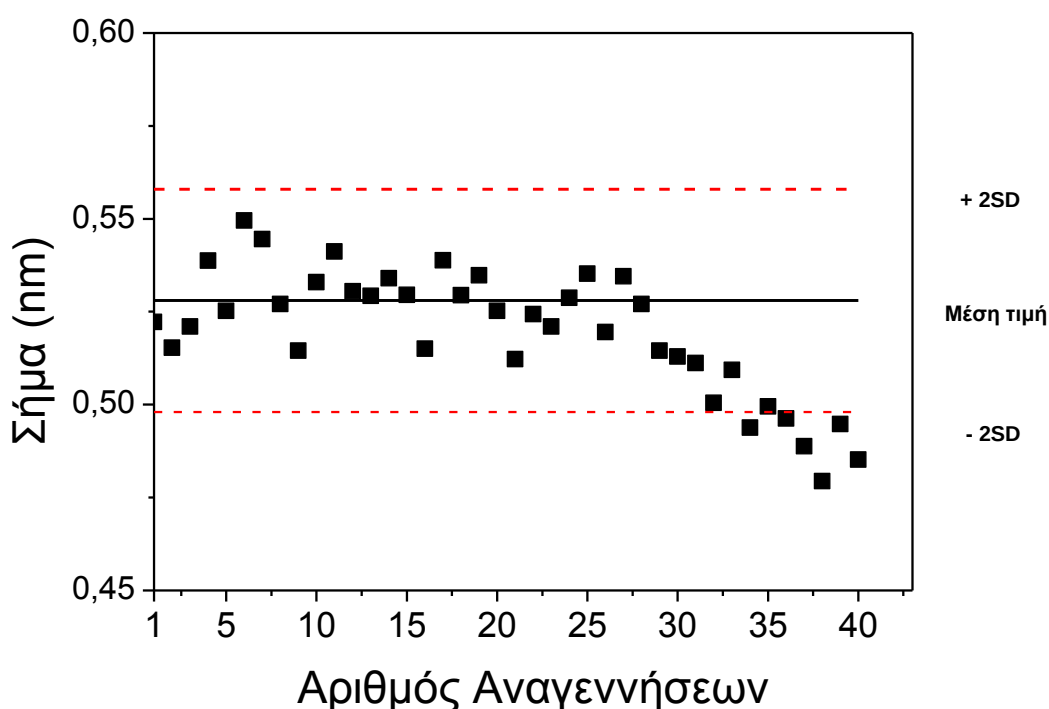
Σχήμα 52: Τιμές σήματος που ελήφθησαν από επιφάνεια στην οποία είχε ακινητοποιηθεί αντίσωμα έναντι της CRP μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης/αναγέννησης. Οι τιμές αφορούν πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 50 ng/mL.

Όπως προκύπτει από το σχήμα, οι επιφάνειες στις οποίες έχει ακινητοποιηθεί το αντίσωμα έναντι της CRP παρείχαν το ίδιο αναλυτικό σήμα για 40 τουλάχιστον επαναλαμβανόμενες μετρήσεις καθώς όλες οι τιμές που λαμβάνουμε είναι μεταξύ των ορίων μέση τιμή $\pm$ 2SD. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 2 ημερών.

Παρομοίως διερευνήθηκε η δυνατότητα αναγέννησης επιφανειών στις οποίες έχει ακινητοποιηθεί αντίσωμα κατά των D-dimers. Και στην περίπτωση αυτή πραγματοποιήθηκαν συνολικά 40 κύκλοι αντίδρασης/αναγέννησης με πρότυπο διάλυμα D-dimers συγκέντρωσης 500 ng/mL. Όπως προκύπτει από το Σχήμα 53, σταθερές τιμές (τιμές εντός των ορίων μέση τιμή $\pm$ 2 SD) λαμβάνονται για τους πρώτους 30 κύκλους αντίδρασης/αναγέννησης, ενώ για επιπλέον κύκλους αντίδρασης/αναγέννησης παρατηρείτε μια βαθμιαία πτώση

του αναλυτικού σήματος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 2 ημερών.

Συμπεραίνουμε ότι, οι τροποποιημένες επιφάνειες στις οποίες έχουν ακινητοποιηθεί τα ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα κατά της CRP και των D-dimers μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τουλάχιστον 30 επαναλαμβανόμενες μετρήσεις μετά από αντίστοιχες αναγεννήσεις χωρίς να επηρεαστεί η δυνατότητα δέσμευσης του αναλύτη.

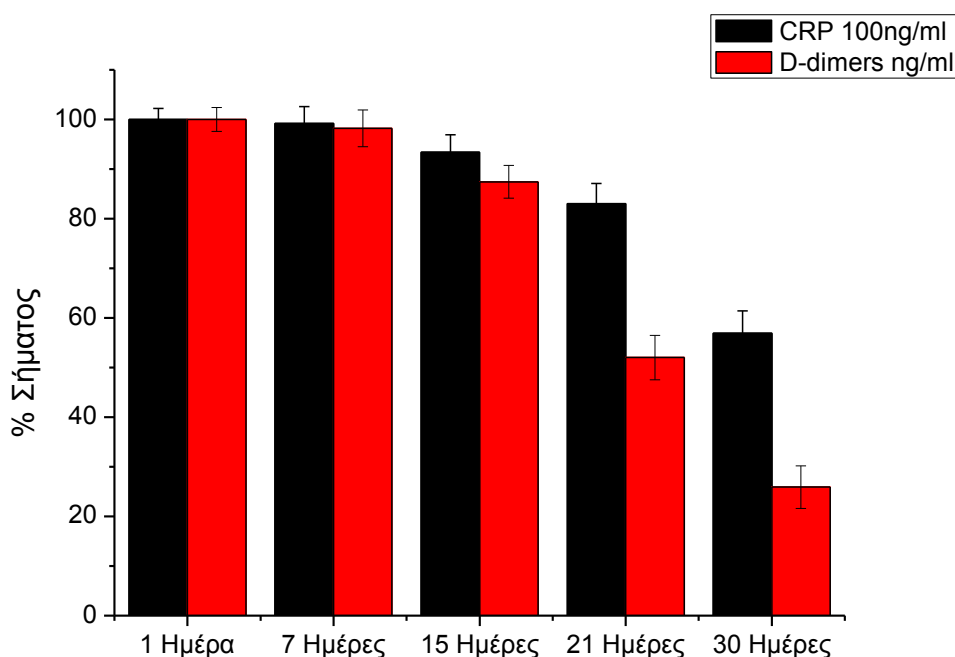


Σχήμα 53: Τιμές σήματος που ελήφθησαν από επιφάνεια στην οποία είχε ακινητοποιηθεί αντίσωμα έναντι των D-dimers μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης/αναγέννησης. Οι τιμές αφορούν πρότυπο διάλυμα D-dimers συγκέντρωσης 500 ng/mL.

6.9.3 Σταθερότητα ακινητοποιημένων σε τροποποιημένες αισθητήριες επιφάνειες αντισωμάτων στο χρόνο μετά από επαναλαμβανόμενες αναγεννήσεις

Στο προηγούμενο υποκεφάλαιο (6.9.2) παρουσιάστηκε η σταθερότητα των τροποποιημένων επιφανειών για την ανίχνευση της CRP και των D-dimers μετά από επαναλαμβανόμενες αναγεννήσεις. Στο υποκεφάλαιο αυτό

παρουσιάζεται η σταθερότητα της επιφάνειας στη πάροδο του χρόνου μετά από επαναλαμβανόμενες αναγεννήσεις. Για το σκοπό αυτό, επιφάνεια στην οποία είχε ακινητοποιηθεί αντίσωμα κατά της CRP δοκιμάστηκε για διάστημα ενός μηνός χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL. Κάθε ημέρα, πραγματοποιούνταν 3 κύκλοι αντίδρασης/αναγέννησης της επιφάνειας με ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-HCl 0,1 M, pH 2,5. Οι ίδιες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν και σε επιφάνεια που είχε τροποποιηθεί με ειδικό αντίσωμα κατά των D-dimers για πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 500 ng/mL. Στο Σχήμα 54, παρουσιάζονται οι τιμές που ελήφθησαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ελέγχου των επιφανειών εκφρασμένες σε επί τις εκατό ποσοστό (%) του αναλυτικού σήματος που λαμβάνεται από τις επιφάνειες αμέσως μετά την παρασκευή τους (χρονική στιγμή 0).



Σχήμα 54: Τιμές σήματος που ελήφθησαν από επιφάνειες στις οποίες είχαν ακινητοποιηθεί αντισώματα έναντι της CRP (μαύρες στήλες) και των D-dimers (κόκκινες στήλες) μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης/αναγέννησης εκφρασμένες ως επί τοις εκατό ποσοστά των τιμών που ελήφθησαν από τις επιφάνειες αμέσως μετά την παρασκευή τους (τιμή χρόνος 0). Οι τιμές αφορούν πρότυπα διαλύματα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL και D-dimers 500 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Από το σχήμα προκύπτει, ότι οι επιφάνειες στις οποίες έχουν ακινητοποιηθεί τα αντισώματα έναντι των αναλυτών που μελετούμε παρείχαν σταθερό αναλυτικό σήμα για τουλάχιστον 7 ημέρες (21 επαναλαμβανόμενες μετρήσεις) μετά την παρασκευή τους. Μετά από 15 ημέρες συνεχούς χρήσης χάνουν περίπου το 15 % της ικανότητας δέσμευσης του αναλύτη σε σχέση με τις φρέσκιες επιφάνειες ενώ χάνουν περισσότερο από 40 % της ικανότητας δέσμευσης μετά από ένα μήνα συνεχούς χρήσης. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι, οι τροποποιημένες με ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα επιφάνειες μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνεχώς για τουλάχιστον δύο εβδομάδες χωρίς σημαντική απώλεια της ικανότητας δέσμευσης των ακινητοποιημένων αντισωμάτων.

6.10 Προσδιορισμός της βέλτιστης ταχύτητας ροής στην μικροροϊκή κυψελίδα

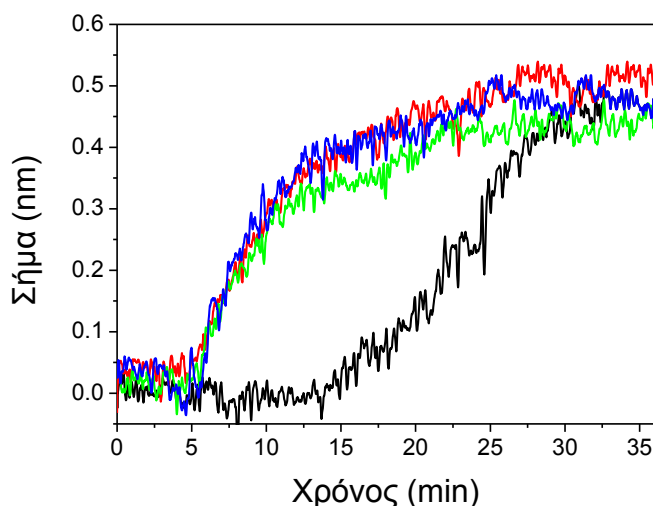
Η ταχύτητα ροής των αντιδραστηρίων μέσα από το μικροροϊκό κανάλι είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά το τελικό αναλυτικό σήμα. Χαμηλές ταχύτητες ροής επηρεάζουν αρνητικά την διάχυση και την προσέγγιση των αναλυτών προς το ακινητοποιημένο στην επιφάνεια αντίσωμα. Από την άλλη, υψηλές ταχύτητες μπορούν να οδηγήσουν σε αποκόλληση μέρους του αντισώματος από την επιφάνεια και δημιουργούν την ανάγκη για μεγάλες ποσότητες δείγματος και αντιδραστηρίων. Για την εύρεση της κατάλληλης ταχύτητας ροής δοκιμάστηκαν ταχύτητες από 10 έως 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Στο Σχήμα 55 παρουσιάζονται οι αποκρίσεις σε πραγματικό χρόνο που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 50 ng/mL χρησιμοποιώντας διαφορετικές ταχύτητες ροής κατά το στάδιο της αντίδρασης του δεσμευμένου στο ακινητοποιημένο αντίσωμα αναλύτη με το αντίσωμα ανίχνευσης. Όπως προκύπτει από το Σχήμα 55, το αναλυτικό σήμα δεν επηρεάζεται από την ταχύτητα της ροής για ταχύτητες ροής μεγαλύτερες ή ίσες με 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ καθώς οι καμπύλες απόκρισης είναι ίδιες. Αντίθετα, για ταχύτητες μικρότερες των 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ παρατηρείται καθυστέρηση στην έναρξη της

αντίδρασης καθώς και μειωμένη ταχύτητα κατά την εξέλιξη της, παρά το γεγονός ότι το τελικό σήμα είναι ίδιο.

Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της ταχύτητας ροής κατά το πρώτο στάδιο της αντίδρασης. Διατηρώντας σταθερή την ταχύτητα ροής και τον χρόνο διέλευσης του διαλύματος στο δεύτερο στάδιο της ανοσοαντίδρασης, μεταβλήθηκε η ταχύτητα ροής στο πρώτο στάδιο της ανοσοαντίδρασης για σταθερό χρόνο διέλευσης του διαλύματος (20 min). Και σε αυτή την περίπτωση βρέθηκε ότι για ταχύτητες ροής μεγαλύτερες ή ίσες με 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, τα σήματα που λαμβάνονταν ήταν ταυτόσημα. Η ίδια μελέτη πραγματοποιήθηκε και για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό των D-dimers με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα και τα αποτελέσματα συμφωνούσαν όσον αφορά την βέλτιστη ταχύτητα ροής με αυτά που ελήφθησαν για τον ανοσοπροσδιορισμό της CRP.

Έτσι, αποφασίστηκε να υιοθετηθεί η ταχύτητα των 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ ως ταχύτητα ροής των διαλυμάτων σε όλα τα στάδια της ανοσοαντίδρασης εφόσον με τη ταχύτητα αυτή επιτυγχάνεται η μέγιστη τιμή ειδικού σήματος και η ελάχιστη δυνατή κατανάλωση αντιδραστηρίων



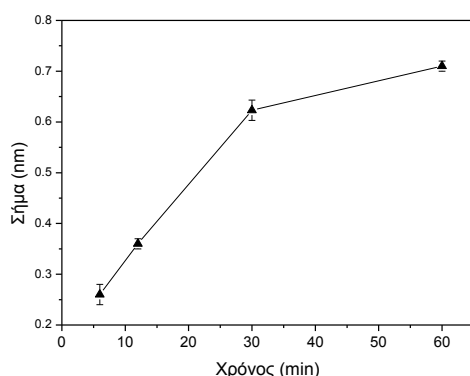
Σχήμα 55: Καταγραφή σε πραγματικό χρόνο του ειδικού αναλυτικού σήματος κατά την παροχέτευση διαλύματος αντισώματος κατά της CRP με διαφορετικές ταχύτητες ροής σε επιφάνεια τροποποιημένη με αντίσωμα κατά της CRP και αντίδραση με πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 50 ng/mL . Οι ταχύτητες ροής που παρουσιάζονται είναι: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ (μαύρη γραμμή), 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ (πράσινη γραμμή), 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, (μπλε γραμμή) και 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ (κόκκινη γραμμή).

6.11 Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου ροής του διαλύματος αναλύτη από την μικροροϊκή κυψελίδα

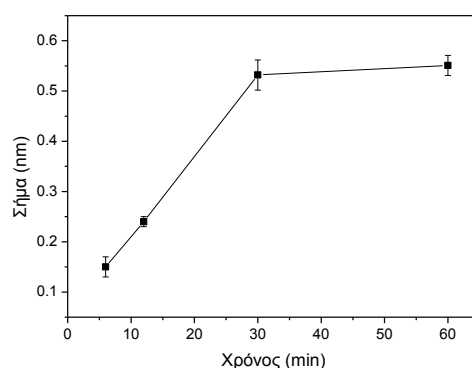
Μία άλλη παράμετρος που επηρεάζει το σήμα που λαμβάνεται με τον υπό μελέτη αισθητήρα είναι ο χρόνος ροής μέσα από την μικροροϊκή κυψελίδα των προτύπων διαλυμάτων της CRP και των D-dimers κατά το στάδιο της αντίδρασης με το ακινητοποιημένο στην επιφάνεια αντίσωμα. Στόχος είναι να καλυφθούν κατά το μέγιστο δυνατό ποσοστό οι θέσεις δέσμευσης του ακινητοποιημένου στην επιφάνεια αντισώματος ώστε να ληφθεί τελικά το μέγιστο σήμα κατά τα επόμενα στάδια της ανοσοανάλυσης.

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο βέλτιστος χρόνος αυτό το στάδιο της ανοσοανάλυσης και για τους δυο αναλύτες πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μελέτες. Στην πρώτη προσδιορίστηκε το ειδικό σήμα μετά τη διέλευση σταθερού όγκου δείγματος αλλά με διαφορετική ταχύτητα ροής που συνεπάγεται διαφορετικό χρόνο παραμονής του δείγματος στην κυψέλη. Στην δεύτερη περίπτωση, διατηρήθηκε σταθερή η ταχύτητα ροής και το πρότυπο διάλυμα παροχετεύτηκε για διαφορετικά χρονικά διαστήματα από την κυψελίδα. Και για τους δυο αναλύτες, καταγράφηκε σήμα κατά το δεύτερο στάδιο της ανοσοαντίδρασης δηλ., την αντίδραση με το αντίσωμα ανίχνευσης ενώ χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα CRP συγκέντρωσης 50 ng/mL και D-dimers 500 ng/mL.

Στο Σχήμα 56, παρουσιάζεται η μεταβολή του ειδικού σήματος που λαμβάνεται μετά από διέλευση προτύπου διαλύματος CRP και D-dimers, αντίστοιχα, συνολικού όγκου 600 μ l για χρόνους 6, 12, 30 και 60 min που αντιστοιχούν σε ταχύτητες ροής 100, 50, 20 και 10 μ l/min. Παρατηρούμε ότι μέγιστες τιμές λαμβάνονται για χρόνους αντίδρασης μεγαλύτερες ή ίσες με 30 min και ταχύτητες ροής ίσες ή μικρότερες από 20 μ l/mL. Επιπλέον για χρόνους μεγαλύτερους από 30 λεπτά, η αύξηση του αναλυτικού σήματος είναι σχετικά μικρή. Συγκεκριμένα όταν ο χρόνος διπλασιάζεται από 30 λεπτά σε 1 ώρα το αναλυτικό μας σήμα αυξάνεται μόνο κατά 15 % (0,09 nm) της αντίστοιχης τιμής στα 30 λεπτά.



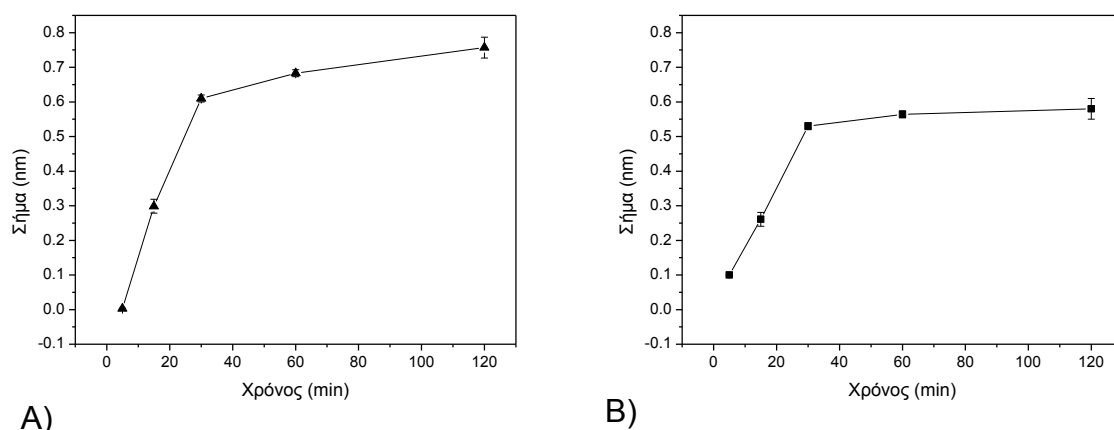
A)



B)

Σχήμα 56: Ειδικό αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται από επιφάνειες τροποποιημένες με ειδικό αντίσωμα κατά της CRP (A) και των D-dimers (B) για διέλευση σταθερού όγκου 600 μl προτύπου διαλύματος του αντίστοιχου αναλύτη με διαφορετικές ταχύτητες ροής. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων ήταν για CRP 50 ng/mL (A) και D-dimers 500 ng/mL (B). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Στο Σχήμα 57 παρουσιάζεται η μεταβολή του ειδικού σήματος μετά από διέλευση δείγματος CRP και D-dimers, αντίστοιχα, με σταθερή ταχύτητα ροής 20 μl/min για χρόνους 5, 15, 30, 60 και 120 min. Είναι φανερό ότι το ειδικό αναλυτικό σήμα εξαρτάται από τον χρόνο που το πρότυπο διάλυμα/δείγμα διαβιβάζεται από την κυψελίδα. Μέγιστες τιμές ελήφθησαν για χρόνο διέλευσης ίσο ή μεγαλύτερο από 30 λεπτά ενώ για χρόνους μεγαλύτερους των 30 λεπτών δεν επωφελούμαστε σημαντικά σε σήμα ώστε να δικαιολογείται η αύξηση του χρόνου αντίδρασης πέραν αυτού του χρόνου.



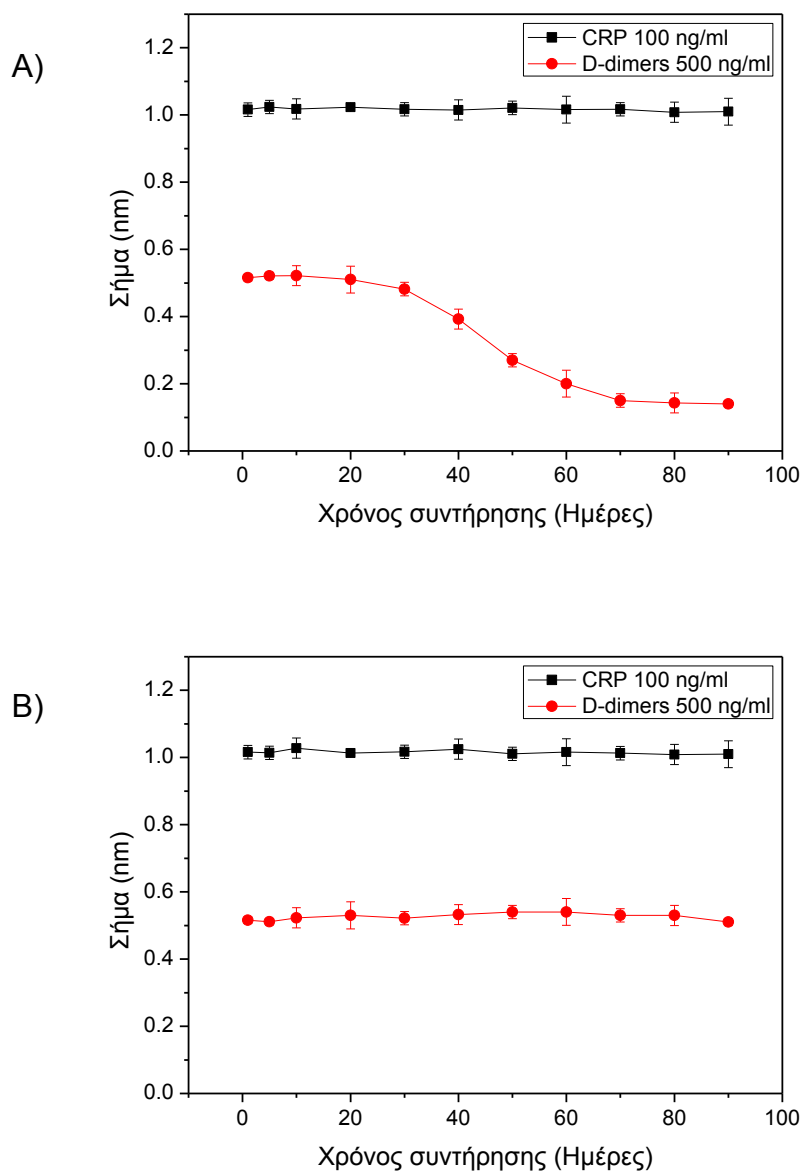
Σχήμα 57: Ειδικό αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται από επιφάνειες τροποποιημένες με ειδικό αντίσωμα κατά της CRP (A) και των D-dimers (B) για διέλευση προτύπου διαλύματος του αντίστοιχου αναλύτη με σταθερή ταχύτητα ροής 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ για διαφορετικούς χρόνους αντίδρασης. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων ήταν για CRP 50 ng/mL (A) και D-dimers 500 ng/mL (B). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm \text{SD}$.

Με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν διαπιστώνεται ότι καθοριστικός παράγοντας για το τελικό αναλυτικό σήμα αποτελεί ο χρόνος που το δείγμα διατρέχει την μικροροϊκή κυψελίδα για συγκεκριμένη ταχύτητα ροής. Προκειμένου να λαμβάνουμε και για τους δυο αναλύτες ικανοποιητικά ειδικά σήματα καθώς επίσης και για να διατηρηθούν οι όγκοι των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται και ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της αντίδρασης στα κατώτερα δυνατά επίπεδα αποφασίστηκε να υιοθετηθεί ο χρόνος των 30 λεπτών για το στάδιο της διαβίβασης των προτύπων διαλυμάτων/δειγμάτων από την μικροροϊκή κυψελίδα.

6.12 Μελέτη σταθερότητας προτύπων διαλυμάτων

Μία ακόμη παράμετρος που μελετήθηκε στα πλαίσια της ανάπτυξης των ανοσοπροσδιορισμών των CRP και D-dimers με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα ήταν η σταθερότητα των προτύπων διαλυμάτων. Για τη μελέτη αυτή, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των δύο αναλυτών σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM , pH 7,4, που περιείχε 1% (β/ο) BSA και φυλάχθηκαν στους 4 $^{\circ}\text{C}$ και στους -20 $^{\circ}\text{C}$. Στο Σχήμα 58 παρουσιάζονται τα

σήματα που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα CRP 100 ng/mL και D-dimers 500 ng/mL συναρτήσει του χρόνου φύλαξης στους 4 °C και στους -20°C.



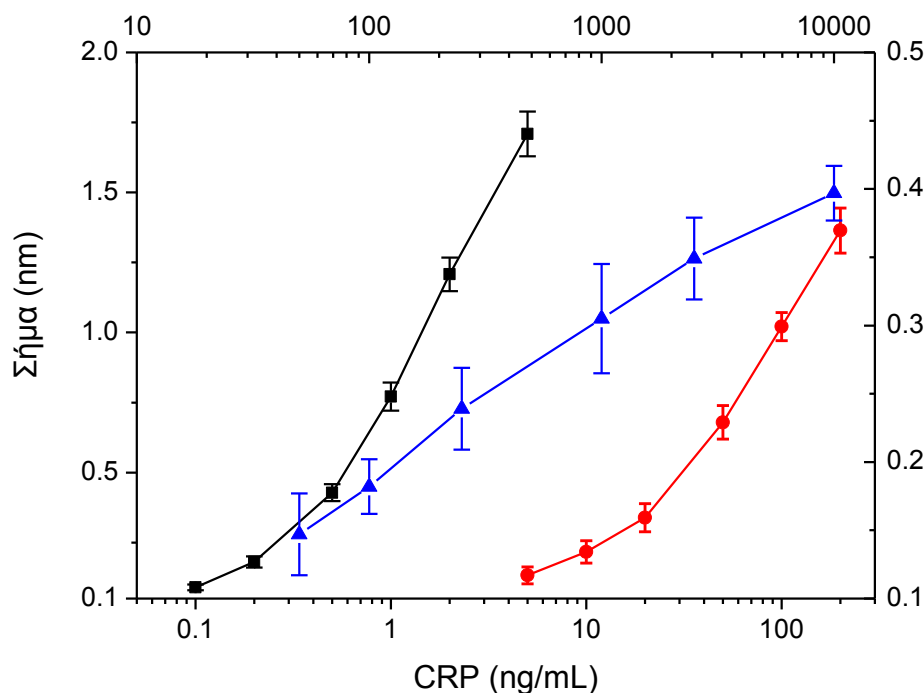
Σχήμα 58: Τιμές ειδικού σήματος σε σχέση με τον χρόνο συντήρησης στους A) 4 °C και στους B) -20°C των πρότυπων δειγμάτων που ελήφθησαν για συγκεντρώσεις CRP 100 ng/mL και D-dimers 500 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Όπως προκύπτει από το σχήμα τα πρότυπα διαλύματα της CRP είναι σταθερά και στις δύο συνθήκες φύλαξης. Αντίθετα τα διαλύματα των D-dimers παρέμειναν σταθερά στο διάστημα των τριών μηνών που μελετήθηκε μόνο όταν φυλάσσονταν στους -20°C.

6.13 Καμπύλες προτύπων και αναλυτικά χαρακτηριστικά των ανοσοπροσδιορισμών της CRP και των D-dimers

6.13.1 Καμπύλες προτύπων CRP

Αντιπροσωπευτικές καμπύλες προτύπων που ελήφθησαν με τις βέλτιστες συνθήκες ανάλυσης για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της CRP παρουσιάζονται στο Σχήμα 59. Οι καμπύλες που παρουσιάζονται κατασκευάστηκαν λαμβάνοντας υπόψη τις αποκρίσεις που ελήφθησαν από την ίδια αισθητήρια επιφάνεια σε τρία διαφορετικά στάδια του ανοσοχημικού προσδιορισμού. Συγκεκριμένα παρουσιάζονται οι καμπύλες που αντιστοιχούν: α) στην αντίδραση της CRP που περιέχεται στα πρότυπα διαλύματα με το ακινητοποιημένο στην αισθητήρια επιφάνεια αντίσωμα δέσμησης (τρίγωνο, μπλε καμπύλη), β) στην αντίδραση του αντισώματος ανίχνευσης με τα ακινητοποιημένα στο αντίσωμα δέσμησης μόρια της CRP (κύκλοι, κόκκινη καμπύλη), και γ) αντίδραση στρεπταβιδίνης με βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο β (τετράγωνα, μαύρη καμπύλη). Από τις τρεις καμπύλες προτύπων είναι προφανές ότι η εισαγωγή επιπλέον σταδίων και ιδιαίτερα η εισαγωγή του σταδίου αντίδρασης της στρεπταβιδίνης με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση της δυναμικής περιοχής της καμπύλης προς περιοχές χαμηλότερων συγκεντρώσεων. Παρότι είναι δυνατός ο προσδιορισμός της CRP κατά το στάδιο της αντίδρασης με το ακινητοποιημένο αντίσωμα σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,1 έως 10 µg/mL, οι προσδιορισμοί χαρακτηρίζονται από σχετικά μεγάλη διακύμανση (>15%) επηρεάζοντας αρνητικά την ακρίβεια του προσδιορισμού του αναλύτη σε πραγματικά δείγματα. Αντιθέτως, η εισαγωγή ενός ή δύο επιπλέον σταδίων ανάλυσης βελτιώνει σημαντικά την ενδο-αναλυτική επαναληψιμότητα και επομένως την ακρίβεια των προσδιορισμών.



Σχήμα 59: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες προτύπων CRP που ελήφθησαν με τον αναπτυχθέντα βιοαισθητήρα κατά: α) την απευθείας αντίδραση της CRP με το ακινητοποιημένο αντίσωμα (-▲-), β) την αντίδραση της δεσμευμένης στο αντίσωμα δέσμευσης CRP με το αντίσωμα ανίχνευσης (-●-) και, γ) την αντίδραση στρεπταβιδίνης με βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης (-■-). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αντιστοιχούν στον κάτω χ άξονα και στον αριστερό y άξονα ενώ η μπλε καμπύλη αντιστοιχεί στον πάνω χ άξονα και στον δεξί y άξονα.

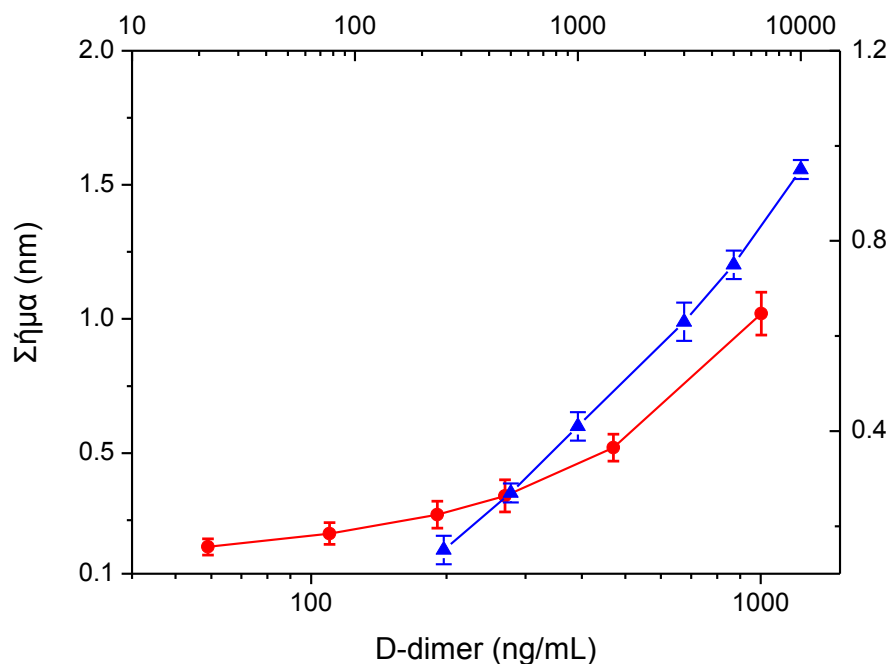
Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των τριών καμπυλών προτύπων που παρουσιάζονται στο Σχήμα 59.

Πίνακας 5: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοχημικού προσδιορισμού της CRP με τον αισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (WLRS)

Αναλυτικά χαρακτηριστικά	Ανίχνευση κατά την αντίδραση της CRP με το ακινητοποιημένο αντίσωμα	Ανίχνευση μετά από αντίδραση με αντίσωμα ανίχνευσης	Ανίχνευση μετά από αντίδραση με βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης και στρεπταβιδίνη
Όριο ανίχνευσης (ng/mL)	50	2,0	0,05
Δυναμικό Εύρος (ng/mL)	100-10000	5,0-250	0,1-5,0
Ενδοαναλυτική επαναληψιμότητα (%CV)	5-22	6-14	4-10
Χρόνος ανάλυσης (min)	30	35	40

6.13.2 Καμπύλες προσδιορισμού των D-dimers

Αντιπροσωπευτικές καμπύλες προτύπων που ελήφθησαν με τις βέλτιστες συνθήκες ανάλυσης για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό των D-dimers παρουσιάζονται στο Σχήμα 60. Με τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν δυνατόν ο απευθείας προσδιορισμός των D-dimers κατά την αντίδραση των προτύπων διαλυμάτων με το ακινητοποιημένο αντίσωμα δέσμησης. Οι καμπύλες που παρουσιάζονται κατασκευάστηκαν λαμβάνοντας υπόψη τις αποκρίσεις που ελήφθησαν από την ίδια αισθητήρια επιφάνεια κατά: α) την αντίδραση του αντισώματος ανίχνευσης με τα ακινητοποιημένα στο αντίσωμα δέσμησης μόρια των D-dimers (τρίγωνα, μπλε καμπύλη), και β) αντίδραση στρεπταβιδίνης με βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο α (κύκλοι, κόκκινη καμπύλη). Από τις καμπύλες προτύπων είναι προφανές ότι η εισαγωγή του σταδίου αντίδρασης της στρεπταβιδίνης με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση της δυναμικής περιοχής της καμπύλης προς περιοχές χαμηλότερων συγκεντρώσεων. Επιπλέον, η εισαγωγή αυτού του σταδίου βελτιώνει σημαντικά την ενδο-αναλυτική επαναληψιμότητα και επομένως την ακρίβεια των προσδιορισμών.



Σχήμα 60: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες προτύπων D-dimers που ελήφθησαν με τον αναπτυχθέντα βιοαισθητήρα κατά: α) την αντίδραση των ακινητοποιημένων στο αντίσωμα δέσμευσης μορίων D-dimers με το αντίσωμα ανίχνευσης (-▲-), και β) την αντίδραση στρεπταβιδίνης με βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης (-●-). Η κόκκινη καμπύλη αντιστοιχεί στον κάτω χ άξονα και στον αριστερό γ άξονα ενώ η μπλε καμπύλη αντιστοιχεί στον πάνω χ άξονα και στον δεξί γ άξονα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των δύο καμπυλών προτύπων που παρουσιάζονται στο Σχήμα 60.

Πίνακας 6: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοχημικού προσδιορισμού των D-dimers με τον αισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (WLRs)

Αναλυτικά χαρακτηριστικά	Απευθείας ανίχνευση D-dimers	Ανίχνευση D-dimers με αντίσωμα ανίχνευσης	Ανίχνευση D-dimers με βοήθεια στρεπταβιδίνης
Όριο ανίχνευσης (ng/mL)	-	200	25
Δυναμικό Εύρος (ng/mL)	-	250-10000	50-1000
Ενδοαναλυτική επαναληψιμότητα (%CV)		7-20	3-14
Χρόνος ανάλυσης (min)	-	35	40

6.14 Επιδράσεις του ορού στην μέτρηση και το αναλυτικό σήμα

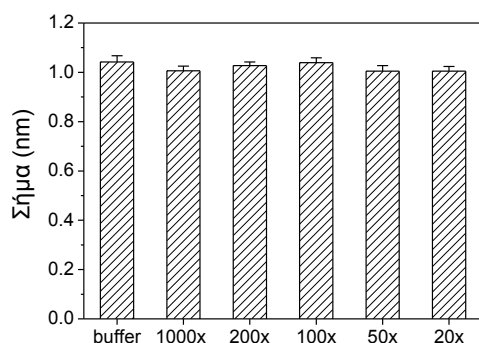
Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ανίχνευση των βιομορίων με την παρούσα διάταξη βασίζεται στην παρακολούθηση της μεταβολής του φάσματος συμβολής που προκαλούνται από τις αλλαγές στον δείκτη διάθλασης της βιοστοιβάδας που δημιουργείται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Δεδομένου ότι η προσπίπτουσα δέσμη φωτός διέρχεται μέσα από την μικροροϊκή κυψελίδα όπου παροχετεύεται με σταθερή ροή το δείγμα ήταν πιθανό η εναλλαγή μεταξύ δειγμάτων ή/και διαλυμάτων διαφορετικού δείκτη διάθλασης να επηρεάζει τη μέτρηση. Προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση του ορού στη μέτρηση, έγιναν κατάλληλες αραιώσεις σε δείγματα γνωστής συγκέντρωσης σε ορό ώστε η τελική συγκέντρωση τους σε CRP να είναι περίπου 100 ng/mL. Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν 20, 50, 100, 200 και 1000 φορές του ορού με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης. Επίσης ελήφθησαν καμπύλες με πρότυπα που φτιάχτηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιείχε 1% (β/ο) BSA, καθώς και με ορό 50 φορές αραιωμένο και συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 61.

Όπως προκύπτει από το Σχήμα 61A, οι αποκρίσεις που ελήφθησαν για τις αραιώσεις ορού που μελετήθηκαν (20-1000 φορές) δεν διέφεραν στατιστικά

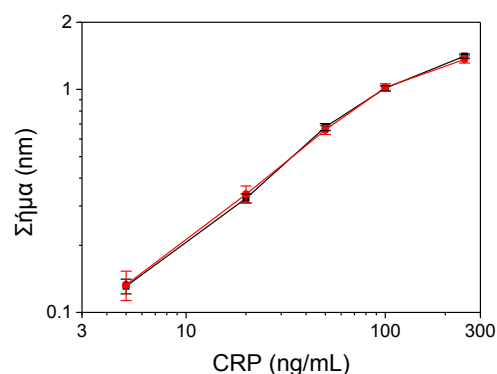
μεταξύ τους. Αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό αποτέλεσμα γιατί καθιστά τη μέτρηση ανεξάρτητη της αραίωσης του ορού που επιλέγεται και επιτρέπει τη μέτρηση δειγμάτων με πολύ διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το τελευταίο χαρακτηριστικό είναι πολύ σημαντικό ιδιαίτερα για τον προσδιορισμό της CRP της οποίας οι τιμές μπορεί να κυμαίνονται από μικρότερες του 1 $\mu\text{g/mL}$ έως μερικές εκατοντάδες $\mu\text{g/mL}$.

Επίσης από το Σχήμα 61B προκύπτει ότι η καμπύλη που λαμβάνεται για πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών είναι πανομοιότυπη με εκείνη που ελήφθη από πρότυπα που παρασκευαστήκαν σε ορό ο οποίος αραιώθηκε στην συνέχεια 50 φορές. Με βάση αυτό το αποτέλεσμα προκύπτει ότι τα πρότυπα διαλύματα μπορούν να παρασκευάζονται είτε σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης είτε σε ορό καθώς οι μετρήσεις με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα δεν επηρεάζεται από την μήτρα του δείγματος.

A)



B)



Σχήμα 61: A) Τιμές ειδικού σήματος που ελήφθησαν από διαλύματα CRP συγκέντρωσης 100 ng/mL που παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (buffer) ή προέκυψαν από κατάλληλες αραιώσεις προτύπων σε ορό. B) Καμπύλες προτύπων CRP που παρασκευαστήκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (μαύρη γραμμή) ή σε ορό ο οποίος αραιώθηκε στην συνέχεια 50 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (κόκκινη γραμμή). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

6.15 Έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου

Η ακρίβεια της μεθόδου αξιολογήθηκε μέσω πειραμάτων ανάκτησης. Για τον σκοπό αυτό σε δείγματα ορού από ανώνυμους δότες προστέθηκαν γνωστές συγκεντρώσεις CRP και D-dimers. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης των δύο αναλυτών στα δείγματα τόσο πριν την προσθήκη αλλά και μετά από τις προσθήκες των γνωστών συγκεντρώσεων CRP και D-dimers. Στην συνέχεια υπολογίστηκε η επί της εκατό ανάκτηση ως ο λόγος της ποσότητας που προσδιορίστηκε ότι προστέθηκε στο κάθε δείγμα προς την πραγματική ποσότητα που προστέθηκε σε αυτό. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα δοκιμασιών ανάκτησης για την CRP και τα D-dimers

Αριθμός Δείγματος	Αρχική Ποσότητα (μg/mL)	Προσθεθείσα Ποσότητα (μg/mL)	Αναμενόμενη Ποσότητα (μg/mL)	Προσδιορισθείσα Ποσότητα (μg/mL)	A (%)
CRP					
1	22,1	0	22,1	22,1	-
	22,1	25	47,1	48,4	105
	22,1	50	72,1	71,1	98
2	44,9	0	44,9	44,9	-
	44,9	25	69,9	67,6	90,8
	44,9	50	94,9	95,1	101
3	12,6	0	12,6	12,6	-
	12,6	10	22,6	21,8	92
	12,6	20	32,6	33,9	107

D-dimers					
1	1.93	0	1.93	1.93	-
	1.93	2	3.93	4.06	106
	1.93	4	5.93	5.88	98.7
2	2.33	0	2.33	2.33	-
	2.33	2	4.33	4.17	92.0
	2.33	4	6.33	6.45	103
3	1.24	0	1.24	1.24	-
	1.24	1	2.24	2.36	112
	1.24	2	3.24	3.07	91.5

Όπως προκύπτει από τα δεδομένα του πίνακα, οι τιμές ανάκτησης τόσο για CRP (90,8-107%) όσο και για τα D-dimers (91,5-112%) σε όλα τα δείγματα που δοκιμάστηκαν κυμαινόταν εντός των αποδεκτών ορίων 80 έως 120%, καταδεικνύοντας την ακρίβεια των προσδιορισμών.

6.16 Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων και συσχέτιση με εμπορικά διαθέσιμο σύστημα προσδιορισμού

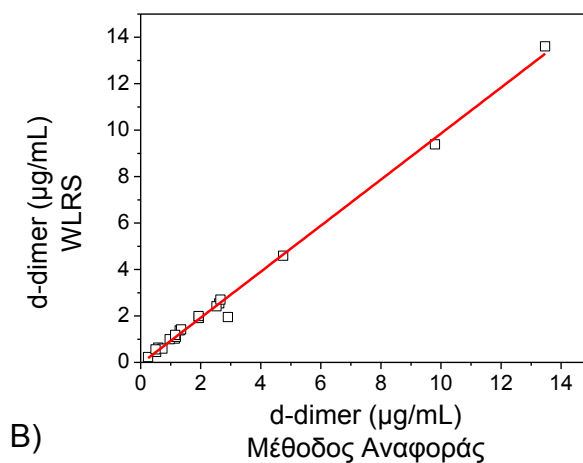
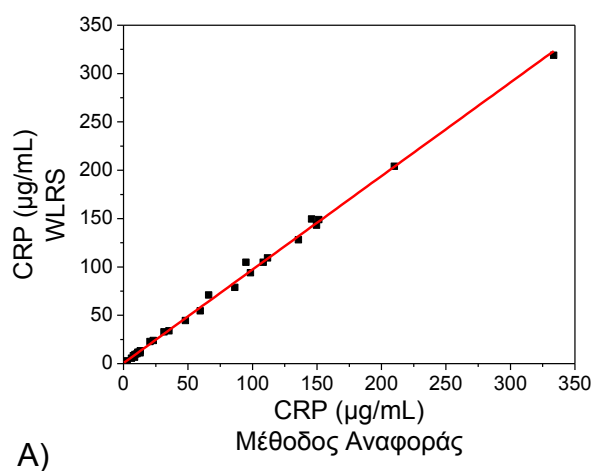
Χρησιμοποιώντας το αναπτυχθέν σύστημα για τον προσδιορισμό της CRP και των D-dimers προσδιορίστηκαν σε 35 δείγματα ορού τα επίπεδα της CRP και σε 20 δείγματα πλάσματος τα επίπεδα των D-dimers. Τα δείγματα ελήφθησαν από ανώνυμους δότες και αναλύθηκαν από τα Διαγνωστικά Εργαστήρια του Νοσοκομείου «ΕΡΡΙΚΟΣ ΝΤΥΝΑΝ» με τα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα νεφελομετρίας Siemens Dimension® (CRP) και Siemens Innovance® (D-dimer). Στον πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την μέτρηση των δειγμάτων. Επίσης, στο Σχήμα 62 παρουσιάζεται η συσχέτιση των τιμών των συγκεντρώσεων CRP και D-dimers οι οποίες προσδιορίστηκαν για τα άγνωστα δείγματα με τον αναπτυχθέντα ανοσοαισθητήρα και με τις μεθόδους αναφοράς που εφαρμόστηκαν από τα Διαγνωστικά Εργαστήρια του Νοσοκομείου.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά την μέτρηση της CRP και των D-dimers με την μέθοδο αναφοράς (νεφελομετρία) και με την αναπτυχθείσα μέθοδο WLRS

Αριθμός Δείγματος	CRP (μg/mL) Μέθοδος Αναφοράς	CRP (μg/mL) WLRS	Αριθμός Δείγματος	D-dimers (μg/mL) Μέθοδος Αναφοράς	D-dimers (μg/mL) WLRS
C1	11,2	11,7	D1	1.3	1.38
C2	98,4	94,0	D2	0.59	0.63
C3	10,5	10,3	D3	2.62	2.54
C4	12,9	11,1	D4	13.47	13.61
C5	13,1	13,2	D5	1.14	1.02
C6	8,6	6,7	D6	0.52	0.45
C7	12,2	11,7	D7	1.35	1.42
C8	145,8	149,6	D8	0.97	1
C9	108,3	104,8	D9	2.53	2.41
C10	135,7	128,1	D10	0.73	0.59
C11	59,6	54,6	D11	1.94	1.91
C12	6,2	5,6	D12	1.17	1.1
C13	149,7	143,2	D13	2.66	2.7
C14	86,4	78,9	D14	9.8	9.39
C15	35,2	33,8	D15	1.93	1.99
C16	66,1	71,0	D16	1.15	1.18
C17	8,9	9,3	D17	4.75	4.59
C18	48,1	44,6	D18	0.25	0.23
C19	23,2	23,8	D19	0.5	0.56
C20	95,0	104,8	D20	2.91	1.95
C21	111,7	109,3			
C22	2,5	1,7			
C23	20,6	22,7			
C24	2,9	2,6			

Αριθμός Δείγματος	CRP (μg/mL) Μέθοδος Αναφοράς	CRP (μg/mL) WLRS	Αριθμός Δείγματος	D-dimers (μg/mL) Μέθοδος Αναφοράς	D-dimers (μg/mL) WLRS
C25	1,8	1,1			
C26	1,3	0,9			
C27	0,5	0,46			
C28	1,1	0,8			
C29	1,3	1,3			
C30	210	204			
C31	33,5	31,9			
C32	2,4	2,6			
C33	151,4	148,8			
C34	7,6	8,1			
C35	31,4	32,9			

Με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα κατασκευαστήκαν οι καμπύλες συσχέτισης των τιμών που ελήφθησαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο σε σχέση με την μέθοδο αναφοράς (Σχήμα 60).



Σχήμα 62: Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της CRP (A) και D-dimer (B) που προσδιορίστηκαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο (WLRS) και με τα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα νεφελομετρίας Siemens Dimension® (CRP) και Siemens Innovance® (D-Dimer). Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις ευθείες παλινδρόμησης (κόκκινο χρώμα).

Οι εξισώσεις των ευθειών παλινδρόμησης που ελήφθησαν ήταν:

$$\text{CRP: } y = 0,967(\pm 0,007)x + 0,485(\pm 0,723), \quad R^2=0,997$$

$$\text{D-dimer: } y = 0,991(\pm 0,017)x - 0,06(\pm 0,07) \quad R^2= 0,994$$

Όπως προκύπτει από τις τιμές των συντελεστών συσχέτισης (R^2) και τις εξισώσεις των ευθειών παλινδρόμησης υπήρχε πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ των τιμών που προσδιορίστηκαν με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα και τις μεθόδους αναφοράς.

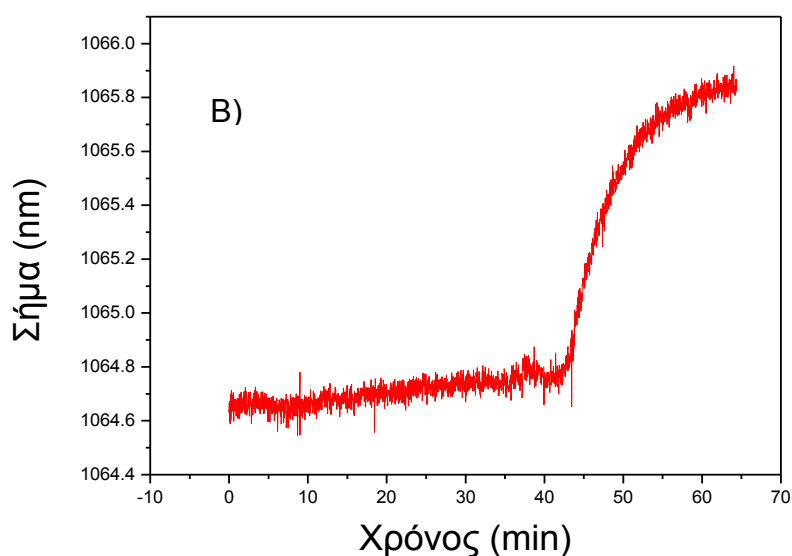
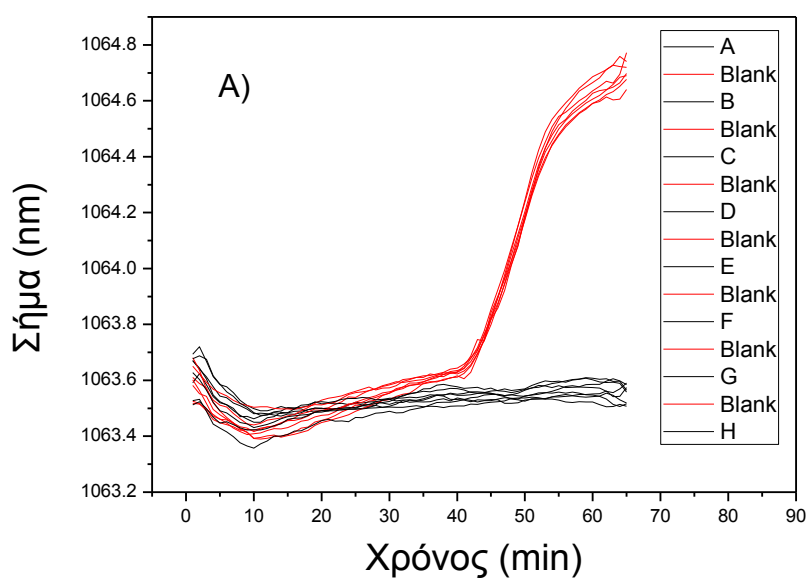
6.17 Ταυτόχρονος προσδιορισμός CRP και D-dimers με φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός

6.17.1 Κατασκευή μικροσυστοιχιών για ανίχνευση της CRP και αξιολόγηση της επαναληψιμότητας της μέτρησης

Στα πλαίσια της ανάπτυξης της προτεινόμενης διάταξης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της CRP και των D-dimers πραγματοποιήθηκε η κατασκευή μικροσυστοιχιών αντισωμάτων στην αισθητήρια επιφάνεια και καταγραφή του σήματος από την κάθε βιοδραστική περιοχή με χρήση κατάλληλου λογισμικού και κινούμενης τράπεζας υψηλής ακρίβειας.

Αρχικά ελέγχθηκε η δυνατότητα μέτρησης στις διαφορετικές θέσεις πάνω στην ίδια επιφάνεια καθώς και η επαναληψιμότητα του σήματος που λαμβάνεται από τις διαφορετικές βιοδραστικές ζώνες. Για το σκοπό αυτό, με την χρήση αυτόματης συσκευής εναπόθεσης κηλίδων, κατασκευάστηκε μια μικροσυστοιχία αποτελούμενη από επτά ζώνες διάστασης $1 \times 5 \text{ mm}^2$ πολυκλωνικού αντισώματος αιγός έναντι της CRP. Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε κινούμενη τράπεζας X-Y η οποία προγραμματίστηκε ώστε να ακολουθεί συγκεκριμένο επαναλαμβανόμενο πρωτόκολλο 15 βημάτων με απόσταση 1 mm . Η κίνηση της τράπεζας συντονίζονταν από το πρόγραμμα λήψης μετρήσεων ώστε σε κάθε θέση να λαμβάνεται μία μέτρηση. Με αυτό τον τρόπο ήταν δυνατή η σάρωση της επιφάνειας και η λήψη μετρήσεων κατά μήκος του μεγάλου άξονα του μικρορευστομηχανικής κυψελίδας από περιοχές

της επιφάνειας στην οποία είχε ακινητοποιηθεί αντίσωμα κατά της CRP αλλά και από περιοχές μεταξύ των ζωνών του αντισώματος. Στο Σχήμα 63A παρουσιάζονται οι αποκρίσεις που λαμβάνονται σε πραγματικό χρόνο κατά την σάρωση μιας αισθητήριας επιφάνειας που φέρει 7 ζώνες με αντίσωμα κατά της CRP και οι οποίες αντιστοιχούν τόσο σε περιοχές που έχει ακινητοποιηθεί αντίσωμα αλλά και σε περιοχές μεταξύ των ζωνών. Στο Σχήμα 63B παρέχεται για συγκριτικούς λόγους η απόκριση που λαμβάνεται από μια βιοδραστική ζώνη χωρίς τη χρήση της κινούμενης τράπεζας (μέτρηση σταθερού σημείου).



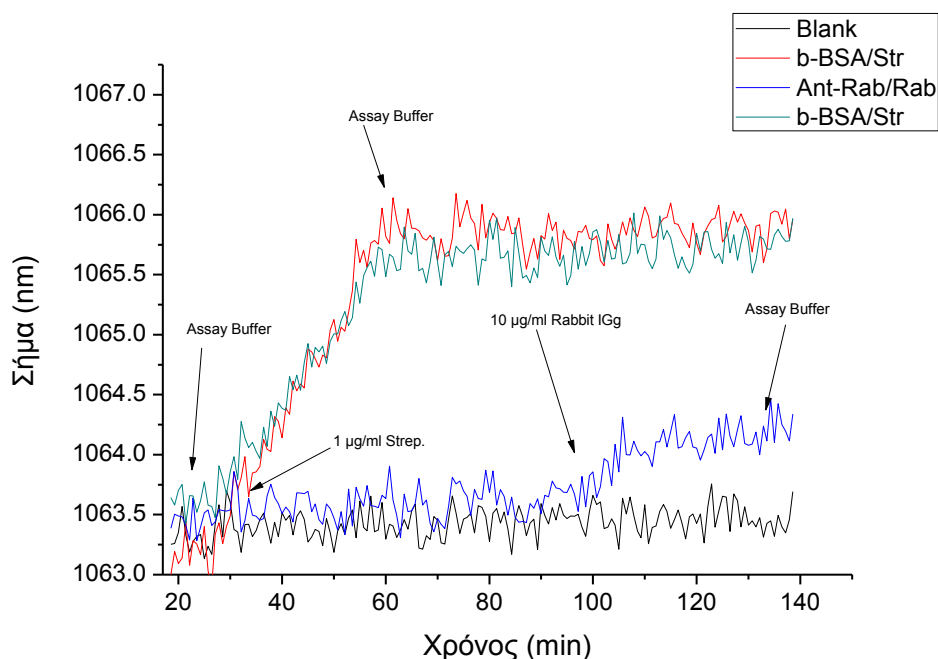
Σχήμα 63: Α) Αποκρίσεις που ελήφθησαν κατά τη σάρωση μιας επιφάνειας που έφερε 7 ζώνες αντισώματος κατά της CRP κατά την αντίδραση με πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 250 ng/mL. Οι μαύρες καμπύλες αντιστοιχούν σε σημεία εκτός των ζωνών (blank = μη ειδική δέσμευση), ενώ οι κόκκινες καμπύλες σε σημεία εντός καθεμιάς από τις 7 βιοδραστικές ζώνες. Β) Απόκριση που ελήφθη με μέτρηση σταθερού σημείου από αισθητήρια επιφάνεια που έφερε μια ζώνη αντισώματος κατά της CRP κατά την αντίδραση με πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 250 ng/mL.

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 63Α υπάρχει εξαιρετική επαναληψιμότητα μεταξύ των αποκρίσεων που λαμβάνονται από τις 7 διαφορετικές ζώνες αντισώματος. Συγκεκριμένα η διακύμανση των μετρήσεων που ελήφθησαν από τις 7 βιοδραστικές ζώνες ήταν μικρότερη από 5% και επιπλέον η μέση τιμή ήταν στατιστικά ίδια με τη τιμή που ελήφθη από επιφάνεια που έφερε μια βιοδραστική ζώνη και η μέτρηση πραγματοποιήθηκε χωρίς τη κινούμενη τράπεζα (μέτρηση σταθερού σημείου). Επίσης, παρατηρείται ότι για τις μετρήσεις σε περιοχές μεταξύ των βιοδραστικών ζωνών δεν λαμβάνεται καμία μεταβολή του σήματος καταδεικνύοντας την απουσία μη ειδικής δέσμευσης (blank). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η αναπτυχθείσα διάταξη ανοσοαισθητήρα παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού περισσότερου του ενός ουσιών στο ίδιο δείγμα μέσω της δημιουργίας μικροσυστοιχιών των αντίστοιχων ειδικών αντισωμάτων στην ίδια αισθητήρια επιφάνεια.

6.17.2 Κατασκευή μικροσυστοιχιών για ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών βιομορίων

Στο προηγούμενο υποκεφάλαιο περιγράφηκε η κατασκευή μικροσυστοιχιών με το ίδιο αντίσωμα για τον έλεγχο της δυνατότητας πολλαπλών μετρήσεων πάνω στην ίδια βιοδραστική επιφάνεια άλλα και της επαναληψιμότητας αυτών των μετρήσεων. Στο παρόν υποκεφάλαιο θα μελετηθεί η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης δυο διαφορετικών ουσιών στο ίδιο δείγμα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δυο δεσμευτικές αναλύσεις-μοντέλα, δηλαδή η αντίδραση μεταξύ βιοτινυλιωμένης BSA και στρεπταβιδίνης και η αντίδραση των αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού με γ-σφαιρίνες κουνελιού. Για τον σκοπό αυτό, σε μια αισθητήρια επιφάνεια δημιουργήθηκαν τρεις

βιοδραστικές ζώνες, δυο με βιοτινυλιωμένη BSA και άλλη μια με αντίσωμα έναντι των γ-σφαιρινών κουνελιού. Στην συνέχεια, από την επιφάνεια διαβιβάστηκαν διαδοχικά διαλύματα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/mL}$ και γ-σφαιρινών κουνελιού 10 $\mu\text{g/mL}$. Στο Σχήμα 64 παρουσιάζεται η απόκριση που ελήφθη κατά τη διάρκεια του πειράματος από 4 θέσεις πάνω στην βιοδραστική επιφάνεια, δύο από τις ζώνες της βιοτινυλιωμένης BSA, μια από την ζώνη του αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού, και μια από την περιοχή μεταξύ των ζωνών για τη καταγραφή του σήματος μη ειδικής δέσμευσης (blank). Όπως παρατηρούμε όταν από την μικροροϊκή κυψελίδα διέρχεται το διάλυμα της στρεπταβιδίνης λαμβάνεται σήμα μόνο από τις περιοχές εκείνες που έχει ακινητοποιηθεί η βιοτινυλιωμένη BSA στην οποία και προσδένεται ειδικά η στρεπταβιδίνη. Επίσης παρατηρούμε ότι μεταξύ των δυο όμοιων ζωνών βιοτινυλιωμένης BSA που αντιδρούν με τη στρεπταβιδίνη το ειδικό σήμα είναι το ίδιο. Στην συνέχεια όταν από την μικροροϊκή κυψελίδα διαβιβάζεται το διάλυμα των γ-σφαιρινών κουνελιού παρατηρούμε ότι λαμβάνεται σήμα μόνο από την περιοχή που αντιστοιχεί στο ακινητοποιημένο αντίσωμα έναντι αυτών και δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στην απόκριση από τις άλλες δυο ζώνες. Τέλος, από την περιοχή στην οποία δεν έχει ακινητοποιηθεί κάποιο ειδικό μόριο (blank) δεν λαμβάνεται κάποια απόκριση για όλη την διάρκεια του πειράματος. Το αποτέλεσμα αυτό καταδεικνύει την δυνατότητα μέτρησης διαφορετικών ουσιών στην ίδια βιοδραστική επιφάνεια.



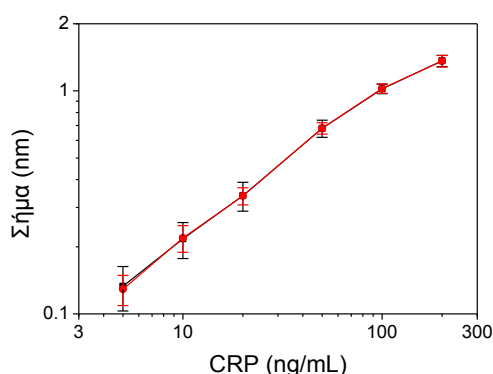
Σχήμα 64: Αποκρίσεις που ελήφθησαν κατά τη σάρωση μιας επιφάνειας που έφερε 3 βιοδραστικές ζώνες, 2 ζώνες βιοτινυλιωμένης BSA και μια ζώνη αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού. Οι καμπύλες κόκκινου και πράσινου χρώματος αντιστοιχούν στις αποκρίσεις από τις ζώνες βιοτινυλιωμένης BSA κατά την αντίδραση με διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 1 µg/mL ενώ η καμπύλη μπλε χρώματος σε απόκριση από τη ζώνη του αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού κατά την αντίδραση με διάλυμα γ-σφαιρινών κουνελιού συγκέντρωσης 10 µg/mL. Η μαύρη καμπύλη αντιστοιχεί στην απόκριση από σημείο της επιφάνειας που δεν έχει ακινητοποιηθεί κάποιο βιομόριο (blank).

6.17.3 Ταυτόχρονη ανίχνευση CRP και D-dimers σε μικροσυστοιχίες με την χρήση του βιοαισθητήρα φασματοσκοπίας ανίχνευσης λευκού φωτός

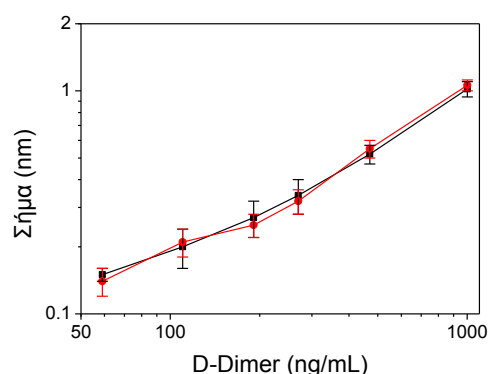
Χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συνθήκες που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη ανίχνευση των δύο αναλυτών, CRP και D-dimers, σε δείγματα πλάσματος που ελήφθησαν από ανώνυμους δότες. Για τον σκοπό αυτό, σε αισθητήρια επιφάνεια κατασκευάστηκαν μικροσυστοιχίες πολυκλωνικών αντισωμάτων αιγός έναντι της CRP και των D-dimers. Στην συνέχεια, από την μικροροϊκή κυψελίδα διαβιβάστηκαν πρότυπα δείγματα τα οποία περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των δύο αναλυτών. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις

πολλαπλών θέσεων πάνω στην ίδια βιοδραστική για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των δύο αναλυτών αλλά και μετρήσεις σταθερής θέσης για τον προσδιορισμό κάθε ουσίας ξεχωριστά. Στο Σχήμα 65 παρέχονται οι καμπύλες προτύπων που ελήφθησαν όταν οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη διάταξη πολλαπλών θέσεων ή με μέτρηση σε σταθερό σημείο. Όπως προκύπτει από το σχήμα δεν υπάρχει διαφορά στις καμπύλες προτύπων που λαμβάνονται όταν η μέτρηση πραγματοποιείται ταυτόχρονα με τη διάταξη πολλαπλών θέσεων ή όταν η μέτρηση γίνεται σε σταθερό σημείο. Αυτό το αποτέλεσμα είναι ιδιαίτερα σημαντικό γιατί δείχνει ότι οι μετρήσεις με τη διάταξη πολλαπλών θέσεων είναι ταυτόσημες με αυτές που λαμβάνονται με τη διάταξη σταθερής θέσης.

A)



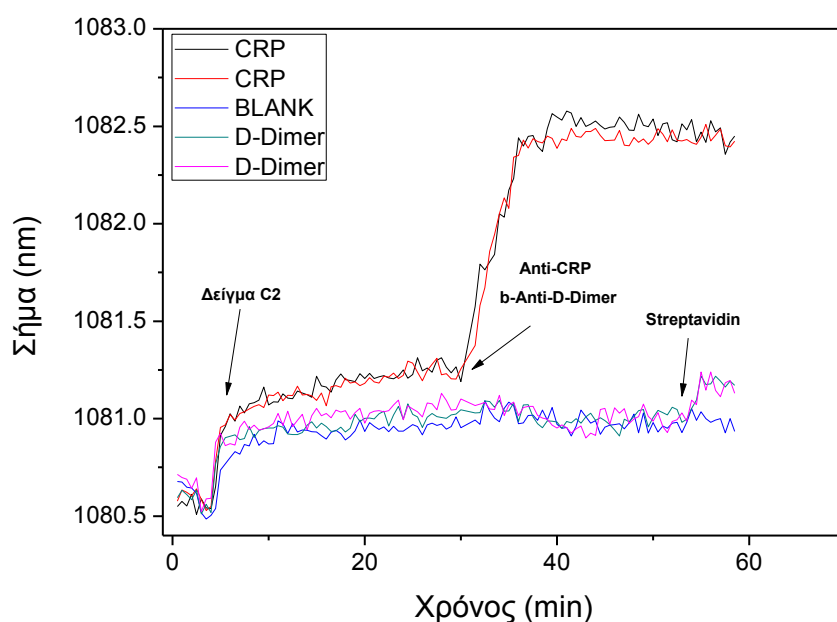
B)



Σχήμα 65: Καμπύλες προτύπων CRP (A) και D-dimers (B) που ελήφθησαν είτε με μετρήσεις σταθερού σημείου (μαύρη γραμμή) είτε για ταυτόχρονη ανίχνευση των δύο αναλυτών στην ίδια βιοδραστική επιφάνεια (κόκκινη γραμμή). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Στη συνέχεια σε 10 δείγματα πλάσματος από ανώνυμους δότες στα οποία είχαν προηγουμένως προσδιοριστεί οι συγκεντρώσεις CRP και D-dimers με συστήματα νεφελομετρίας από τα Διαγνωστικά Εργαστήρια του Νοσοκομείου «ΕΡΡΙΚΟΣ ΝΤΥΝΑΝ» έγινε ταυτόχρονος προσδιορισμός των δύο αναλυτών με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα. Στο Σχήμα 66 παρουσιάζεται η απόκριση της αναπτυχθείσας διάταξης κατά την μέτρηση ενός δείγματος (C2). Από το σχήμα προκύπτει ότι απόκριση λαμβάνεται από τις αντίστοιχες βιοδραστικές

ζώνες μόνο κατά την αντίδραση με τα ειδικά αντισώματα. Οι αποκρίσεις που λαμβάνονται από βιοδραστικές ζώνες που αντιστοιχούν στο ίδιο αντίσωμα είναι όμοιες μεταξύ τους. Επιπλέον, δεν υπάρχει εμφανής απόκριση από την περιοχή που δεν έχει ακινητοποιηθεί ειδικό αντίσωμα, η οποία καταδεικνύει την απουσία μη ειδικής δέσμευσης στην αισθητήρια επιφάνεια. Πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση της CRP ήταν ικανή η αντίδραση με το αντίσωμα ανίχνευσης για τη λήψη μετρήσιμου σήματος ενώ στην περίπτωση των D-dimers ήταν απαραίτητη η αντίδραση με στρεπταβιδίνη προκειμένου να ληφθεί μετρήσιμο σήμα, αυτό είναι αποτέλεσμα του γεγονότος ότι η συγκέντρωση των D-dimers στο δείγμα ήταν χαμηλότερη σε σχέση με αυτή της CRP αλλά κυρίως της χαμηλότερης σταθεράς σύνδεσης των αντισωμάτων κατά των D-dimers σε σχέση με τα αντίστοιχα της CRP.



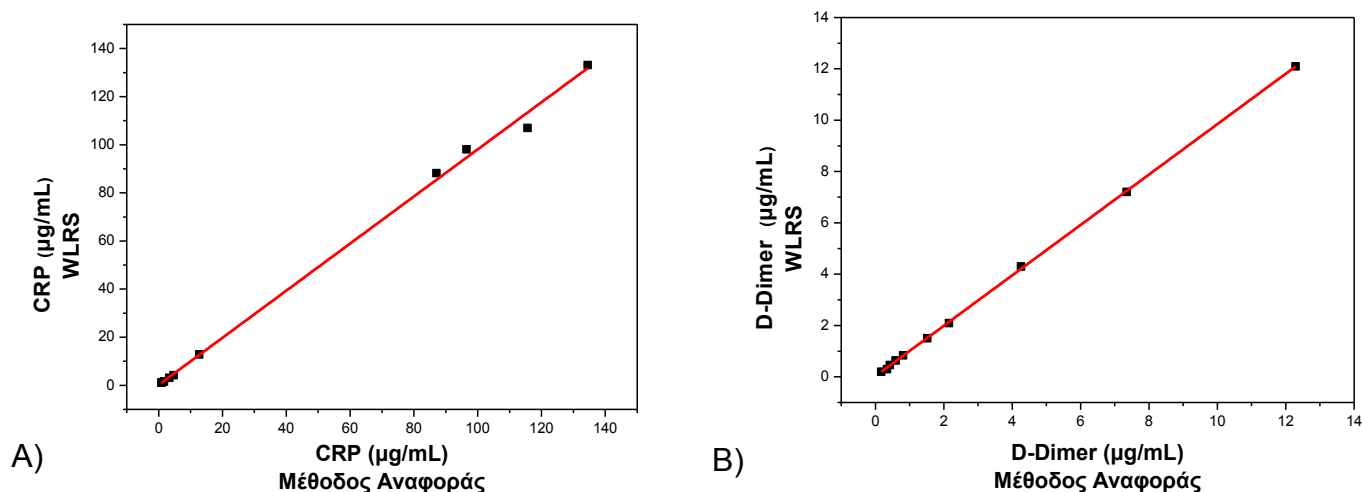
Σχήμα 66: Απόκριση σε πραγματικό χρόνο κατά τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της CRP και των D-dimers σε δείγμα ανθρώπινου πλάσματος (C2). Κάθε καμπύλη αφορά μέτρηση σε συγκεκριμένη βιοδραστική ζώνη. Οι καμπύλες κόκκινου και μαύρου χρώματος αντιστοιχούν σε απόκριση από ζώνες αντισώματος CRP ενώ οι καμπύλες ροζ και πράσινου χρώματος αντιστοιχούν σε απόκριση από ζώνες αντισώματος D-Dimer. Η μπλε καμπύλη αντιστοιχεί σε απόκριση από σημείο της επιφάνειας όπου δεν έχει ακινητοποιηθεί ειδικό αντίσωμα (Blank).

Στον πίνακα 9 παρατίθενται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τον προσδιορισμό των δύο αναλυτών σε 10 δειγμάτων πλάσματος. Επίσης στο Σχήμα 67 παρουσιάζεται η συσχέτιση των τιμών των συγκεντρώσεων CRP και D-dimers οι οποίες προσδιορίστηκαν για τα άγνωστα δείγματα με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα και τις μεθόδους αναφοράς.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά την ταυτόχρονη μέτρηση της CRP και των D-dimers σε δείγματα πλάσματος με την μέθοδο αναφοράς (νεφελομετρία) και με την αναπτυχθείσα μέθοδο WLRS

Αριθμός Δείγματος	CRP (μg/mL) Μέθοδος Αναφοράς	CRP (μg/mL) WLRS	D-dimers (μg/mL) Μέθοδος Αναφοράς	D-dimers (μg/mL) WLRS
C1	115,6	107	1,52	1,5
C2	0,9	1,02	0,59	0,63
C3	4,7	4,2	2,15	2,09
C4	3,4	3,1	0,81	0,84
C5	1	1,2	0,17	0,2
C6	1,7	1,57	0,42	0,46
C7	12,7	12,8	0,34	0,3
C8	87,1	88,2	7,35	7,2
C9	96,5	98,1	12,29	12,1
C10	134,5	133,1	4,26	4,3

Με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα κατασκευαστήκαν οι καμπύλες συσχέτισης των τιμών που ελήφθησαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο σε σχέση με την μέθοδο αναφοράς (Σχήμα 67).



Σχήμα 67: Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της CRP (A) και D-dimers (B) που προσδιορίστηκαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο (WLR) και με τα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα νεφελομετρίας Siemens Dimension® (CRP) και Siemens Innovance® (D-dimer). Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις ευθείες παλινδρόμησης (κόκκινο χρώμα).

Οι εξισώσεις των ευθειών παλινδρόμησης που ελήφθησαν ήταν:

$$\text{CRP: } y = 0,979(\pm 0,017)x + 0,177(\pm 1,168), \quad R^2 = 0,997$$

$$\text{D-dimers: } y = 0,982(\pm 0,004)x + 0,025(\pm 0,019) \quad R^2 = 0,999$$

Όπως προκύπτει από τις τιμές των συντελεστών συσχέτισης (R^2) και τις εξισώσεις των ευθειών παλινδρόμησης υπήρχε πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ των τιμών που προσδιορίστηκαν με τον αναπτυχθέντα ανοσοαισθητήρα και τις μεθόδους αναφοράς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη οπτικού ανοσοαισθητήρα για την ταυτόχρονη ανίχνευση της CRP και των D-dimers μέσω μικροσυστοιχιών αντισωμάτων. Το πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων-Ανοσοαισθητήρων του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Μικροηλεκτρονικής και την εταιρεία «*θMetrisis*». Η παρακολούθηση των βιοαντιδράσεων με τον αναπτυσθέντα αισθητήρα βασίζεται στη δημιουργία φάσματος συμβολής κατά την ανάκλαση λευκού φωτός από μια επιφάνεια πυριτίου που φέρει ένα υμένιο από διαφανές υλικό. Το φάσμα συμβολής μετατοπίζεται κατά τη βιοαντίδραση λόγω της δημιουργίας μιας βιομοριακής στοιβάδας στην επιφάνεια του διαφανούς υποστρώματος, η οποία μεταφράζεται από το λογισμικό ως αύξηση του πάχους της επιφανειακής στοιβάδας και αποτελεί το μετρήσιμο αναλυτικό σήμα. Αρχικά, στα πλαίσια της εργασίας, αναπτύχθηκαν μη ανταγωνιστικοί ενζυμοανοσοχημικοί προσδιορισμοί για την CRP και τα D-dimers σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για να γίνει η επιλογή των αντισωμάτων και η καταρχήν επιλογή των συνθηκών του κάθε ανοσοπροσδιορισμού. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην υιοθέτηση κοινών συνθηκών για τους δύο ανοσοπροσδιορισμούς ώστε οι ίδιες συνθήκες να χρησιμοποιηθούν κατά τη μεταφορά των ανοσοπροσδιορισμών στον υπό ανάπτυξη οπτικό αισθητήρα για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τους. Έτσι, μέσω των ανοσοχημικών προσδιορισμών σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης προσδιορίστηκαν τα βέλτιστα ρυθμιστικά διαλύματα ακινητοποίησης των αντισωμάτων, αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης του στερεού φορέα, ανοσοαντίδρασης, και έκπλυσης. Επίσης έγινε η επιλογή του μέσου παρασκευής των προτύπων (πλάσμα αίματος) και η μελέτη της σταθερότητας τους.

Παράλληλα βελτιστοποιήθηκαν διάφορες παράμετροι του οπτικού αισθητήρα. Η πιο σημαντική από αυτές ήταν το υλικό από το οποίο αποτελείται το ανώτερο στρώμα της ανακλαστικής επιφάνειας. Στην βιβλιογραφία, έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτόν τον σκοπό δύο υλικά, το Si_3N_4 και το SiO_2 .

Συγκεκριμένα, λεπτά υμένια Si_3N_4 (~65 nm) έχουν χρησιμοποιηθεί σε σύστημα ανοσοαισθητήρα που βασίζεται επίσης στην φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός για τον προσδιορισμό της CRP και της α-φετοπρωτεΐνης (AFP) [66,107]. Στις μελέτες αυτές επιχειρείται η ανίχνευση των αναλυτών κατά το στάδιο της αντίδρασης του προτύπου/δείγματος με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Επίσης, ακολουθείται μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων για την ακινητοποίηση του ειδικού αντισώματος στην αισθητήρια επιφάνεια προκειμένου να αυξηθεί όσον το δυνατόν περισσότερο η ικανότητα δέσμευσης του ακινητοποιημένου αντισώματος. Έτσι η μελέτη για τον προσδιορισμό του υλικού και του πάχους της διαφανούς στοιβάδας στην παρούσα εργασία επικεντρώθηκε σε επιφάνειες οι οποίες έφεραν υμένια: Si_3N_4 πάχους 100 και 250 nm, SiO_2 πάχους 300, 500, 700, 1000 και 3000 nm, καθώς και επιφάνεια που έφερε διπλό υμένιο $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ πάχους 1000/100 nm. Τα υψηλότερο αναλυτικό σήμα ελήφθη για υμένια SiO_2 πάχους ίσου ή μεγαλύτερου από 700 nm, ενώ και οι δύο επιφάνειες Si_3N_4 καθώς και ο συνδυασμός υμενίων των δύο υλικών παρείχε πολύ χαμηλότερα σήματα, αν και ο συνδυασμός των δύο υλικών παρείχε υψηλότερο σήμα σε σχέση με το υμένιο Si_3N_4 . Το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της μελέτης διέφεραν από αυτά της βιβλιογραφίας σε σχέση με τη βέλτιστη σύσταση του επιφανειακού υμενίου οφείλεται πιθανότατα στον τρόπο με τον οποίο γίνεται ο υπολογισμός του πάχους της επιφανειακής στοιβάδας. Η μορφή του φάσματος συμβολής εξαρτάται από τη διαφορά στον δείκτη διάθλασης των δύο υλικών που συνιστούν την βιοδραστική επιφάνεια. Το Si_3N_4 έχει πολύ υψηλότερο δείκτη διάθλασης σε σχέση με το πυρίτιο και το SiO_2 , έτσι τα φάσματα συμβολής που προκύπτουν έχουν ελάχιστα των οποίων η τιμή προσεγγίζει το μηδέν και ως εκ τούτου η μετατόπιση τους πρέπει να είναι πιο εύκολο να παρατηρηθεί. Το Si_3N_4 έχει όμως πολύ διαφορετικό δείκτη διάθλασης από αυτό των πρωτεϊνικών υμενίων, ο οποίος είναι κοντά στον δείκτη διάθλασης του SiO_2 . Έτσι η καλύτερη επίδοση των υμενίων SiO_2 αποδίδεται στο γεγονός ότι για την παρακολούθηση της βιομοριακής αντίδρασης με τον αναπτυσθόντα αισθητήρα υπολογίζεται η φαινόμενη αύξηση του πάχους της επιφανειακής στοιβάδας που περιλαμβάνει τόσο το SiO_2 όσο και τα προσδεμένα σε αυτό βιομόρια.

Ακολούθησε βελτιστοποίηση της χημικής τροποποίησης της επιφάνειας, του τρόπου πρόσδεσης των ειδικών αντισωμάτων στην αισθητήρια επιφάνεια, των συνθηκών εναπόθεσης των διαλυμάτων των ειδικών αντισωμάτων καθώς και της συγκέντρωσης του ειδικού αντισώματος. Επίσης πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη μελέτη της ομοιογένειας της ακινητοποίησης του αντισώματος στην επιφάνεια καθώς και της επαναληψιμότητας του σήματος που λαμβάνεται από διαφορετικές επιφανείες ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των ανοσοπροσδιορισμών. Τα ευρήματα επιβεβαίωσαν την επαναληψιμότητα των μετρήσεων τόσο εντός της ίδιας επιφάνειας όσο και μεταξύ διαφορετικών επιφανειών. Αξιολογήθηκε επίσης η σταθερότητα των τροποποιημένων με αντισώματα κατά της CRP και των D-dimers επιφανειών α) κατά την φύλαξη τους, β) για επαναλαμβανόμενες χρήσεις εντός της ίδιας ημέρας και, γ) για επαναλαμβανόμενες χρήσεις μεταξύ διαφορετικών ημερών. Διαπιστώθηκε ότι οι τροποποιημένες με επιφανείες αντισώματα ήταν εξαιρετικά σταθερές και μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για διάστημα ενός μηνός και μέχρι 30 κύκλους αντίδρασης/αναγέννησης χωρίς να επηρεαστεί η δεσμευτική ικανότητα του ακινητοποιημένου αντισώματος.

Ο αισθητήρας που αναπτύχθηκε παρέχει τη δυνατότητα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο όλων των σταδίων της ανοσοανάλυσης, δηλαδή της αντίδρασης του αναλύτη στο δείγμα με το ακινητοποιημένο αντίσωμα (πρώτο στάδιο), της αντίδρασης του δεσμευμένου αναλύτη με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης (δεύτερο στάδιο) και τέλος την αντίδραση της στρεπταβιδίνης με τα ακινητοποιημένα στην επιφάνεια ανοσοσυμπλέγματα (τρίτο στάδιο). Βρέθηκε ότι ήταν δυνατή η ανίχνευση της CRP σε όλα τα στάδια της ανοσοαντίδρασης με την ευαισθησία ανίχνευσης να βελτιώνεται 25 και 1000 φορές αντίστοιχα όταν αντί για το πρώτο στάδιο ο προσδιορισμός βασιζόταν στο σήμα από το δεύτερο και το τρίτο στάδιο, αντίστοιχα. Αντίθετα για τα D-dimers, δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση στο πρώτο στάδιο, ενώ η ανίχνευση στο τρίτο στάδιο βελτίωνε την ευαισθησία κατά 8 περίπου φορές σε σχέση με το αν η ανίχνευση βασιζόταν στα σήματα που λαμβάνονταν στο δεύτερο στάδιο. Οι διαφορές στην ευαισθησία ανίχνευσης των δύο αναλυτών απηγούν διαφορές στη σταθερά συγγενείας των αντίστοιχων αντισωμάτων δέσμευσης και ανίχνευσης. Ανεξάρτητα από τις διαφορές αυτές οι περιοχές

εργασίας των ανοσοπροσδιορισμών που αναπτύχθηκαν επιτρέπουν τον προσδιορισμό των δυο αναλυτών σε δείγματα τόσο από υγιείς δότες όσο και σε δείγματα ασθενών [111, 112, 113] μετά από κατάλληλη αραίωση των δειγμάτων. Στην περίπτωση του ταυτόχρονου προσδιορισμού των δύο αναλυτών όπου απαιτείται μια κοινή αραίωση, ο προσδιορισμός της CRP μπορεί να πραγματοποιείται με βάση το σήμα στο πρώτο ή το δεύτερο στάδιο του ανοσοπροσδιορισμού ενώ των D-dimers στο τρίτο στάδιο.

Οι ανοσοπροσδιορισμοί για την CRP και τα D-dimers που αναπτύχθηκαν στον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός (WLRS) ήταν ακριβείς όπως δείχθηκε από τις δοκιμασίες ανάκτησης καθώς και με την ανάλυση δειγμάτων πλάσματος που ελήφθησαν από ανώνυμους δότες και των οποίων οι συγκεντρώσεις ως προς τους δύο αναλύτες είχαν προηγουμένως προσδιοριστεί από τα Διαγνωστικά Εργαστήρια του Νοσοκομείου «ΕΡΡΙΚΟΣ ΝΤΥΝΑΝ», το οποίο παρείχε και τα δείγματα.

Ο ταυτόχρονος προσδιορισμός περισσότερο του ενός αναλυτών με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα βασίζεται στη δημιουργία πάνω στην αισθητήρια επιφάνεια διακριτών ζωνών των αντίστοιχων ειδικών αντισωμάτων και τοποθέτηση της μικροροϊκής κυψελίδας πάνω σε κινούμενη τράπεζα για τη σάρωση της επιφάνειας σε σχέση με την οπτική ίνα. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η κίνηση της τράπεζας δεν επηρεάζει τη σταθερότητα και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων, χρησιμοποιήθηκε μια αισθητήρια επιφάνεια στην οποία είχαν δημιουργηθεί επτά ζώνες του αντισώματος κατά CRP. Τα αναλυτικά σήματα που ελήφθησαν από τις επτά διαφορετικές ζώνες κατά τη διάρκεια της ανοσοαντίδρασης ήταν εξαιρετικά επαναλήψιμα με διακύμανση μικρότερη από 5 % της μέσης τιμής ενώ η μέση τιμή ήταν ίδια με την τιμή που ελήφθη από μια μονή ζώνη και μετρήσεις σταθερού σημείου. Επομένως, είναι δυνατή η εφαρμογή του αναπτυχθέντος συστήματος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μέχρι και επτά αναλυτών.

Συμπερασματικά, ο οπτικός ανοσοαισθητήρας για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της CRP και των D-Dimers που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής παρέχει ακριβείς και αξιόπιστες μετρήσεις. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διάφοροι ανοσοαισθητήρες οι οποίοι βασίζονται σε αρχή λειτουργίας παρόμοια με αυτή του αναπτυχθέντος

αισθητήρα. Συγκεκριμένα, οι αισθητήρες αυτοί βασίζονται στην φασματοσκοπία συμβολής ανάκλασης (Reflectance Interference Spectroscopy, RIFs) και έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο για τον προσδιορισμό μεμονωμένων αναλυτών [66, 67] αλλά και για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό περισσότερων της μιας ουσίας με χρήση κάμερας CCD για την καταγραφή του σήματος από τις διαφορετικές βιοδραστικές ζώνες [105, 106]. Ωστόσο, οι διατάξεις αυτές είναι σχετικά μεγάλου μεγέθους για χρήση στο σημείο φροντίδας του ασθενούς. Επιπλέον στις περισσότερες περιπτώσεις εφαρμόζονται πολύπλοκες πορείες χημικής ενεργοποίησης της επιφάνειας για την επακόλουθη ακινητοποίηση των βιομορίων προκειμένου να επιτευχθεί υψηλή σταθερότητα των ακινητοποιημένων βιομορίων και κατά συνέπεια υψηλότερο αναλυτικό σήμα.

Συγκρινόμενος με άλλους αισθητήρες που δεν χρησιμοποιούν ιχνηθέτες και συγκεκριμένα με τους αισθητήρες Συντονισμού Επιφανειακών Πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR) που είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη κατηγορία αισθητήρων παρουσιάζει εφάμιλλη ικανότητα ανίχνευσης αναλυτών υπερτερώντας στο κόστος αγοράς και χρήσης καθώς το κόστος ενός βιοαισθητήρα SPR είναι πολλαπλάσιο αυτό του αισθητήρα WLRS [116].

Εκτός από τους βιοαισθητήρες SPR στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί ποικίλοι άλλοι αισθητήρες για την ανίχνευση της CRP. Στον πίνακα 10 αναφέρονται κάποιοι από αυτούς καθώς και το εύρος της περιοχής εργασίας που έχει επιτευχθεί με καθένα από αυτούς και οι αντίστοιχοι χρόνοι ανάλυσης. Οι αισθητήρες αυτοί βασίζονται σε διαφορετικές αρχές λειτουργίας οι οποίες περιλαμβάνουν Προφίλ Συντονισμού Ακουστικών κυμάτων (Resonance Acoustic Profiling, RAP), Μικροδίσκους Συντονισμού Φωτονίων (Photonic Microring Resonators, PMR), Ανοσοαισθητήρες Τριχοειδούς Ροής (Lateral Flow Immunosensor, LFI) και Μικροδοκούς Πιεζοαντίστασης (Piezoresistive Microcantilever, PM). Από τη σύγκριση των αισθητήρων αυτών με το αναπτυχθέντα ανοσοαισθητήρα προκύπτει ότι ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η μέτρηση είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτόν των άλλων αισθητήρων, το εύρος όμως της περιοχής εργασίας είναι σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό των άλλων αισθητήρων. Επιπλέον ο αναπτυχθείς

ανοσοαισθητήρας παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης πολύ χαμηλότερων συγκεντρώσεων του αναλύτη της CRP σε σχέση με τους υπόλοιπους αισθητήρες που αναφέρονται στον πίνακα 9. Όσο αφορά την ανίχνευση των D-dimers, στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αισθητήρες οι οποίοι βασίζονται σε Ποτενσιομετρία Διαφορικών Παλμών (Differential Pulse Voltametry, DPV), Χρονικά Διαχωριζόμενου Φθορισμού (Time Resolved Fluorescence, TRF) και Ανοσοαισθητήρες Τριχοειδούς Ροής (Lateral Flow Immunosensor, LFI). Η σύγκριση αυτών των αισθητήρων με το αναπτυσσόμενο σύστημα ανάλυσης καταδεικνύει ότι η ανάλυση με τον αναπτυσσόμενο αισθητήρα πραγματοποιείται σε σημαντικά μικρότερο χρόνο σε σχέση με τις μεθόδους της βιβλιογραφίας με εύρος εργασίας παρόμοιο με αυτό που προσδιορίστηκε για τον αναπτυσσόμενο αισθητήρα (Πίνακας 9). Τέλος στην βιβλιογραφία περιγράφονται δυο αισθητήρες για ταυτόχρονη ανίχνευση της CRP και των D-dimers: α) με αισθητήρα RIFs (Reflectance Interference Spectroscopy) και β) με αισθητήρα Επιφανειακών Ακουστικών Κυμάτων (Surface Acoustic Wave, SAW). Οι χρόνοι που απαιτούνται για την ταυτόχρονη ανάλυση των δυο αναλυτών είναι παρόμοιοι με αυτόν που απαιτείται με το αναπτυσσόμενο αισθητήρα (περίπου 30 min). Τα όρια ανίχνευσης όμως και για τις δυο μεθόδους είναι πολύ υψηλότερα από αυτά που επιτυγχάνονται με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός. Τα όρια ανίχνευσης της CRP και των D-dimer είναι 250 ng/mL και 2 µg/mL, αντίστοιχα. Αντιθέτως στον αισθητήρα που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία τα όρια ανίχνευσης είναι 0,05 ng/mL για την CRP και 25 ng/mL για τα D-dimers. Χαμηλότερα όρια ανίχνευσης επιτρέπουν εκτενέστερες αραιώσεις του δείγματος πλάσματος και επομένως μικρότερους όγκους δείγματος αλλά και ελαχιστοποίηση της επίδρασης από τη μήτρα του δείγματος. Συμπερασματικά, λοιπόν με τον αναπτυσσόμενο αισθητήρα επιτυγχάνεται ταυτόχρονος προσδιορισμός των αναλυτών CRP και D-dimers σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, με μεγάλη ακρίβεια και επαληψιμότητα και χρησιμοποιώντας εξαιρετικά μικρές ποσότητες δείγματος.

Πίνακας 10: Αισθητήρες για ανίχνευση CRP και D-dimers

Αναλύτης	Μέθοδος Ανίχνευσης	Χρόνος Ανάλυσης	Εύρος περιοχής εργασίας
CRP D-dimer	Αναπτυχθείς αισθητήρας	30 min	0,05 ng/mL-10 µg/mL 20 ng/mL-10 µg/mL
CRP	SPR [116]	17 min	1 ng/mL – 50 µg/mL
CRP	RAP [117]	30 min	3 ng/mL – 230 ng/mL
CRP	PMR [118]	60 min	10 ng/mL – 1 µg/mL
CRP	LFI [119]	12 min	1 ng/mL – 10 µg/mL
CRP	PM [120]	50 min	1 µg/mL – 200 µg/mL
CRP	RIFS [66]	20 min	10ng/mL – 100 µgmL
D-dimer	DPV [121]	30 min	0,1 ng/mL – 100 µg/mL
D-dimer	TRF [122]	1 h	80 ng/mL – 100 µg/mL
D-dimer	LFI [123]	20 min	100 ng/mL – 4 µg/mL
CRP D-dimer	RIFS [115]	20 min	Δεν παρέχεται καμπύλη παρά μόνο μετρήσεις για 5 µg/mL CRP και 5.5 µg/mL D-dimers
CRP D-dimer	SAW [124]	15 min	250 ng/mL – 20 µg/mL 2 µg/mL – 10 µg/mL

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 11: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
C-Reactive Protein	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
D-Dimers	D-διμερή
Phosphocholine	Φωσφοχολίνη
Bovine Serum Albumin	Βόειος αλβουμίνη
White Light Reflectance Spectroscopy	Φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός
Surface Plasmon Resonance	Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων
Reflectometric InterFference Spectroscopy	Φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

AST	Ασπαραγινική Αμινοτρανσφεράση
CK	Κινάσης της Κρεατίνης
LDH	Γαλακτικής Αφυδρογονάσης
CRP	C-Reactive Protein
MYO	Μυοσφαιρίνη
PCh	Phosphocholine
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
SPR	Surface Plasmon Resonance
RIFS	Reflectometric InterFERENCE Spectroscopy
WLRS	White Light Reflectance Spectroscopy
PDMS	Πολύ(διμεθυλοσιλοξιλάνιο)
AFM	Atomic Force Microscopy
APTES	(3-αμινοπροπυλο) τριαθοξυσιλάνιο
3-GOPTS	(3-γλυκιδιλοξυπροπυλο) τριμεθοξυσιλάνιο
BSA	Bovine Serum Albumin
POC-testing	Point Of Care testing
PBS	Phosphate Buffer Solution
b-BSA	Biotinylated Bovine Serum Albumin
SAW	Surface Acoustic Wave
LFI	Lateral Flow Immunosensor
DPV	Differential Pulse Voltametry
RAP	Resonance Acoustic Profiling
PM	Piezoresistive Microcantileve
PMR	Photonic Microring Resonators

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Plebani, M. Biochemical markers of cardiac damage: from efficiency to effectiveness. Clin. Chim. Acta, 311, 2001, p.p 3-7.
2. Azzazy, H.M.E., Christenson, R.H. Cardiac markers of acute coronary syndromes: is there a case for point-of-care testing? Clin. Biochem., 35, 2002, p.p. 13-27.
3. WHO, Facts About Cardiovascular Diseases, World Health Organization, 2007, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.
4. S. Allender, P. Scarborough, V. Peto, M. Rayner, European Cardiovascular Disease Statistics 2008, 2008, p.p. 1–112.
5. Bhayana, V., Henderson, A.R. Biochemical Markers of Myocardial Damage. Clin. Biochem, 28, 1995, p.p. 1-29.
6. Panteghini, M. Acute coronary syndrome: biochemical strategies in the Troponin. Era. Chest, 122, 2002, p.p. 1428 –1435.
7. Dirckx, J.H. Stat! Emergency laboratory tests and point-of-care testing. J. Am. Assoc. Med. Transcr., 25, 2006, 115–120.
8. LaDue, J.S., Wroblewski, F., Karmen, A. Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. Science, 120, 1954, p.p. 497.
9. Zaninotto, M., Mion, M.M., Novello, E., Altinier, S., Plebani, M. New biochemical markers: From bench to bedside. Clin. Chim. Acta, 381, 2007, p.p.14-20.
10. Anjum Qureshi, Yasar Gurbuz, Javed H. Niazi Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review. Sensors and Actuators B: Chemical, 171– 172, 2012, p.p. 62– 76.
11. Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with an non-protein somatic fraction of the Pneumococcus. J Exp Med, 52, 1930, p.p. 561–71.

12. Shrive, A.K., Cheetham, G.M.T., Holden, D., Myles, D.A.A., Turnell, W.G., Volanakis, J.E., Pepys, M.B., Bloomer, A.C., Greenhough, T.J.,. Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nature Struct. Biol.* 3, 1996, p.p. 346–354.
13. Α. Γουλές, Θ. Σαρικούδης, Γ. Βαϊόπουλος,. Η C- αντιδρώσα πρωτεΐνη στην κλινική πράξη. *Ελληνική Ρευματολογία*, 2006, 17, p.p. 334-339.
14. Calabro, P., Willerson, J. T. & Yeh, E. T. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 108, 2003, p.p 1930-1932.
15. Paffen, E. & DeMaat, M. P. (2006) C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? *Cardiovascular Research*, 71, 2006, p.p. 30-39.
16. Koropouli, M. K., Markakis, C. P., Papageorgiou, E. & Kotsifaki, E.. Identification of group IIA and V secretory phospholipases A2 in gingival crevicular fluid of periodontal patients (abstract). *Chemistry and Physics of Lipids*, 143, 2006, p.p.66.
17. Giannakis, E., Male, D. A., Ormsby, R. J., Mold, C., Jokiranta, T. S., Ranganathan, S. & Gordon, D. L. (2001) Multiple ligand binding sites on domain seven of human complement factor H. *International Immunopharmacology*, 1, 2001,p.p. 433-443.
18. Ballou, S. P. & Cleveland, R. P. (1991) Binding of human C-reactive protein to monocytes: analysis by flow cytometry. *Clinical and Experimental Immunology*, 84, 1991,p.p.329-335.
19. Liuzzo, G., Santamaria, M., Biasucci, L. M., Narducci, M., Co-lafrancesco, V., Porto, A., Brugaletta, S., Pinnelli, M., Rizzello, V., Maseri, A. & Crea, F. Persistent activation of nuclear factor kappa-B signaling pathway in patients with unstable angina and elevated levels of C-reactive protein evidence for a direct proinflammatory effect of azide and lipopolysaccharide-free C-reactive protein on human monocytes via nuclear factor kappa-B activation. *Journal of the American College of Cardiology*, 49, 2007, p.p. 185-194.

20. Pasceri, V., Willerson, J. T. & Yeh, E. T. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*, 102, 2000, p.p. 2165-2168.
21. Vigushin DM, Pepys MB and Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J. Clin. Invest.*, 91, 1993, p.p. 1351-1357.
22. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 107, 2003, p.p. 499-511.
23. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease Detection and prevention. *Circulation*, 107, 2003, p.p. 363-369.
24. Gaffney PJ. Subunit relationships between fibrinogen and fibrin degradation products. *Thromb Rcs.*, 2, 1973, p.p. 201-218.
25. Gaffney PJ. D-dimer. History of the discovery, characterization and the utility of this and other fibrin fragments. *Fibrinolysis*, 7, 1993, p.p. 2–8.
26. [www. Shutterstoc.com](http://www.Shutterstoc.com)
27. Fowler WE, Erickson HP, Hantgan RR, McDonagh J, Hermans J. Cross-linked fibrinogen dimers demonstrate a feature of the molecular packing in fibrin fibers. *Science.*, 211, 1981, p.p. 287-289.
28. [www. wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)
29. Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost.*, 89, 2003, p.p. 409-419.
30. Gaffney PJ, Joe F. The lysis of crosslinked human fibrin by plasmin yields initially a single molecular complex, D dimer-E. *Thromb Res.*, 15, 1979, p.p. 673-687.
31. A Wakai, A Gleeson, D Winter. Role of fibrin D-dimer testing in emergency medicine. *Emerg Med J*, 20, 2003, p.p. 319–325.

32. Raimondi P, Bongard O, de Moerloose P, et al. D-dimer plasma concentration in various clinical conditions: Implication for the use of this test in the diagnostic approach of venous thromboembolism. *Thromb Res.* 69,1993, p.p.125–130.
33. Bayes-Genis A, Mateo J, Santalo M, et al. D-Dimer is an early diagnostic marker of coronary ischemia in patients with chest pain. *Am Heart J.* 140, 2000, p.p. 379–384.
34. Lowe GDO, Yarnell JW, Rumley A, et al. C-reactive protein, fibrin D-dimer, and incident ischemic heart disease in the Speedwell Study: are inflammation and fibrin turnover linked in pathogenesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21, 2001, p.p. 603–610.
35. Soheir S. Adam, Nigel S. Key, and Charles S. Greenberg. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood*, 113, 2009, p.p. 2878-2887.
36. Gershlick H. A. Blood markers of cardiovascular disease. *European Heart Journal*, 20, 1999, p.p. 1443–1444.
37. Gordon D.O. Lowe, John W.G. Yarnell, Ann Rumley, David Bainton, Peter M. Sweetnam, C-Reactive Protein, Fibrin D-Dimer, and Incident Ischemic Heart Disease in the Speedwell Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21, 2001, p.p. 603-610.
38. Mary McGrae McDermotta, Philip Greenlanda, Jack M Guralnikb, Luigi Ferruccib, David Greena, Kiang Liua, Michael H Criquic, Joseph R Schneidera,d, Cheeling Chana, Paul Ridkere, William H Pearcea, Gary Martina, Elizabeth Clarkf and Lloyd Taylor. Inflammatory markers, D-dimer, pro-thrombotic factors, and physical activity levels in patients with peripheral arterial disease. *Vascular Medicine.* 9, 2004, p.p. 107-115.
39. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer. Βιοχημεία 5^η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2002.
40. Yalow, R.S., Berson, S.A., Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods, *Nature*, 184, 1959, p.p. 1648-1649.

41. Chard, T. In *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, 3rd ed., Elsevier Science B.V. Amsterdam, 1987, 1, pp. 1-25.
42. Κουππάρης, Μ.Α., *Ειδικά Κεφάλαια Αναλυτικής Χημείας*, Αθήνα, 1989, p.p. 91-111.
43. Χατζηγιάννου, Θ.Π., Κουππάρης, Μ.Α. *Ενόργανη Ανάλυση*, Αθήνα, 2000, p.p. 529-554.
44. Catt, K., Tregear, G.W. Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. *Science*, 158, 1967, p.p. 1570-1572.
45. Butler, J.E. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods*, 22, 2000, p.p. 4-23.
46. Wu, A.H.B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. *Clin. Chem. Acta*, 369, 2006, p.p. 119-124.
47. Nakamura, H., Karube, I. Current research activity in biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, 2003, p.p. 446-468.
48. Clark, L.C. Jr, Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 102, 1962, p.p.29.
49. D'Orazio, P. Biosensors in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta*, 334, 2003, p.p. 41-69.
50. Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.*, 16, 2001, p.p. 121-131.
51. Diaz-Gonzalez, M., Gonzalez-Garcia, M.B., Costa-Garcia, A. Recent Advances in Electrochemical Enzyme Immunoassay. *Electroanalysis*, 17, 2005, p.p. 1901-1918.
52. Milligan, C., Ghindilis, A. Laccase based sandwich scheme immunosensor employing mediatorless electrocatalysis. *Electroanalysis*, 14, 2002, p.p. 415-419.
53. Starodub, N.F., Dzantiev, B.B., Statorub, V.M., Zherdev, A.V. Immunosensor for the determination of the herbicide simazine based on

- an ion selective field-effect transistor. *Anal. Chim. Acta*, 424, 2000, p.p. 37-43.
54. I.R. Sinclair and *Transducers*, Newnes 3rd edition, 2001.
 55. Janshoff, A., Galla, H.J., Steinem, C. Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors-An alternative to optical biosensors. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, 2000, p.p. 4004-4032.
 56. Bunde, R.L., Javri, E.J., Rosentreter, J.J. Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta*, 46, 1998, p.p.1223-1236.
 57. Lippa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W. Immunosensors-principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta*, 314, 2001, p.p. 1-25.
 58. Fabio Giavazzia,b,1, Matteo Salinaa,b,1, Roberto Cerbinoa, Mattia Bassic, Davide Prosperid, Erica Ceccarelloa,b, Francesco Damine, Laura Solae, Marco Rusnati, Marcella Chiarie, Bice Chinig, Tommaso Bellinia,2, and Marco Buscaglia Multispot, label-free biodetection at a phantom plastic–water interface. *PNAS*, 110, 2013, p.p. 9350–9355.
 59. Heideman, R.G., Kooyman, R.P.H, Greve, J. Performance of a highly sensitive optical waveguide Mach-Zehnder interferometer immunosensor. *Sens. Actuators*, B10, 1993, p.p. 209-217.
 60. I. Raptis, K. Misiakos, S. Kakabakos, P. Petrou, E. Makarona, M. Kitsara, “Monolithically Integrated Physical Chemical and Biological Sensor Arrays based on Broad-band Mach-Zehnder Interferometry”, *PCT*, 2009.
 61. Maria Kitsara, Konstantinos Misiakos, Ioannis Raptis, and Eleni Makarona. Integrated optical frequency-resolved Mach-Zehnder interferometers for label-free affinity sensing. *Optics express*. 18, 2010, p.p. 8193-8206.
 62. Homola J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal Bioanal Chem*, 377, 2003, p.p. 528–539.
 63. Lukosz, W. Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing. *Biosens. Bioelectron.*, 6, 1991, p.p. 215-225.

64. Stefano Mariani & Maria Minunni. Surface plasmon resonance applications in clinical analysis. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406, p.p. 2303–2323.
65. Christiane Albrecht, Peter Fechner, Dmytro Honcharenko, Lars Baltzer, Gunter Gauglitz. A new assay design for clinical diagnostics based on alternative recognition elements, *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 2010, p.p. 2302–2308.
66. Hyung Woo Choi, Yasuhiko Sakata, Yoshikazu Kurihara, Tooru Ooya, Toshifumi Takeuchi, Label-free detection of C-reactive protein using reflectometric interference spectroscopy-based sensing system *Analytica Chimica Acta*, 728, 2012, p.p. 64– 68.
67. Melanie Ewald & Alexander Fabian Le Blanc & Günter Gauglitz & Günther Proll A robust sensor platform for label-free detection of anti-Salmonella antibodies using undiluted animal sera. *Anal Bioanal Chem*, 405, 2013, p.p. 6461–6469.
68. P.S.Petrou, D.Ricklin, M.Zavali, I.Raptis, S.E.Kakabakos, K.Misiakos, J.D.Lambris . Real-time label-free detection of complement activation products in human serum by white light reflectance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2009, p.p. 3359–3364.
69. Maria Zavali, Panagiota S. Petrou, Dimitrios Goustouridis, Ioannis Raptis, Konstantinos Misiakos, Sotirios E. Kakabakos. A regenerable flow-through affinity sensor for label-free detection of proteins and DNA. *Journal of Chromatography B*, 878, 2010, p.p. 237–242.
70. M. Zavali, P.S. Petrou, S.E. Kakabakos, M. Kitsara, I. Raptis, K. Beltsios and K. Misiakos Label-free kinetic study of biomolecular interactions by white light reflectance spectroscopy. *Micro & Nano Letters*, 1, 2006, p.p. 94-98.
71. K.Manoli, D.Goustouridis, S.Chatzandroulis, I.Raptis, E.S.Valamontes, M.Sanopoulou, Vapor sorption in thin supported polymer films studied by white light interferometry. *Polymer*, 47, 2006, p.p. 6117–6122 .

72. Morgan, C.R. Immunoassay of human insulin and growth hormone simultaneously using I⁻¹³¹ and I⁻¹²⁵ tracers. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 123, 1966, p.p.230-233.
73. Ekins, R., Chu, F., Biggart, E. Development of microspot multi-analyte ratiometric immunoassay using dual fluorescent-labeled antibodies. *Anal. Chim. Acta*, 227, 1989, p.p. 73-96.
74. Kricka, L.J. Simultaneous multianalyte immunoassays. In *Immunoassay*, eds Diamandis, E.P., Christopoulos, T.K., Academic Press, San Diego, 18, 1996, p.p. 389-404.
75. Kricka, L.J. Multianalyte testing. *Clin. Chem.*, 38, 1992, p.p. 327-328.
76. Ekins, R.P. Multi-analyte immunoassay. *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, 7, 1989, p.p.155-168.
77. Donohue, J., Bailey, M., Gray, R., Holen, J., Huang, T-M., Keevan, J., Mattimiro, C., Putterman, C., Stalder, A., Defreeze, J. Enzyme immunoassay system for panel testing. *Clin. Chem.*, 35, 1989, p.p. 1874-1877.
78. Buechler, K.F., Moi, S., Noar, B., McGrath, D., Villela, J., Clancy, M., Shenhav, A., Colleymore, A., Valkirs, G., Lee, T. Simultaneous detection of seven drugs of abuse by the Triage panel for drugs of abuse. *Clin. Chem.*, 28, 1992, p.p. 1678-1684.
79. Wiese, R., Belosludtsev, Y., Powdrill, T., Thomson, P., Hogan, M. Simultaneous multianalyte ELISA performed on a microarray platform. *Clin. Chem.*, 47, 2001, p.p. 1451-1457.
80. Delehanty, J.B., Ligler, F.S. A microarray immunoassay of simultaneous detections of proteins and bacteria. *Anal. Chem.*, 74, 2002, p.p. 5681-5687.
81. Markus F. Templin, Dieter Stoll, Monika Schrenk, Petra C. Traub, Christian F. Vöhringer and Thomas O. Joos. Protein microarray technology. *TRENDS in Biotechnology*. 20, 2002, p.p. 160-166.
82. Heng Zhu and Michael Snyder. Protein arrays and microarrays. *Proteomics and genomics*. 5, 2001, p.p. 40–45.

83. Mendoza LG1, McQuary P, Mongan A, Gangadharan R, Brignac S, Eggers M. High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biotechniques*. 1999 27, p.p. 778-788.
84. E. M. Southern. DNA Microarrays History and Overview. *Methods in Molecular Biology*, 170, 2001, pp. 1-15.
85. Dasilva, Noelia; Diez, Paula; Gonzalez-González, Maria; Matarraz, Sergio; M. Sayagues, J.; Orfao, Alberto; Fuentes, Manuel. Protein Microarrays: Technological Aspects, Applications and Intellectual Property. *Recent Patents on Biotechnology*. 7, 2, 2013, p.p. 142-152.
86. I. Barbulovic-Nad, M. Lucente, Y. Sun, M. Zhang, A. R. Wheeler, M. Bussmann. Bio-Microarray Fabrication Techniques. *Critical Reviews in Biotechnology*, 26, 2006, p.p. 237–259.
87. Bernard, A., Delamarche, E., Schmid, H., Michel, B., Bosshard, H. R., and Biebuyck, H. Printing patterns of proteins. *Langmuir*, 14, 1998, p.p. 2225–2229.
88. Lee, K. B., Park, S. J., Mirkin, C. A., Smith, J. C., and Mrksich, M.. Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography. *Science*, 295, 2002, p.p. 1702–1705.
89. Wadu-Mesthrige, K., Xu, S., Amro, N. A., and Liu, G. Y.. Fabrication and imaging of nanometer-sized protein patterns. *Langmuir*, 15, 1999, p.p. 8580–8583.
90. Keen-Kim D, Grody WW, Richards CS. Microelectronic array system for molecular diagnostic genotyping: Nanogen NanoChip 400 and molecular biology workstation. *Expert Rev Mol Diagn*, 6, 2006, pp. 287-294.
91. Tseng, F. G., Kim, C. J., and Ho, C. M. A high-resolution high-frequency monolithic top-shooting microinjector free of satellite drops - Part I: Concept, design, and model. *Journal of Microelectromechanical Systems*. 11, 2002, pp. 427–436.
92. Ming Qin, Sen Hou, LiKai Wang, Rui Wang, YanLian Yang, Chen Wang ,Lei Yu, Bin Shao, MingQiang Qia Two methods for glass surface

modification and their application in protein immobilization *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 60, 2007, p.p. 243–249.

93. Philipp Angenendt , Jorn Glokler , Jens Sobek , Hans Lehrach , Dolores J. Cahill. N ext generation of protein microarray support materials: Evaluation for protein and antibody microarray applications. *Journal of Chromatography A*, 1009, 2003, p.p. 97–104.
94. Philipp Angenendt. Progress in protein and antibody microarray technology. *Drug Discovery Today*, 10, 2005, p.p. 503-511.
95. Nistor, C., Emneus, J. A capillary-based amperometric flow immunoassay for 2,4,6-trichlorophenol. *Anal. Bioanal. Chem.*, 375, 2003, p.p.125-132.
96. Sheikh, S.H., Abela, B.A., Mulchandani, A. Development of a fluorescence immunoassay for measurement of paclitaxel in human plasma. *Anal. Biochem.*, 283, 2000, p.p. 33-38.
97. De Frutos, M., Paliwal, S.K., Regnier, F.E. Liquid chromatography based enzyme-amplified immunological assays in fused-silica capillaries at the zeptomole level. *Anal. Chem.*, 65, 1993, p.p. 2159-2163.
98. Rao, S.V., Anderson, K.W., Bachas, L.G. Oriented Immobilization of Proteins. *J. Chromatog. B*, 722, 1999, p.p. 11-31.
99. C. L. Smith, J. S. Milea and G. H. Nguyen. Immobilization of Nucleic Acids Using Biotin-Strept(avidin) Systems. *Top Curr Chem*, 261, 2006, p.p. 63–90.
100. Y. Han, D. Mayer, A. Offenha"usser, S. Ingebrandt, Surface activation of thin silicon oxides by wet cleaning and silanization, *Thin Solid Films*, 510, 2006, p.p. 175 -180.
101. Mustafa Ozmen, Keziban Can, Ilker Akin, Gulsin Arslan, Ali Tor Yunus Cengeloglu, Mustafa Ersoz. Surface modification of glass beads with glutaraldehyde: Characterization and their adsorption property for metal ions. *Journal of Hazardous Materials*, 171, 2009, p.p. 594–600.
102. Ilkay Hilal Gubbuk, Mustafa Ozmen, Esra Maltas. Immobilization and characterization of hemoglobin on modified sporopollenin surfaces.

- International Journal of Biological Macromolecules. 50, 2012, p.p. 1346–1352.
103. Anssi Hovinen, Alexei Malinin, Antti Lipsanen. Lithography in Experimental Environment. Reports in Electron Physics, 1, 2000, p.p. 1-17.
 104. Niotis, A.E., Mastichiadis, C., Petrou, P.S., Siafaka-Kapadai, A., Christofidis, I., Misiakos, K., Kakabakos, S.E., Ultra-thin poly(dimethylsiloxane) film-coated glass capillaries for fluoroimmunosensing applications. Microelectron. Eng., 2009.
 105. G.G. Daaboula, R.S. Vedulaa, S. Ahna, C.A. Lopezb, A. Reddingtonb, E. Ozkumurb, M.S. Unlu. LED-based Interferometric Reflectance Imaging Sensor for quantitative dynamic monitoring of biomolecular interactions. Biosensors and Bioelectronics. 26, 2011, p.p. 2221–2227.
 106. Carlos A. Lopez, George G. Daaboul, Rahul S. Vedula, Emre Özkumur, David A. Bergstein, Thomas W. Geisbert, Helen E. Fawcett, Bennett B. Goldberg, John H. Connor, M. Selim Unlu. Label-free, multiplexed virus detection using spectral reflectance imaging. Biosensors and Bioelectronics. 26, 2011, p.p. 3432–3437.
 107. S. Rau, G. Gauglitz, Reflectometric interference spectroscopy (RIfS) as a new tool to measure in the complex matrix milk at low analyte concentration, Anal. Bioanal. Chem. 402, 2012, p.p. 529-536.
 108. B. Arkles, J.R. Steinmetz, J. Zazyczny and P. Mehta “Factors Contributing to the Stability of Alkoxysilanes in Aqueous Solution”, Silicon Compounds Registry and Review, 5th Edition 1991.
 109. Magali Phaner-Goutorbe a, □, Vincent Dugas b, Yann Chevolot a, Eliane Souteyrand, Silanization of silica and glass slides for DNA microarrays by impregnation and gas phase protocols: A comparative study, Materials Science and Engineering C, 31, 2011, p.p. 384–390.
 110. Böhm-Weigert M, Wissel T, Muth H, Kemkes-Matthes B, Peetz D, Long- and short-term in vitro D-dimer stability measured with INNOVANCE D-

- Dimer, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 103, 2010, p.p.461-465.
111. Bansal T, Pandey A, D D, Asthana AK C-Reactive Protein (CRP) and its Association with Periodontal Disease: A Brief Review *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2014 Jul;8(7):ZE21-4.
 112. VanGilder RL¹, Davidov DM², Stinehart KR³, Huber JD³, Turner RC⁴, Wilson KS⁵, Haney E⁵, Davis SM², Chantler PD⁵, Theeke L⁶, Rosen CL⁷, Crocco TJ², Gutmann L⁸, Barr TL⁹. C-reactive protein and long-term ischemic stroke prognosis. *Journal of Clinical Neuroscience*.21, 2014, p.p. 547–553.
 113. Marie-Claire F. Kleinegris¹; Hugo ten Cate¹; Arina J. ten Cate-Hoek¹ D-dimer as a marker for cardiovascular and arterial thrombotic events in patients with peripheral arterial disease. *Thrombosis and Haemostasis*. 2013; 110: 233–243.
 114. P. S. Petrou, M. Chatzichristidi, A Douvas, P. Argitis, K. Misiakos, S. Kakabakos, A biomolecule friendly photolithographic process for fabrication of protein microarrays on polymeric films coated on silicon chips. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 2007, p.p. 1994-2002.
 115. Marc Sämman, Dominik Furin, Johannes Thielmann, Albrecht Pfäfflin, Günther Prol, Christine Harendt, Günther Gauglitz, Erwin Schleicher, and Markus B. Schubert. Amorphous silicon based p-i-n photodetectors for point-of-care testing. *PSS Journal* , 7, 2010, p.p. 1160-1163.
 116. I. Vikholm-Lundin, W.M. Albers, Site-directed immobilisation of antibody fragments for detection of C-reactive protein, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 2006, p.p. 1141–1148.
 117. J.D. McBride, M.A. Cooper, A high sensitivity assay for the inflammatory marker C-Reactive protein employing acoustic biosensing, *Journal of Nanobiotechnology*, 6, 2008, p.p. 1-8.
 118. M.S. Luchansky, A.L. Washburn, M.S. McClellan, R.C. Bailey, Sensitive on-chip detection of a protein biomarker in human serum and plasma over an extended dynamic range using silicon photonic microring

- resonators and sub-micron beads, *Lab on a Chip*, 11, 2011, p.p. 2042–2044.
119. Hyou–Arm Joung, Young Kyoung Oh, Min-Gon Kim, An automatic enzyme immunoassay based on a chemiluminescent lateral flow immunosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 53, 2014, p.p. 330–335.
 120. Yi-Kuang Yen, Yu-Cheng Lai, Wei-Ting Hong, Yotsapoom Pheanpanitporn, Chuin-Shan Chen and Long-Sun Huang, Electrical Detection of C-Reactive Protein Using a Single Free-Standing, Thermally Controlled Piezoresistive Microcantilever for Highly Reproducible and Accurate Measurements, *Sensors*, 13, 2013, p.p. 9653-9668.
 121. S. Chebila, I. Hafaiedhb, H. Sauriat-Dorizona, N. Jaffrezic-Renaultb, A. Errachidb, Z. Alic, H. Korri-Yousoufi, Electrochemical detection of d-dimer as deep vein thrombosis marker using single-chain d-dimer antibody immobilized on functionalized polypyrrole, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2010, p.p. 736–742.
 122. Johannes J. Sidelmann, Jørgen Gram, Anette Larsen, Kathrine Overgaard, Jørgen Jespersen, Analytical and clinical validation of a new point-of-care testing system for determination of D-Dimer in human blood, *Thrombosis Research*, 126, 2010, p.p. 524–530.
 123. Mazher-Iqbal Mohammed, Marc P. Y. Desmulliez, Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review, *Lab Chip*, 11, 2011, p.p. 569–595.
 124. Konstantinos Mitsakakisa,b, Electra Gizeli, Detection of multiple cardiac markers with an integrated acoustic platform for cardiovascular risk assessment, *Analytica Chimica Acta*, 699, 2011, p.p. 1– 5.