ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**Φασματοσκοπική Μελέτη
Οφθαλμικών Παθήσεων και
Ανίχνευση Μορίων Φαρμάκων**

Διδακτορική Διατριβή

Σιδερούδη Θεοχαρία

Τριμελής επιτροπή:

Βογιατζής Γεώργιος, Ερευνητής Β', ΙΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ
Παπαθεοδώρου Γεώργιος, Καθηγητής, ΤΧΜ, ΠΠ
Φαρμακάκης Νικόλαος, Αν. Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, ΠΠ

Πάτρα, Δεκέμβριος 2006

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

...Αντί Προλόγου	i
Περίληψη	ii
Abstract	iii
Κεφάλαιο 1- Εισαγωγή	1
1.1 Φασματοσκοπία	3
1.2 Η Φασματοσκοπία Raman	4
1.3 Στόχος Διατριβής	6
1.4 ...Σε γενικές γραμμές	6
Αναφορές	9
Κεφάλαιο 2- Θεωρητικές Προσεγγίσεις	11
2.1 Σκέδαση Raman	11
2.1.2 Πολωσιμότητα	11
2.1.3 Κλασσική περιγραφή της σκέδασης Raman	13
2.1.4 Κβαντομηχανική περιγραφή της σκέδασης Raman	16
2.1.5 Ένταση της σκέδασης Raman	18
2.1.6 Φαινόμενο Resonance Raman	19
2.2 Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους –Ορατού (UV-Vis)	20
Αναφορές	22
Κεφάλαιο 3- Ανατομία του οφθαλμού	23
3.1 Οπτική λειτουργία	23
3.2 Ανατομία του βολβού του οφθαλμού	24
3.3 Κερατοειδής	26
3.4 Επιπεφυκότας	28
3.5 Δακρυϊκός υμένας (Παραγωγή και αποχέτευση δακρύων)	28
3.6 Σκληρός	29
3.7 Χοριοειδής	29
3.8 Πρόσθιος Θάλαμος	30
3.9 Το υδατοειδές Υγρό	30
3.10 Ίριδα	32
3.11 Οπίσθιος θάλαμος	33
3.12 Ακτινωτό Σώμα	33
3.13 Φακός	34
3.14 Υαλώδες Σώμα	35
3.15 Αμφιβληστροειδής	36
3.16 Ωχρά Κηλίδα	37
3.17 Οπτικό Νεύρο	37
3.18 Οφθαλμικοί Μύες	38
Αναφορές	39

Κεφάλαιο 4- Η φασματοσκοπία Raman στην οφθαλμολογία	41
4.1 Φασματοσκοπικές Τεχνικές στην οφθαλμολογία	41
4.2 Τεχνικές εξέλιξης της φασματοσκοπίας Raman	43
4.3 Εφαρμογές της φασματοσκοπίας Raman στην Βιοϊατρική	45
4.4 Εφαρμογές της φασματοσκοπίας Raman στην οφθαλμολογία	46
4.4.1 Κερατοειδής και Σκληρός	47
4.4.2 Υδατοειδές Υγρό	48
4.4.3 Φακός	48
4.4.4 Υαλώδες Σώμα	48
4.4.5 Αμφιβληστροειδής	49
4.5 Ασφαλείς Χρήση των lasers στον οφθαλμό	49
Αναφορές	52
 Κεφάλαιο 5- Φαρμακοκινητική	 57
5.1 Φαρμακοκινητικές Μελέτες στα ζώα	59
5.2 Βασικές αρχές Φαρμακοκινητικής	60
Αναφορές	62
 Κεφάλαιο 6- Μέθοδος Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS analysis)	 65
6.1 Στατιστικές Μέθοδοι Πολλών Μεταβλητών στην Αναλυτική Χημεία	66
6.2 PLS ανάλυση - Βαθμονόμηση (Calibration)	67
6.3 PLS ανάλυση - Επικύρωση (Validation)	70
6.4 PLS ανάλυση - Πρόβλεψη (Prediction)	72
Αναφορές	73
 Κεφάλαιο 7- Οι πειραματικές Διατάξεις που χρησιμοποιήθηκαν	 75
7.1 Σύστημα T- 64000 Jobin-Yvon	75
7.2 Ευέλικτη οργανολογία Raman (532 nm)	77
7.3 Τεχνικές Μετασχηματισμού Raman	79
7.4 Οργανολογία UV- Raman (HR- 800)	82
7.5 Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Hitachi 220s	82
Αναφορές	84
 Κεφάλαιο 8- Προκαταρκτικά Πειράματα	 85
8.1 Οι χημικές Ουσίες	86
8.2 Παρασκευή Δειγμάτων	88
8.3 Πειραματικές Διατάξεις	88
8.4 Μελέτη Απορρόφησης στο UV και το Ορατό	89
8.5 Φασματοσκοπική Μελέτη των Υδατικών διαλυμάτων των ουσιών με γραμμή διέγερσης 325, 441.6 και 514.5 nm	91
8.6 Συμπεράσματα- Συζήτηση	99
Αναφορές	102

Κεφάλαιο 9- Νέα Οπτική προσοφθάλμια διάταξη, βελτιώσεις και μετατροπές **103**

9.1 Νέα οπτική προσοφθάλμια διάταξη	104
9.1.1 Περιγραφή	104
9.1.2 Μαθηματική Προσέγγιση	107
9.2 Βελτιώσεις στο σύστημα T- 64000	116
Αναφορές	120

Κεφάλαιο 10- Χαρακτηρισμός Οφθαλμικών Ιστών με Φασματοσκοπία Raman **121**

10.1 Πειραματικές Διατάξεις	121
10.2 Προετοιμασία Δειγμάτων	122
10.3 Αποτελέσματα	123
10.3.1 Φακός	123
10.3.2 Κερατοειδής	126
10.3.3 Υδατοειδές Υγρό	130
10.4 Συμπεράσματα- Συζήτηση	132
Αναφορές	134

Κεφάλαιο 11- Ανίχνευση μορίων στο υδατοειδές υγρό χοιρινών οφθαλμών με φασματοσκοπία Raman **137**

11.1 Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν	137
11.1.1 Κεφταζιδίμη	137
11.1.2 Αμφοτερισίνη Β	138
11.1.3 Γλυκόζη	139
11.2 Παρασκευή Δειγμάτων	143
11.2.1 Κρυσταλλική Μορφή	143
11.2.2 Υδατικά Διαλύματα	143
11.2.3 Δείγματα χοιρινών οφθαλμών	143
11.3 Πειραματικές Διατάξεις	144
11.3.1 Φάσματα Κρυσταλλικής μορφής	144
11.3.2 Φάσματα Υδατικών Διαλυμάτων	144
11.3.3 Φάσματα σε πρόσθιο Θάλαμο Χοιρινών Οφθαλμών, in-vitro	145
11.4 Φασματοσκοπική Μελέτη της Κρυσταλλικής μορφής των ουσιών Κεφταζιδίμη, Αμφοτερισίνη Β και Γλυκόζη	145
11.4.1 Κεφταζιδίμη	145
11.4.2 Αμφοτερισίνη Β	146
11.4.3 Γλυκόζη	147
11.5 Φασματοσκοπική Μελέτη των Υδατικών Διαλυμάτων των ουσιών Κεφταζιδίμη, Αμφοτερισίνη Β και Γλυκόζη	149
11.5.1 Κεφταζιδίμη	149
11.5.2 Αμφοτερισίνη Β	149
11.5.3 Γλυκόζη	150
11.6 Σύγκριση των φασμάτων των αντιβιοτικών και της γλυκόζης με τα φάσματα των ενδογενών ιστών του οφθαλμού	151
11.7 Φασματοσκοπική μελέτη Μορίων Φαρμάκων και Φυσιολογικών ουσιών στο υδατοειδές υγρό με φασματοσκοπία Raman	153
11.7.1 Κεφταζιδίμη	153

11.7.2 Αμφοτερισίνη Β	154
11.7.3 Γλυκόζη	156
11.8 Συμπεράσματα	158
Αναφορές	162

Κεφάλαιο 12- Ανίχνευση μορίων στο Μοντέλο του Πρόσθιου Θαλάμου με Φασματοσκοπία Raman.

	165
12.1 Μοντέλο του πρόσθιου Θαλάμου	165
12.2 Οι χημικές ουσίες που μελετήθηκαν	166
12.2.1 Αμικασίνη	167
12.2.2 Σιπροφλοξασίνη	167
12.3 Παρασκευή Δειγμάτων	168
12.3.1 Υδατικά Διαλύματα	168
12.3.2 Προετοιμασία Δειγμάτων στο Μοντέλο του Πρόσθιου Θαλάμου	169
12.4 Πειραματικές Διατάξεις	170
12.5 Φασματοσκοπική Μελέτη των Υδατικών Διαλυμάτων των Ουσιών Αμικασίνη και Σιπροφλοξασίνη	171
12.5.1 Αμικασίνη	171
12.5.2 Σιπροφλοξασίνη	171
12.6 Σύγκριση των φασμάτων των αντιβιοτικών με τα φάσματα του κερατοειδούς και του πολυοξυμεθυλενίου (POM)	173
12.7 Φασματοσκοπική Μελέτη μορίων Φαρμάκων σε μοντέλο Πρόσθιου Θαλάμου	175
12.7.1 Κεφαζιδίμη	175
12.7.2 Αμφοτερισίνη Β	177
12.7.3 Αμικασίνη	179
12.7.4 Σιπροφλοξασίνη	180
12.8 Συμπεράσματα	182
Αναφορές	184

Κεφάλαιο 13- Ανίχνευση μορίων στο Μοντέλο του Πρόσθιου Θαλάμου με Φασματοσκοπία Raman.

	185
13.1 Προετοιμασία Δειγμάτων	185
13.2 Πειραματικές Διατάξεις	186
13.3 Πειραματική Διαδικασία	187
13.4 Αποτελέσματα PLS ανάλυσης	187
13.4.1 Κεφαζιδίμη	187
13.4.2 Αμφοτερισίνη Β	189
13.4.3 Αμικασίνη	192
13.4.4 Σιπροφλοξασίνη	192
13.5 Συμπεράσματα	195
Αναφορές	

1980

Συμπεράσματα iv

Προοπτική v

Περίληψη

Η φασματοσκοπία Raman είναι τεχνική ανελαστικής σκέδασης φωτός, ικανή να ανιχνεύει και να χαρακτηρίζει μόρια σε ποικιλία υδατικών διαλυμάτων. Σκοπός της εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας μη επεμβατικής, μη καταστροφικής φασματοσκοπικής μεθόδου για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τόσο φαρμακευτικών ουσιών (π.χ αντιβιοτικών) όσο και φυσιολογικών ουσιών (π.χ γλυκόζη) στο υδατοειδές υγρό οφθαλμού.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας **αναπτύχθηκε μια νέα γεωμετρική οπτική διάταξη για την καθοδήγηση της δέσμης του laser στον οφθαλμό**, που προσαρμόζεται σε φασματοσκόπιο Raman με ανιχνευτή CCD, δίνει τη δυνατότητα επιλεκτικής συλλογής του σκεδαζόμενου φωτός, σαρώνοντας τον εμπρόσθιο θάλαμο, σε γεωμετρία σκέδασης 90° .

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν **(α)** σε χοιρινούς οφθαλμούς in-vitro, max 24 ώρες μετά τη θανάτωση των ζώων και την αφαίρεση του βολβού, μετά την έγχυση στον εμπρόσθιο θάλαμο μορίων κεφατζιδίμης, αμφοτερισίνης B και γλυκόζης και **(β)** σε μοντέλο πρόσθιου θαλάμου (AAC) σε συνδυασμό με κερατοειδή χιτώνα χοιρινών οφθαλμών μετά την έγχυση μορίων κεφατζιδίμης, αμφοτερισίνης, θειικής αμικασίνης και σιπροφλοξασίνης. Επιπλέον, **χρησιμοποιήθηκε χημειομετρικός αλγόριθμος μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) για να προβλέψει τη συγκέντρωση των αντιβιοτικών στο μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου**.

Με τον νεό αυτό σχεδιασμό αποφεύγεται η απευθείας έκθεση βασικών οφθαλμικών ιστών, όπως του φακού και του αμφιβληστροειδούς, στη δέσμη του laser, ενώ παράλληλα επιτυγχάνονται βέλτιστες συνθήκες συλλογής του σκεδαζόμενου φωτός βελτιώνοντας το λόγο σήματος/θορύβου των φασμάτων. Ανιχνεύτηκαν συγκεντρώσεις στην περιοχή της μέσης ανασταλτικής πυκνότητας για τα αντιβιοτικά τόσο στο υδατοειδές υγρό χοιρινών οφθαλμών όσο και στο μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου· η γλυκόζη ανιχνεύτηκε σε συγκέντρωση κοντά στα παθολογικά επίπεδα των διαβητικών ασθενών. Με βάση και το σφάλμα RMS της ποσοτικής ανάλυσης PLS, προσδοκάται βάσιμα ότι η μέθοδος είναι δυνατό χρησιμοποιηθεί στον τομέα της οφθαλμολογίας για τη μελέτη της φαρμακοκινητικής καθώς και για την έγκαιρη διάγνωση ασθενειών (π.χ. σακχαρώδης διαβήτης).

...Αντί προλόγου

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Εφηρμοσμένης Μοριακής Φασματοσκοπίας του Ερευνητικού Ινστιτούτου Χημικής μηχανικής και Χημικών Διεργασιών Υψηλής Θερμοκρασίας (ΙΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ), στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών. Η τριμελής επιτροπή παρακολούθησης αποτελείτο από τον Ερευνητή Β' του ΙΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ κ. Βογιατζή Γεώργιο, ο οποίος ήταν και ο Επιβλέπων της διδακτορικής διατριβής, τον Καθηγητή του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών κ. Παπαθεοδώρου Γεώργιο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών κ. Φαρμακάκη Νικόλαο. Επίσης θα ήθελα να αναφέρω ότι η διατριβή εντάχθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «ΠΕΝΕΔ-01/ΕΔ-559» από το οποίο και χρηματοδοτήθηκε.

Επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Ερευνητή κ. Γεώργιο Βογιατζή για την υπόδειξη του ενδιαφέροντος θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση και τις εύστοχες υποδείξεις του τόσο κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων όσο και κατά το στάδιο συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους Καθηγητές κ.κ. Παπαθεοδώρου Γεώργιο και Φαρμακάκη Νικόλαο για την ουσιαστική συνεργασία τους σε όλα τα στάδια της παρούσας διατριβής.

Δεν πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον Ερευνητή κ. Χρυσικό Γεώργιο του Ε.Ι.Ε για την πολύτιμη βοήθεια, σε χρόνο και γνώση που μου έδωσε σε ότι αφορά στα θέματα της χημειομετρίας.

Θα πρέπει οπωσδήποτε να αναφέρω ότι οι χοιρινοί οφθαλμοί που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ήταν ευγενική χορηγία του κ. Κολοβούρη Σπύρο και των Ηλειακών σφαγείων, τους οποίους ευχαριστώ θερμά.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Amaia Soto, τη Δρ. Σοφία Οικονομοπούλου, το Νίκο Χουρδάκη, τη Μάτα Ρώμα, τον Τάσο Μανίκα, τη Δήμητρα Περιστεράκη, τον Νίκο Ζωιτό, τον Νόχο Αργύρη και τον Τυροβολά Αναστάσιο για την ποικιλόμορφη βοήθεια τους στο εργαστήριο αλλά και για όλα όσα έμαθα από τον καθένα τους ξεχωριστά.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου Ελένη και Ηλία η συνεισφορά των οποίων σε κάθε μου προσπάθεια είναι ανεκτίμητη. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και όλους όσους βρέθηκαν πλάι μου, για την ψυχολογική τους συμπαράσταση.

Σιδερούδη Θεοχαρία

Abstract

Laser Raman spectroscopy is an inelastic light scattering technique able to characterize molecules in aqueous environments. The purpose of this work is to develop a non-contact and non-invasive spectroscopic method to identify and eventually quantify the presence of medicines (e.g. antibiotics) and physiological substances (e.g. glucose) in the aqueous humor of the eye.

A new laser light delivery probe has been developed and adapted to a Raman spectroscopic system with the ability of favorable collection of the Raman light at 90° scattering geometry while scanning the anterior chamber of the eye.

The technique is applied both, to porcine eyes in-vitro, max. 24 hours after death and extraction, for ceftazidime, amphotericin B and glucose and to a commercially available artificial anterior chamber (AAC) fitted with corneas of porcine eyes for ceftazidime, amphotericin B, amikacin sulphate and ciprofloxacin. Finally, a PLS chemometric algorithm has been developed to predict the concentration of antibiotics in AAC.

This special illumination design gives the opportunity of reducing the direct exposure of the basic cordial ocular tissues, like lens and retina, to the laser beam, while at the same time an optimum collection of scattered light is accomplished. Concentrations close to the minimum inhibitory concentration (MIC) have been detected for antibiotics both in porcine eyes and AAC; the detection of glucose has been realized at concentrations close to the early pathological levels of patients with diabetes. Furthermore, the quantification of concentration of antibiotics in AAC is accomplished by a partial least-squares (PLS) chemometric regression algorithm and the RMS error of the validation procedure further emphasize the promising prospect of the application of the Raman spectroscopy to the Ophthalmology.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πριν από οτιδήποτε άλλο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο πιο αντιπροσωπευτικός τίτλος για τη συγκεκριμένη διατριβή θα ήταν ο εξής: **“Ανάπτυξη διάταξης και μεθόδου για τη μη επεμβατική ανίχνευση μορίων φαρμάκων και φυσιολογικών ουσιών στο υδατοειδές υγρό με φασματοσκοπία Raman”**. Ο τίτλος αυτός κρίνεται καταλληλότερος να προϋδεάσει τον αναγνώστη για το περιεχόμενο της παρούσας εργασίας.

Ο οφθαλμός κατά τη διάρκεια της ζωής μας είναι πιθανόν να προσβληθεί από ασθένειες ή να τραυματιστεί· σ’ αυτές τις περιπτώσεις χρειάζονται εξετάσεις μεγάλης ακριβείας που ανιχνεύουν οφθαλμικές μεταβολές έτσι ώστε να εφαρμοστεί η καταλληλότερη θεραπεία που θα προλάβει μόνιμες οφθαλμικές διαταραχές ή ακόμη και την τύφλωση. Λόγω των οπτικών ιδιοτήτων του ματιού, πληθώρα μη επεμβατικών οπτικών τεχνικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαγνωστικούς αλλά και θεραπευτικούς σκοπούς. Το μάτι είναι το μοναδικό ζωτικό όργανο όπου τα αιμοφόρα αγγεία, η ροή του αίματος και ο νευρικός ιστός μπορούν να απεικονισθούν με μη επεμβατικό τρόπο, κάτι που κάνει δυνατή τη μελέτη των διάφορων δομών του οφθαλμού με διαφορετικές οπτικές διατάξεις. Για παράδειγμα το σχήμα, το πάχος, το χρώμα και η διαφάνεια ενός ιστού μπορούν να εξετασθούν με σχισμοειδή λυχνία.¹

Το laser έχει αποδειχτεί ότι είναι ιδανική πηγή φωτός για τη θεραπεία και τη διάγνωση ασθενειών στην οφθαλμολογία.² Βασικό πλεονέκτημα τους είναι ότι παρέχουν μονοχρωματική ακτινοβολία (με συγκεκριμένο μήκος κύματος) η οποία είναι δυνατόν να συμπίπτει με το συντελεστή απορρόφησης του εξεταζόμενου ιστού αλλά και τον συντελεστή διαπερατότητας των ιστών που πρέπει να αποφύγουμε. Επιπλέον, η ενέργεια της δέσμης είναι δυνατόν να εστιαστεί επιτυχάνοντας πολύ ακριβή εντόπιση- επικέντρωση της δέσμης.

Στην οφθαλμολογία, τα lasers έχουν εξελιχθεί σε βαθμό ώστε να είναι απαραίτητα θεραπευτικά και διαγνωστικά εργαλεία.^{3, 4} Εκτός από την αποκατάσταση ιστών και ουλών όπου χρησιμοποιούνται ευρέως, ειδικά lasers έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν ρήξη και εκτομή των ιστών, ιδιότητα που έχει βρει εφαρμογή στην

διαθλαστική χειρουργική του κερατοειδούς (φωτοδιαθλαστική) και στη φωτοθεραπευτική (αφαίρεση επιφανειακών βλαβών όπως οι εναποθέσεις ασβεστίου). Επίσης τα lasers μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη πρόληψη και τη θεραπεία του γλαυκώματος, με τη δημιουργία περιφερειακής ιριδεκτομής ή και με τη διάνοιξη καναλιών (του ηθμού- τραμπεκουλοπλαστική) για την εκροή του υδατοειδούς υγρού. Επιπλέον τα lasers έχουν βρει εφαρμογή στην θεραπεία της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας αλλά και σε περιπτώσεις ισχαιμίας, όπως και σε περιπτώσεις θρόμβωσης της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς. Τέλος συζητείται σήμερα η αποτελεσματικότητα της χρήσης των lasers στη χοροειδική νεοαγγείωση και στον εκφυλισμό της ωχράς κηλίδας. Άλλες διαγνωστικές τεχνικές που χρησιμοποιούν φως είναι ικανές να δώσουν ποσοτικές πληροφορίες και επαναλήψιμα αποτελέσματα για τον οφθαλμό ή ακόμα και εικόνες των ιστών του. Σε αυτές συγκαταλέγονται, η κατοπτρική μικροσκοπία (specular microscopy) όπως και η μικροσκοπία συνεστίασης (confocal microscopy) που χρησιμοποιούνται για την μελέτη των κυτταρικών επιπέδων του κερατοειδούς καθώς και της καμπυλότητάς του.^{5,6,7} Επίσης η αγγειογραφία φθορισμού (fluorescence angiography) χρησιμοποιείται για την μελέτη της ροής του αίματος και την ανίχνευση μεταβολών στη δυναμική των ρευστών του αμφιβληστροειδή.⁸ Ωστόσο η χρήση του laser ως διαγνωστικού εργαλείου περιορίζεται λόγω των υψηλών κανόνων ασφάλειας που αφορούν στη χρήση τους, έτσι ώστε να μην προκαλούν ανεπιθύμητες βλάβες στα ευαίσθητα στρώματα των ιστών του οφθαλμού, και κυρίως του αμφιβληστροειδή που είναι ο πλέον ευαίσθητος ιστός του ματιού. Το American National Standard for the Safe Use of Lasers δίνει τη μέγιστη επιτρεπτή έκθεση (maximum permissible exposure-MPE) για την αποφυγή τραυματισμών στους οφθαλμικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του αμφιβληστροειδή.⁹ Χρησιμοποιώντας αυτά τα standards, ο Bauer υπολόγισε ότι το MPE για laser στα 514,5 nm πρέπει να βρίσκεται κάτω από 3mJ όταν ο χρόνος έκθεσης είναι ίσος ή περισσότερος από 1s (η επιφάνεια του αμφιβληστροειδή είναι περίπου 2,7cm²).¹⁰

Ωστόσο, η εξαγωγή ποιοτικών αλλά και ποσοτικών πληροφοριών για κάποια φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση, in-vivo, χωρίς επιβλαβή αποτελέσματα σε ιστούς του οφθαλμού, αποτελεί δύσκολη υπόθεση αλλά και ενδιαφέρουσα πρόκληση. Μέχρι τώρα, για ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες που αφορούν την ενυδάτωση ή την χημική σύσταση των οφθαλμικών ιστών (π.χ. διαδικασία επούλωσης του κερατοειδή, μεταβολές στα συστατικά του υδατοειδούς υγρού, πληροφορίες για την διαφάνεια και τη δημιουργία καταρράκτη) και την ανίχνευση ενδοφθalmικών ουσιών (π.χ διαταραχή στην διαδικασία ίασης του κερατοειδούς, οφθαλμική φλεγμονή, μεταβολές στους ιστούς του οφθαλμού λόγω συστηματικών

ασθενειών, ύπαρξη φαρμάκων) χρησιμοποιούνται ιστοχημικές αναλύσεις όπου τα δείγματα λαμβάνονται με παρακέντηση ή βιοψία. Αυτές οι επεμβατικές τεχνικές διαταράσσουν την ισορροπία του οφθαλμού και ελλοχεύουν κινδύνους μόλυνσεων και μετάδοσης λοιμωδών ασθενειών.

Προς αυτή την κατεύθυνση, τεχνικές όπως η φασματοσκοπία μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση μορίων ή ιστών. Η φασματοσκοπία είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνική που μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην μη επεμβατική μελέτη ιστών *in situ*.

1.1 Φασματοσκοπία

Η φασματοσκοπία μελετά την αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη. Δεν περιορίζεται στη χρήση ορατού φωτός αλλά χρησιμοποιεί και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μικρότερα ή μεγαλύτερα μήκη κύματος. Το 1666 ο Newton παρατήρησε ότι όταν λευκό φως διέλθει από γυάλινο πρίσμα, αναλύεται στα χρώματα του ουράνιου τόξου.¹¹ Το ουράνιο τόξο είναι ένα φυσικό φασματόμετρο στον ουρανό όπου ο ήλιος είναι η πηγή του φωτός, τα μόρια του νερού στην ατμόσφαιρα λειτουργούν ως στοιχεία διασποράς και τα μάτια μας παίζουν τον ρόλο του ανιχνευτή. Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, ο Fraunhofer απέδειξε πως το φάσμα του ηλιακού φωτός περιέχει αριθμό σκοτεινών γραμμών λόγω της απορρόφησης φωτονίων στον αέρα.¹² Μετέπειτα, ο Kirchhoff ανέπτυξε το φασματόμετρο και ανακάλυψε ταυτόχρονα με τον Bunsen, τις φασματικές γραμμές των ατομικών στοιχείων. Ανακάλυψαν δύο νέα υλικά, το κέσιο και το ρουβίδιο παρατηρώντας τα χαρακτηριστικά τους φάσματα. Έτσι η ανακάλυψη της ανάλυσης του φωτός σηματοδότησε μεταξύ άλλων την μελέτη των ενεργειακών φασμάτων μορίων του περιβάλλοντός μας.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι φασματοσκοπικών μεθόδων όπως ο φθορισμός, ο φωσφορισμός, η απορρόφηση, η εκπομπή και η σκέδαση. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία από ένα δείγμα είναι συνήθως ασθενής και για μεγάλο χρονικό διάστημα η χρήση της φασματοσκοπίας ήταν περιορισμένη. Όμως με την ανακάλυψη των lasers σε συνδυασμό με την ανάπτυξη ανιχνευτών με υψηλή κβαντική απόδοση σηματοδοτήθηκε η χρήση και η ανάπτυξη των φασματοσκοπικών τεχνικών. Μέχρι στιγμής, οι φασματοσκοπικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται κατά κόρον είναι η απορρόφηση, ο φθορισμός και η σκέδαση (φασματοσκοπία Raman).¹³

Η χρήση της φασματοσκοπίας απορρόφησης σε βιολογικούς ιστούς ή σε άλλα υδατικά περιβάλλοντα είναι περιορισμένη και οφείλεται στον υψηλό συντελεστή

απορρόφησης του νερού στο υπέρυθρο, καθώς οι μετρήσεις του μήκους κύματος και της έντασης των φωτονίων που απορροφώνται συνήθως επιτυγχάνεται με υπέρυθρη ακτινοβολία.

Στον φθορισμό, η διέγερση των ατόμων σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες ακολουθείται από αποδιέγερση σε χαμηλότερες ενεργειακές στάθμες και ως εκ τούτου εκπέμπεται φως, το φαινόμενο οφείλεται στη ύπαρξη φορέων φθορισμού (fluorophore) στοιχείων και είναι δύσκολό να εξαχθούν βιοχημικές πληροφορίες του φθορίζοντος δείγματος διότι τα φάσματα είναι ευρεία και συνεχή.

1.2 Η Φασματοσκοπία Raman

Η Φασματοσκοπία Raman είναι μια ακριβής τεχνική που παρέχει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τη σύσταση των μορίων των εξεταζόμενων δειγμάτων. Η συγκεκριμένη τεχνική είναι δυνατόν να δώσει πληροφορίες *in vivo* χωρίς την αλληλεπίδραση του φωτός με το σύνολο των ιστών του οφθαλμού.

Το 1930 ο Ινδός επιστήμονας C.V. Raman τιμήθηκε με βραβείο νόμπελ για την ανακάλυψη του νέου φαινομένου στην σκέδαση του φωτός από την ύλη το 1928.¹⁴ Κατά την ακτινοβολήση της ύλης με μονοχρωματική ακτινοβολία παρατήρησε ότι δεν συμβαίνουν μόνο τα φαινόμενα της σκέδασης Rayleigh και του φθορισμού (αν υπάρχουν φθορίζοντα μόρια) αλλά λαμβάνει χώρα και ένα άλλο δευτερεύον φαινόμενο μικρότερης έντασης. Η σκέδαση Rayleigh παρατηρείται όταν το φωτόνιο συγκρούεται με ένα μόριο, σκεδάζεται και δεν υπάρχει μεταβολή στην ενέργεια μεταξύ του φωτονίου και του μορίου. Το μήκος κύματος του φωτονίου είναι το ίδιο πριν και μετά την σύγκρουση (ελαστική σκέδαση). Ο φθορισμός, λαμβάνει χώρα όταν τα φθορίζοντα μόρια απορροφούν φως και ακολουθεί εκπομπή φωτός σε μεγαλύτερο μήκος κύματος λόγω αρχικής μη ακτινοβολούσας μετάπτωσης. Μερικά όμως φωτόνια συγκρούονται με μόρια της ύλης και μεταβάλουν την ενέργεια τους (ανελαστική σκέδαση Raman). Συνεπώς, το μήκος κύματος του φωτονίου πριν και μετά την σύγκρουση με κάποιο μόριο διαφέρει. Γενικά, τα σκεδαζόμενα φωτόνια έχουν μικρότερη ενέργεια (μεγαλύτερο μήκος κύματος) από τα προσπίπτοντα φωτόνια. Η μεταβολή αυτή ονομάζεται μετατόπιση 'Stokes'. Ωστόσο, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, μόρια διεγείρονται σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες, ενέργεια που μπορεί να μεταφερθεί στα σκεδαζόμενα φωτόνια. Σε αυτή την περίπτωση τα σκεδαζόμενα φωτόνια έχουν κερδίσει ενέργεια και συνεπώς έχουν μεγαλύτερη συχνότητα (μικρότερο μήκος κύματος) απ' ό τι τα προσπίπτοντα. Το φαινόμενο αυτό

ονομάστηκε *antistokes*. Ωστόσο σε θερμοκρασία δωματίου η μετατόπιση *Stoke* είναι η σημαντικότερη μετάπτωση.

Κατά τη διάρκεια εξέλιξης όλου του φαινομένου η συνολική ενέργεια διατηρείται, αυτό συνεπάγεται ότι η αλλαγή στη ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου πρέπει να ισούται με την μεταβολή της ενέργειας του μορίου στο οποίο προσπίπτει. Έτσι μετρώντας την ενέργεια που χάνει ή κερδίζει ένα φωτόνιο μπορεί να βρεθούν οι μεταπτώσεις μεταξύ ενεργειακών σταθμών του μορίου, έτσι το φάσμα *Raman* σκιαγραφεί το δονητικό φάσμα του μορίου.

Παρακάτω αναφέρονται τα βασικά χαρακτηριστικά του φαινομένου *Raman*:

- Για να σκεδαστεί ανελαστικά ακτινοβολία από ένα μόριο, απαιτείται μεταβολή στη πολωσιμότητα (κατάσταση κατά την οποία ένα ηλεκτρόνιο μπορεί να μετατοπιστεί από εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο σε σχέση με τον πυρήνα κάτι που εξαρτάται άμεσα από το πόσο ισχυρά είναι συνδεδεμένο το ηλεκτρόνιο με τον πυρήνα).
- Η συχνότητα με την οποία σκεδάζεται ένα φωτόνιο *Raman* είναι ανεξάρτητη από το μήκος κύματος του *laser* που χρησιμοποιείται για τη διέγερση των μορίων, παρόλο που η ένταση *Raman* είναι αντιστρόφως ανάλογη της τέταρτης δύναμης του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ($I \propto 1/\lambda^4$).
- Η πιθανότητα του φαινομένου *Raman* είναι 10^6 με 10^8 φορές μικρότερη απ' ό τι η πιθανότητα της σκέδασης *Rayleigh*.
- Το φαινόμενο *Raman* είναι ένα στιγμιαίο μη-ελαστικά σκεδαζόμενο φως και εξελίσσεται σε 10^{-14} s. Το δείγμα σκεδάζει στιγμιαία ένα μικρό ποσό φωτός με διαφορετικό μήκος κύματος από το προσπίπτων κύμα. Από την άλλη, το φαινόμενο του φθορισμού εξελίσσεται σε 10^{-9} με 10^{-10} s και είναι περίπου 10^4 με 10^5 φορές ισχυρότερο από τη σκέδαση *Raman*.
- Με τη φασματοσκοπία *Raman* μπορεί να ανιχνευτεί η χημική σύσταση του εκάστοτε δείγματος και να αποδοθεί η κατά βάρος σύσταση του. Η ένταση του φαινομένου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των συστατικών που εξετάζονται.
- Η Φασματοσκοπία *Raman* ενδείκνυται για την ανίχνευση μορίων σε υδατικά διαλύματα καθότι το φάσμα του νερού είναι αρκετά ασθενές και δεν παρουσιάζει κορυφές στην περιοχή $200\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$, εκτός από τους 1640 cm^{-1} όπου εμφανίζεται μια ευρεία και ασθενής κορυφή που αποδίδεται στη δόνηση κάμψης του μορίου του νερού. Η κορυφή αυτή δεν αλληλεπικαλύπτεται και δεν επηρεάζει, στις περισσότερες περιπτώσεις, τα φασματικά χαρακτηριστικά των βιολογικών υλικών. Επιπλέον στις *in-vitro* μελέτες βιολογικών δειγμάτων σε υδατικά διαλύματα ενδείκνυται η χρήση γιάλινων ή κυψελίδων *quartz* καθότι παρουσιάζουν ασθενές σήμα *Raman*.
- Ο όγκος των δειγμάτων που εξετάζεται μπορεί να είναι μικρός.

- Φάσματα Raman είναι δυνατόν να ληφθούν σε διάφορες πειραματικές συνθήκες. Για τη δημιουργία ανιχνεύσιμου σήματος Raman είναι απαραίτητη η χρήση μονοχρωματικής δέσμης φωτός. Όταν ανακαλύφθηκε το φαινόμενο Raman, η λήψη φασμάτων ήταν πολύπλοκη και απαιτούσε μεγάλο όγκο δειγμάτων και μεγάλο χρόνο συλλογής (~24 h), διότι δεν υπήρχε αρκετά ισχυρή πηγή φωτός έτσι για τη λήψη φασμάτων χρησιμοποιούσαν το φως του ήλιου με κατάλληλα φίλτρα. Με την ανακάλυψη όμως των lasers τέτοιου είδους προβλήματα λύθηκαν. Η δέσμη του laser είναι ισχυρά μονοχρωματική, υψηλής ισχύος με αρκετά μικρή διάμετρο (δέσμης). Το σκεδαζόμενο φως συλλέγεται και αναλύεται σε φασματογράφο σύμφωνα με τη συχνότητα. Στον φασματογράφο δημιουργείται η εικόνα (το φάσμα) που αποτελείται από ισχνές γραμμές. Στην έξοδο του φασματοφωτόμετρου το σήμα προωθείται στον ανιχνευτή (φωτογραφικό φιλμ, λυχνία φωτοπολλαπλασιαστή ή ανιχνευτή CCD), όπου το φάσμα καταγράφεται ακαριαία. Οι σύγχρονοι CCD ανιχνευτές έχουν μεγάλη κβαντική απόδοση όπου ακόμη και οι ισχνές γραμμές του φασματογράφου καταγράφονται σε millisecond, κάτι που ενδείκνυνται για in-vivo μελέτες.

1.3 Στόχος της Διατριβής

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η ανάπτυξη μη επεμβατικής, αβλαβούς φασματοσκοπικής μεθόδου για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τόσο αντιβιοτικών όσο και φυσιολογικών ουσιών στο υδατοειδές υγρό οφθαλμών.

Για την επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου αναπτύχθηκε μια νέα οπτική προσοφθάλμια διάταξη που οδηγεί με κατάλληλο τρόπο τη δέσμη του laser στον οφθαλμό και προσαρμόζεται σε φασματοσκόπιο Raman με ανιχνευτή CCD. Αυτή η νέα διάταξη δίνει τη δυνατότητα ευνοϊκής συλλογής του σκεδαζόμενου φωτός σε γεωμετρία σκέδασης 90° σαρώνοντας τον πρόσθιο θάλαμο.

Το πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας Raman είναι η ικανότητα να ανιχνεύει με μη επεμβατικό τρόπο, τη μοριακή δομή της ύλης, όχι μόνο ποιοτικά αλλά και ποσοτικά. Ωστόσο, βασικό της μειονέκτημα, σε βιολογικές εφαρμογές, είναι ότι για τη λήψη ικανοποιητικών φασμάτων απαιτείται μεγάλο ποσό ενέργειας της προσπίπτουσας δέσμης και μεγάλος χρόνος έκθεσης του δείγματος, καθότι το φαινόμενο Raman είναι περίπου 10^6 με 10^8 φορές ασθενέστερο απ' ό,τι η σκέδαση Rayleigh και το φαινόμενο του φθορισμού. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η συλλογή των σκεδαζόμενων φωτονίων πρέπει να γίνεται με τον ευνοϊκότερο τρόπο, δηλαδή να αποφεύγεται η έκθεση στην ακτινοβολία της δέσμης του Laser ευπαθών ιστών του οφθαλμού.

1.4 ...Σε Γενικές Γραμμές

Στο κεφάλαιο 2 της παρούσας διατριβής παρουσιάζονται οι βασικές αρχές της φασματοσκοπίας Raman, οι σχέσεις που τη διέπουν στις δύο βασικές προσεγγίσεις του φαινομένου, κλασσικά και κβαντομηχανικά. Επίσης περιγράφεται με λίγα λόγια το φαινόμενο της απορρόφησης των υλικών στο UV και το ορατό.

Στο επόμενο κεφάλαιο 3 γίνεται εισαγωγή στην ανατομία του οφθαλμού και περιγράφονται οι βασικές λειτουργίες των κυριοτέρων τμημάτων του.

Ο τρόπος με το οποίο εμπλέκεται η φασμασματοσκοπία Raman στη οφθαλμολογία παρουσιάζεται στο κεφάλαιο 4. Αρχικά αναφέρονται μελέτες που έχουν γίνει για τη βελτίωση της φασματοσκοπίας Raman στον υλικοτεχνικό τομέα ώστε το φαινόμενο να γίνει κατάλληλο για βιοιατρικές γενικά και οφθαλμιατρικές εφαρμογές ειδικότερα. Στη συνέχεια παρουσιάζονται εφαρμογές της φασματοσκοπίας Raman στην οφθαλμολογία. Τέλος αναφέρεται ο ασφαλής τρόπος χρήσης των laser στην οφθαλμολογία καθώς και τα ελάχιστα επιβλαβή όρια ακτινοβολήσης που επιτάσσουν οι ιστοί του.

Η ανίχνευση μορίων, κυρίως φαρμάκων στα διάφορα μέρη του ανθρώπινου σώματος καθώς και ο καθορισμός της πορείας που ακολουθούν από τη στιγμή της χορήγησης μέχρι την πλήρη απομάκρυνση τους από τον οργανισμό, είναι βασικός τομέας έρευνας των βιοιατρικών επιστημών για τον έλεγχο των θεραπευτικών συγκεντρώσεων των φαρμάκων στον οργανισμό. Οι βασικές αρχές της φαρμακοκινητικής στον τομέα της οφθαλμολογίας καθώς και ορισμένες μελέτες παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 5.

Τα τελευταία χρόνια με σκοπό την ποσοτικοποίηση των φασματοσκοπικών μελετών, τα φασματικά αποτελέσματα συνδυάζονται με στατιστικές μεθόδους ανάλυσης. Για την ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων σε αυτήν την εργασία χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS analysis), που οι βασικές της αρχές παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 6.

Στη συνέχεια (κεφάλαιο 7) περιγράφονται οι πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή για τη λήψη των φασμάτων Raman και των φασμάτων απορρόφησης που είναι: το σύστημα T-64000 της Jobin Yvon (514.5 nm), η ευέλικτη οργανολογία Raman (532 nm), το σύστημα FT-Raman FRA-106/S της εταιρείας Bruker (1064 nm), το σύστημα HR-800 της JY-Horiba (325 & 441.6 nm) και το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Hitachi 220S.

Στο κεφάλαιο 8 παρουσιάζονται τα προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν και μας βοήθησαν να καταλήξουμε στη καταλληλότερη οργανολογία και τεχνική για την εφαρμογή της παρούσας διατριβής.

Στο κεφάλαιο 9 περιγράφεται η οπτική προσοφθάλμια διάταξη που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο, η οποία προσαρμόζεται κατάλληλα σε φασματοσκόπιο Raman με ανιχνευτή CCD επιτρέποντας στη δέσμη του laser να διασχίσει το πρόσθιο θάλαμο του οφθαλμού κάθετα στον οπτικό άξονα, εξασφαλίζοντας τη βέλτιστη γεωμετρία σκέδασης στις 90°. Επιπλέον περιγράφονται οι μετατροπές και οι βελτιώσεις που έγιναν στο σύστημα T64000 για να προσαρμοστεί στις ανάγκες των πειραμάτων αυτής της εργασίας.

Στο δέκατο κεφάλαιο χαρακτηρίζονται φασματοσκοπικά δύο βασικοί οφθαλμικοί ιστοί χοιρινών οφθαλμών, ο κερατοειδής και ο φακός καθώς και το υδατοειδές υγρό. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τα φασματικά χαρακτηριστικά των ενδογενών ιστών του οφθαλμού που δυνητικά συνεισφέρουν στα φάσματα που λαμβάνονται μέσα από τον πρόσθιο θάλαμο.

Στο κεφάλαιο 11, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία Raman ανιχνεύτηκαν μικρές ποσότητες των ουσιών κεφταζιδίμη, αμφοτερισίνη και γλυκόζη, οι οποίες εγχύονται στον πρόσθιο θάλαμο χοιρινών οφθαλμών με παρακέντηση, σε διαφορετικά πειράματα για την κάθε ουσία.

Για τη βελτιστοποίηση της γεωμετρίας και των συνθηκών του πειράματος, στο κεφάλαιο 12, χρησιμοποιήθηκε μοντέλο πρόσθιου θαλάμου αντί για χοιρινούς οφθαλμούς. Εγχύθηκαν και ανιχνεύτηκαν τα αντιβιοτικά κεφταζιδίμη, αμφοτερισίνη B, αμικασίνη και σιπροφλοξασίνη.

Στο τελευταίο κεφάλαιο 13, για να προσδιοριστούν ποσοτικά οι συγκεντρώσεις των τεσσάρων προηγούμενων αντιβιοτικών στο υδατοειδές υγρό, επεξεργαστήκαμε τα φασματοσκοπικά αποτελέσματα Raman από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου με τη στατιστική μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS). Η PLS ανάλυση επιτρέπει την εξαγωγή ποσοτικών αποτελεσμάτων για τις χαμηλές συγκεντρώσεις των φαρμάκων ανεξάρτητα από την παρουσία άλλων συστατικών.

Αναφορές

- 1 Duane's Clinical Ophthalmology, Lippincott-Raven Publishers, Hagerstown MD 1997.
- 2 Maiman T. Stimulated optical radiation in ruby. Nature 1960;187:493.
- 3 March, W. Ophthalmic lasers: Current clinical uses. Stack, Thorofare NJ 1984.
- 4 Weingeist, T., Sneed, S. Lasers surgery in ophthalmology. Appleton & Lange, Norwalk 1992.
- 5 Sugar, A., Clinical specular microscopy. Surv. Ophthalmol. 1979;24:21-32.
- 6 Pawley, J. Handbook of biological confocal microscopy. Plenum Press New York NY 1990.
- 7 Jongsma, F., de Brabander, J., Hendrikse, F. Review and classification of corneal topographers. Lasers Med. Sci. 1999;14:2-19.
- 8 Nowotny, H., Alvis, D. A method of photographing fluorescence in circulating blood of the human retina. Circulation 1961;24:82.
- 9 ANSI. American National Standards Institute. Safe use of lasers, In: ANSI standard Z136.1. Laser Institute of America, Orlando U.S.A 1993.
- 10 Bauer, N. Potential applications of confocal Raman spectroscopy in ophthalmology. Thesis University of Maastricht, the Netherlands 1999.
- 11 Sir Isaac Newton. Opticks. Dover Publications New York NY 1979, based on the fourth edition London 1730.
- 12 Purrington, R. Physics in the Nineteenth Century. Rutgers University Press New Brunswick NJ 1997.
- 13 Skoog, D., Leary, J. Principles of instrumental analysis. Saunders College Publishing/ Harcourt Brace College Publishers Orlando FL 1992.
- 14 Raman, C., Krishnan, K. A new type of secondary radiation. Nature. 1928;121:105.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

2.1 Σκέδαση Raman^{1, 2, 3}

Το 1928, ο C.V.Raman περιέγραψε το φαινόμενο της *ανελαστικής σκέδασης του φωτός*. Σύμφωνα με αυτό, η σκεδαζόμενη από ένα μόριο ακτινοβολία περιλαμβάνει φωτόνια ίδιας συχνότητας με τη συχνότητα της προσπίπτουσας δέσμης (ελαστική σκέδαση) αλλά και φωτόνια με διαφορετική συχνότητα (ανελαστική σκέδαση). Το τελευταίο είναι πολύ σπάνιο, αφού μόνο ένα από τα $\sim 10^7$ προσπίπτοντα φωτόνια θα σκεδαστεί σε διαφορετική από την προσπίπτουσα συχνότητα. Το φαινόμενο αυτό, της ανελαστικής σκέδασης των φωτονίων από τα μόρια, πήρε το όνομά του και η φασματοσκοπία Raman αποτέλεσε έκτοτε μια βασική μέθοδο μη καταστροφικής χημικής ανάλυσης.

Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιείται η μονοχρωματική ακτινοβολία ενός laser με μήκος κύματος από το υπεριώδες ως το κοντινό υπέρυθρο. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας είναι η απλή προετοιμασία του δείγματος (το σχήμα και το μέγεθος δεν έχουν σημασία) σε συνδυασμό με τη μικρή ποσότητα δείγματος που απαιτείται, τη δυνατότητα λήψης φασμάτων από υδατικά διαλύματα κ.ά.^{4,5,6} Το κύριο μειονέκτημα είναι η ενδεχόμενη εμφάνιση φθορίζοντος υποστρώματος με διέγερση κυρίως στο ορατό.

2.1.2 Πολωσιμότητα

Ένα μόριο μπορεί να πολωθεί με την εφαρμογή ενός πεδίου που έχει τη δυνατότητα να σχηματίσει δίπολο. Η χαλάρωση του δίπολου έχει ως αποτέλεσμα τη σκέδαση του φωτός. Το φαινόμενο Raman είναι μια ειδική περίπτωση της σκέδασης του φωτός.

Το ηλεκτρικό πεδίο ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος μετατοπίζει το κέντρο του αρνητικού φορτίου στο μόριο σε σχέση με το θετικό (Σχήμα 2.1), επάγοντας μια διπολική ροπή (P), που είναι ανάλογη της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου (E):

$$P = \alpha_k \cdot E \quad (2.1)$$

Σχήμα 2.1:² Δημιουργία διπολικής ροπής από το ηλεκτρικό πεδίο του ηλεκτρομαγνητικού κύματος.

Η σταθερά αναλογίας α , ορίζεται ως *πολωσιμότητα*, αποτελεί μέτρο της ευκολίας με την οποία το ηλεκτρονιακό νέφος μπορεί να διαταραχθεί με την εφαρμογή του πεδίου και η τιμή της είναι πάντα μη μηδενική. Είναι επίσης συνάρτηση του σχήματος και του μεγέθους του μορίου το οποίο και χαρακτηρίζει. Σε μοριακό επίπεδο η πολωσιμότητα θα παρουσιάζει μεταβολές σε σχέση με τον προσανατολισμό του πεδίου με το μοριακό άξονα. Η πολωσιμότητα ενός μορίου παρουσιάζει δηλαδή ανισοτροπία, είναι άρα διαφορετική σε διαφορετικές διευθύνσεις στο χώρο. Η μεταβολή της πολωσιμότητας με τη διεύθυνση μπορεί να αποδοθεί από τον τανυστή πολωσιμότητας που αποτελείται από εννέα τιμές α_{ij} (στοιχεία του τανυστή), που σχετίζονται με το σύστημα συντεταγμένων που επιλέγεται:

$$\alpha_{ij} = \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{bmatrix} \quad (2.2)$$

Ο τανυστής πολωσιμότητας είναι συμμετρικός δηλαδή $\alpha_{ij} = \alpha_{ji}$. Τα διαγώνια στοιχεία του τανυστή καλούνται κύριες τιμές του τανυστή. Αλλαγή σε ένα στοιχείο του τανυστή πολωσιμότητας, οδηγεί σε σκέδαση Raman. Οι ιδιότητες ενός τανυστή, όπως προαναφέρθηκε, μεταβάλλονται με το σύστημα συντεταγμένων που επιλέγεται, υπάρχουν όμως δύο τιμές που παραμένουν αμετάβλητες. Οι τιμές αυτές καλούνται αναλλοίωτες και είναι:

- Η κύρια τιμή $\bar{\alpha}$, που δίνεται από τη σχέση:

$$\bar{\alpha} = 1/3(\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}) \quad (2.3)$$

όπου α_{xx} , α_{yy} , α_{zz} είναι τα διαγώνια στοιχεία του τανυστή πολωσιμότητας και δίνουν τους ημιάξονες του ελλειψοειδούς της πολωσιμότητας.

- Η *ανισοτροπία* γ , που δίνεται από την εξίσωση:

$$\gamma^2 = 1/2[(\alpha_{xx} - \alpha_{yy})^2 + (\alpha_{yy} - \alpha_{zz})^2 + (\alpha_{zz} - \alpha_{xx})^2 + 6(\alpha_{xy}^2 + \alpha_{yz}^2 + \alpha_{zx}^2)] \quad (2.4)$$

Μια γεωμετρική αναπαράσταση του τανυστή πολωσιμότητας είναι εφικτή με τη χρήση του ελλειψοειδούς της πολωσιμότητας. Οι κύριοι άξονες του ελλειψοειδούς καθορίζονται από τη συμμετρία του μορίου που θεωρούμε κάθε φορά. Όταν στο σύστημα συντεταγμένων που χρησιμοποιείται για μια ανάλυση οι καρτεσιανοί άξονες συμπίπτουν με τους κύριους άξονες του ελλειψοειδούς τότε:

$$\alpha_{xy} = \alpha_{yz} = \alpha_{zx} = 0$$

και ο πίνακας της πολωσιμότητας αποκτά διαγώνια μορφή.

Όταν $\alpha_{xx} = \alpha_{yy} = \alpha_{zz}$ και τα μη διαγώνια στοιχεία του τανυστή είναι μηδέν, τότε το ελλειψοειδές εκφυλίζεται σε σφαίρα, η ανισοτροπία είναι ίση με μηδέν και έτσι η πολωσιμότητα παίρνει τη μορφή βαθμωτού μεγέθους. Η *ανισοτροπία* αποτελεί μέτρο της απόκλισης του ελλειψοειδούς της πολωσιμότητας από τη σφαιρική συμμετρία.

Η παράγωγος του τανυστή πολωσιμότητας σε σχέση με την κανονική συντεταγμένη για τη δόνηση κ , Q_κ , (σχέση 2.5) αποτελεί ένα νέο τανυστή ο οποίος καλείται τανυστής Raman. Από τον τανυστή αυτό εξαρτάται η ένταση της σκέδασης Raman.

$$(\alpha'_{ij})_k = \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_\kappa} \right)_0 \quad (2.5)$$

2.1.3 Κλασσική Περιγραφή της Σκέδασης Raman

Η κλασσική θεώρηση της σκέδασης του φωτός στηρίζεται στην υπόθεση ότι το μόριο είναι ένα δονούμενο δίπολο. Το δίπολο αυτό προκύπτει όταν ένα

ηλεκτρομαγνητικό κύμα με περιοδικά μεταβαλλόμενη ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, αλληλεπιδρά με ένα μόριο:

$$E = E_0 \cos \omega_0 t \quad \text{όπου } \omega_0 = 2\pi\nu_0 \quad (2.6)$$

όπου E_0 το πλάτος της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου του ηλεκτρομαγνητικού κύματος, ν_0 η συχνότητα του κύματος και t ο χρόνος. Σύμφωνα με τους νόμους της ηλεκτροδυναμικής, κάθε ταλαντούμενο δίπολο αποτελεί την πηγή ηλεκτρομαγνητικού κύματος με συχνότητα ίση με τη συχνότητα ταλάντωσης του δίπολου. Αντικαθιστώντας τη σχέση (2.6) στη σχέση (2.1), προκύπτει μια εξίσωση που καθορίζει την τιμή της διπολικής ροπής που επάγεται από το ηλεκτρομαγνητικό κύμα:

$$P = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (2.7)$$

Η τιμή της διπολικής ροπής μεταβάλλεται σε συμφωνία με την συχνότητα του κύματος με συνέπεια το μόριο να γίνεται πηγή ακτινοβολίας της ίδιας συχνότητας. Έτσι προκύπτει η σκέδαση Rayleigh, που θα ήταν η μόνη μορφή σκέδασης αν το μόριο δεν είχε τις δικές του δονήσεις. Κατά τη διάρκεια της δόνησης όμως, το μόριο μπορεί να αλλάξει σχήμα και μέγεθος και κατά συνέπεια πολωσιμότητα. Αν υπάρξει αλλαγή στην πολωσιμότητα με τη μετακίνηση των πυρήνων -κατά τη διάρκεια της δόνησης-, υποθέτουμε ότι η μεταβολή αυτή θα είναι γραμμική και το πλάτος της δόνησης μικρό, έτσι ώστε κάθε στοιχείο του τανυστή πολωσιμότητας να δίνεται από τη σχέση:

$$(\alpha_{ij})_k = (\alpha_{ij})_0 + (\alpha'_{ij})_k Q_k \quad (2.8)$$

όπου (α'_{ij}) είναι η μεταβολή του στοιχείου α_{ij} κατά τη διάρκεια μιας δεδομένης δόνησης που χαρακτηρίζεται από την κανονική συντεταγμένη Q_k και περιγράφει τη μετατόπιση όλων των πυρήνων των ατόμων του μορίου κατά τη δόνηση γύρω από τη θέση ισορροπίας και $(\alpha_{ij})_0$ είναι η τιμή του α_{ij} στη θέση ισορροπίας. Η κανονική συντεταγμένη Q_k , μεταβάλλεται περιοδικά με το χρόνο κατά τη διάρκεια της δόνησης και η τιμή της δίνεται από τη σχέση:

$$Q_k = Q_0 \cos(2\pi\nu t) \quad (2.9)$$

όπου Q_0 είναι το πλάτος μιας δεδομένης κανονικής μορφής δόνησης του μορίου με συχνότητα ν . Αν ο ταυιστής πολωσιμότητας γραφεί υπό μορφή πίνακα, τότε

$$(\alpha_{ij}) = \alpha \text{ (όπου } i, j = x, y, z)$$

και η μεταβολή της πολωσιμότητας κατά τη διάρκεια της δόνησης θα γραφεί:

$$a = a_0 + \left(\frac{\partial a}{\partial Q_k} \right)_0 Q_0 \cos(2\pi \nu t) \quad (2.10)$$

Αντικαθιστώντας τη σχέση (2.10) στη σχέση (2.7), λαμβάνεται η σχέση

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_k} \right)_0 E_0 Q_0 \cos(2\pi \nu t) \cos(2\pi \nu_0 t) \quad (2.11)$$

η οποία με τη βοήθεια της τριγωνομετρικής σχέσης,

$$\cos a \cdot \cos b = 1/2 [\cos(a+b) + \cos(a-b)]$$

γράφεται:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_k} \right)_0 E_0 Q_0 (\cos(2\pi [\nu_0 + \nu] t) + \cos(2\pi [\nu_0 - \nu] t)) \quad (2.12)$$

Το δονούμενο μόριο μπορεί έτσι να είναι πηγή σκεδαζόμενης ακτινοβολίας τριών συχνοτήτων:

1. συχνότητας ν_0 , δηλαδή συχνότητας ίσης με αυτής της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (σκέδαση Rayleigh).
2. συχνότητας $\nu_0 - \nu$, δηλαδή συχνότητας ίσης με τη διαφορά των συχνοτήτων της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και των δονήσεων του μορίου (σκέδαση Raman Stokes).

3. συχνότητας $\nu_0 + \nu$, δηλαδή συχνότητας ίσης με το άθροισμα των συχνοτήτων της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και των δονήσεων του μορίου (σκέδαση Raman anti-Stokes).

Επιπλέον, από την τελευταία σχέση προκύπτει ότι για να είναι μια δόνηση ενεργή στο

Raman, θα πρέπει $\left(\frac{\partial a}{\partial Q_k} \right)_0 \neq 0$, δηλαδή θα πρέπει να υπάρξει αλλαγή στην

πολωσιμότητα κατά τη διάρκεια της δόνησης.

2.1.4 Κβαντομηχανική Περιγραφή της Σκέδασης Raman

Ένα από τα φαινόμενα που προκύπτει από την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με ένα μόριο, είναι η σκέδαση Raman. Τα ενεργειακά “σωματίδια” είναι γνωστά ως κβάντα και στην περίπτωση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ως φωτόνια. Η ενέργεια ενός φωτονίου δίνεται από τη σχέση $E = h\nu$, όπου h είναι η σταθερά του Planck και ν η συχνότητα. Η αλληλεπίδραση ενός φωτονίου με ένα μόριο μπορεί να οδηγήσει σε τρία φαινόμενα: απορρόφηση, εκπομπή και σκέδαση.

Η σκέδαση της ακτινοβολίας συμβαίνει ταυτόχρονα με την αλληλεπίδραση του φωτονίου με το μόριο, όταν η ενέργεια του φωτονίου δεν αντιστοιχεί στην ενεργειακή διαφορά μεταξύ της πρώτης ηλεκτρονικά διεγερμένης και της θεμελιώδους ενός μορίου. Η σκέδαση μπορεί να προέλθει χωρίς αλλαγή της ενέργειας του προσπίπτοντος φωτονίου (σκέδαση Rayleigh) ή με αλλαγή αυτής της ενέργειας (σκέδαση Raman).

Στο σχήμα 2.2, φαίνεται ο μηχανισμός της σκέδασης όταν ένα μόριο ακτινοβολείται με μονοχρωματική ακτινοβολία.

Σχήμα 2.2: Ενεργειακό διάγραμμα στο οποίο φαίνονται οι μεταβάσεις ενός συστήματος κατά τη διάρκεια του φαινομένου της σκέδασης Raman Stokes και Anti-Stokes και σκέδασης Rayleigh.

Το μόριο μπορεί να διεγερθεί από τη θεμελιώδη στάθμη ($v=0$) προς την πρώτη ηλεκτρονική και στη συνέχεια να επανέλθει στην ίδια ενεργειακή στάθμη απ' όπου ξεκίνησε, με ταυτόχρονη σκέδαση ενός φωτονίου ίσης ενέργειας με του προσπίπτοντος. Η σκέδαση αυτή είναι η ελαστική σκέδαση Rayleigh. Είναι δυνατόν όμως, το μόριο να χαλαρώσει στη θεμελιώδη κατάσταση με ταυτόχρονη σκέδαση ενός φωτονίου μικρότερης ενέργειας από εκείνη του προσπίπτοντος και μάλιστα ακριβώς ίσης τη διαφορά των δύο διαδοχικών ενεργειακών επιπέδων του μορίου. Η σκέδαση αυτή ονομάζεται Raman Stokes. Πιο σπάνια περίπτωση, για πειράματα στη θερμοκρασία δωματίου, είναι το προσπίπτον φωτόνιο να αλληλεπιδράσει με ένα ήδη δονητικά διεγερμένο μόριο και η χαλάρωση του συστήματος στη θεμελιώδη ενεργειακή στάθμη να προκαλέσει τη σκέδαση ενός φωτονίου με περίσσεια ενέργειας, ίσης και πάλι με αυτή της διαφοράς μεταξύ των δύο διαδοχικών ενεργειακών επιπέδων του μορίου. Η τελευταία περίπτωση αποτελεί τη σκέδαση Raman anti-Stokes.

2.1.5 Ένταση της Σκέδασης Raman

Η θεωρία που αναπτύχθηκε από τον Placzek, επιτρέπει τη διατύπωση εξισώσεων που ερμηνεύουν τις πειραματικά μετρούμενες εντάσεις της σκέδασης Raman Stokes και anti-Stokes. Η θεωρία αυτή στηρίζεται στις ακόλουθες υποθέσεις:

- Η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ν_0 , είναι αρκετά μεγαλύτερη από τη συχνότητα δόνησης του μορίου ν .
- Η συχνότητα που αντιστοιχεί στην ηλεκτρονική μετάβαση του μορίου από τη θεμελιώδη στάθμη στην πρώτη διηγερμένη, είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτή της διεγείρουσας ακτινοβολίας ν_0 .

Λόγω της τελευταίας παραδοχής, η θεωρία του Placzek βρίσκει εφαρμογή μόνο στην απλή σκέδαση Raman και αδυνατεί να εξηγήσει τη σκέδαση Raman συντονισμού (Resonance Raman).

Η θεωρία του Placzek, παρέχει εξισώσεις που περιγράφουν τις εντάσεις των Stokes ($I_{\nu,ij}^{St}$) και anti-Stokes ($I_{\nu,ij}^{aSt}$) ακτινοβολιών. Οι εντάσεις αυτές υπολογίζονται ανά μονάδα έντασης της προσπίπτουσας και της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από ένα μόριο ή από τη μοναδιαία κυψελίδα ενός ταλαντούμενου κρυστάλλου με συχνότητα ν . Οι εξισώσεις προκύπτουν για σκεδαζόμενη ακτινοβολία που παρατηρείται σε γωνία 90° ως προς την προσπίπτουσα δέσμη και θεωρώντας ότι τα διανύσματα του ηλεκτρικού πεδίου τόσο της προσπίπτουσας όσο και της σκεδαζόμενης δέσμης είναι σε συμφωνία με τους άξονες του ορθογωνίου συστήματος συντεταγμένων που έχει προσαρμοστεί στο υπό μελέτη μόριο.

$$I_{k,ij}^{st} = \frac{2\pi^2 h}{c} \frac{(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu})^4}{\tilde{\nu} [1 - \exp(-hc\tilde{\nu}/kT)]} g_\nu (\alpha'_{ij})_0^2 \quad (2.13)$$

$$I_{k,ij}^{aSt} = \frac{2\pi^2 h}{c} \frac{(\tilde{\nu}_0 + \tilde{\nu})^4}{\tilde{\nu} [\exp(hc\tilde{\nu}/kT) - 1]} g_\nu [(\alpha'_{ij})_k]^2 \quad (2.14)$$

Στις παραπάνω σχέσεις $\tilde{\nu}_0$ και $\tilde{\nu}$ είναι η συχνότητα της διεγείρουσας και της δόνησης του μορίου αντίστοιχα, T η απόλυτη θερμοκρασία του δείγματος, h η σταθερά του Planck, c η ταχύτητα του φωτός, g_ν ο βαθμός εκφυλισμού της συγκεκριμένης δόνησης και (α'_{ij}) το στοιχείο του τανυστή Raman που δείχνει τη

μεταβολή της πολωσιμότητας για τη δόνηση κ που μελετάται, ως προς την κανονική συντεταγμένη Q_κ στη θέση ισορροπίας.

Από τις παραπάνω εξισώσεις προκύπτει ότι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας Raman είναι ανάλογη του τετραγώνου του στοιχείου του ταυιστή Raman που εμπλέκεται στη συγκεκριμένη δόνηση, είναι δηλαδή ανάλογη της μεταβολής της πολωσιμότητας κατά τη διάρκεια της δόνησης. Επιπλέον, είναι ανάλογη της τέταρτης δύναμης της συχνότητας της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας.

Με βάση τις εξισώσεις μπορεί να υπολογιστεί ο λόγος των εντάσεων των ακτινοβολιών Raman Stokes και anti-Stokes:

$$\frac{I^{aSt}}{I^{St}} = \frac{(\nu_0 + \nu)^4}{(\nu_0 - \nu)^4} e^{-h\nu/kT} \quad (2.15)$$

Όπως φαίνεται από την παραπάνω σχέση, ο λόγος των εντάσεων των ακτινοβολιών Raman Stokes και anti-Stokes εξαρτάται από την απόλυτη θερμοκρασία του δείγματος.

2.1.6 Φαινόμενο Resonance Raman

Όταν η ενέργεια της διεγείρουσας ακτινοβολίας (ν_0) πλησιάζει ή πέφτει μέσα σε ένα διεγερμένο ηλεκτρονικό επίπεδο λαμβάνονται φάσματα προ-συντονισμού (pre-resonance) ή συντονισμού (resonance) Raman (Σχήμα 2.3), αντίστοιχα.

Η ένταση Raman είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας $(\nu_\varepsilon - \nu_0)$ από τη σχέση 2.16. Όταν η ενέργεια της διεγερμένης ηλεκτρονικής κατάστασης του μορίου, ν_ε , πλησιάζει την ενέργεια της διεγείρουσας ακτινοβολίας, ν_0 , ο παρανομαστής της σχέσης τείνει στο μηδέν με αποτέλεσμα η ένταση να αυξάνεται σημαντικά.

$$I \propto \langle \nu_o \pm \nu \rangle^4 \left[\frac{(\nu_\varepsilon^2 + \nu_o^2)}{(\nu_\varepsilon^2 - \nu_o^2)} \right]^2 \quad (2.16)$$

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι μορφές δόνησης που κυρίως παρατηρούνται με συντονισμό Raman είναι οι εντελώς συμμετρικές και ότι τα φάσματα Raman προσυντονισμού έχουν τα χαρακτηριστικά των φασμάτων Raman συντονισμού αλλά σε μικρότερο βαθμό.

Σχήμα 2.3: Ενεργειακό διάγραμμα στο οποίο φαίνονται οι μεταβάσεις ενός συστήματος κατά τη διάρκεια του φαινομένου της σκέδασης Resonance Raman (Stokes και anti-Stokes) .

2.2 Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους-Ορατού (UV-VIS)

Τα ηλεκτρονικά φάσματα οφείλονται στις ηλεκτρονικές μεταπτώσεις σε μόρια. Η ενέργεια που χρειάζεται για τις ηλεκτρονικές μεταπτώσεις είναι της τάξης μεγέθους μερικών eV, (1eV αντιστοιχεί περίπου σε 8000cm^{-1}). Οι ηλεκτρονικές μεταπτώσεις μπορεί να οφείλονται είτε στη διέγερση ηλεκτρονίων σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες, που συνοδεύεται από απορρόφηση φωτός, είτε στην αποδιέγερση ηλεκτρονίων που συνοδεύεται από εκπομπή φωτός. Αντίστοιχα και για τις δύο περιπτώσεις τα φάσματα που παίρνει κανείς είναι φάσματα απορρόφησης ή εκπομπής.

Οι συχνότητες των φωτονίων που εκπέμπονται ή απορροφώνται σε τέτοιου είδους μεταπτώσεις βρίσκονται στη ορατή και υπεριώδη περιοχή του φάσματος (η περιοχή αυτή αρχίζει περίπου στις 14000cm^{-1} για το κόκκινο, το μπλε βρίσκεται στις 21000cm^{-1} περίπου και φτάνει μέχρι τις 50000cm^{-1} για το άπω υπεριώδες).

Η μορφή του ηλεκτρονικού φάσματος των ουσιών, έχει άμεση σχέση με το χρώμα τους. Για παράδειγμα αν κάποια ουσία απορροφά το μπλε θα φαίνεται κόκκινη όταν ακτινοβολείτε με λευκό φως.

Τα ηλεκτρονικά φάσματα δίνουν πληροφορίες για την ηλεκτρονική δομή των μορίων και αναλύοντάς τα μπορούμε να υπολογίσουμε τις ενέργειες των ηλεκτρονίων στα διάφορα μοριακά τροχιακά.

Στο παρακάτω σχήμα 2.4 φαίνεται μια ηλεκτρονική μετάπτωση. Με α συμβολίζεται η θεμελιώδης στάθμη και με β η διεγερμένη. Με οριζόντιες γραμμές συμβολίζονται τα επίπεδα δόνησης. Όπως φαίνεται μπορεί μια ηλεκτρονική μετάπτωση να έχει σαν συνέπεια παράλληλα με τη διέγερση του ηλεκτρονίου από την α στη β , τη διέγερση από τη θεμελιώδη δονητική στάθμη (θ) σε μια διεγερμένη (δ). Με άλλα λόγια μια ηλεκτρονική μετάπτωση συνοδεύεται συνήθως από δονητική διέγερση. Οι επιπλέον κορυφές που οφείλονται στη δόνηση μπορούν να φανούν σε ένα φάσμα μόνο αν το δείγμα είναι αέριο. Αν το δείγμα είναι υγρό ή στερεό οι γραμμές ενώνονται και δίνουν μια πλατιά, χωρίς δομή, γραμμή. Αυτή είναι και η συνηθισμένη μορφή ηλεκτρονικών φασμάτων.

Η ενέργεια που χρειάζεται για να πραγματοποιηθεί μια ηλεκτρονική μετάπτωση, δηλαδή ισοδύναμα η διαφορά ενέργειας ανάμεσα σε δύο ενεργειακές στάθμες, μπορεί να βρεθεί κατευθείαν από το φάσμα με τη χρησιμοποίηση της σχέσης $E_0 = h \cdot \nu$ όπου E_0 είναι η ενέργεια απορρόφησης ανά μόριο.

Σχήμα 2.4: Ηλεκτρονική διέγερση

Αναφορές

- 1 Ferraro, J.R., Nakamoto, K. “*Introductory Raman Spectroscopy*” **1994**, Academic Press, Inc.
- 2 Baranska, H., Labudzinska, A. and Terpinski, J. “*Laser Raman Spectrometry. Analytical Applications*” **1987**, John Wiley and Sons
- 3 Hendra, P. J., Agbenyega, J. K. “*The Raman Spectra of Polymers*” **1993**, John Wiley and Sons
- 4 www.nicolet.com
- 5 www.cis.tugraz.at
- 6 www.irc.leeds.ac.uk/spectroscopy

ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΟΦΘΑΛΜΟΥ

3.1 Οπτική Λειτουργία¹

Ο οφθαλμός (Σχήμα 3.2Α) είναι το παράθυρό μας προς τον κόσμο. Η όραση είναι η λειτουργία του ματιού που μας δίνει την αίσθηση και την αντίληψη του φωτός, των αντικειμένων και των χρωμάτων. Χάρη σε αυτή την ικανότητα ερχόμαστε σε επαφή με το γύρω κόσμο και συνειδητοποιούμε τη θέση μας και την κίνηση μας μέσα στον χώρο.

Οι φωτεινές ακτίνες όταν προσπέσουν στο μάτι μας, περνούν τα διαφανή στοιχεία του (τον κερατοειδή, το υδατοειδές υγρό, το φακό και το υαλώδες σώμα) που λέγονται και διαθλαστικά μέσα και τέλος συγκεντρώνονται στον αμφιβληστροειδή και κυρίως στην πιο φωτοευαίσθητη περιοχή του, την ωχρά κηλίδα. Η λειτουργία του μπορεί να παρομοιαστεί με την λειτουργία του φιλμ φωτογραφικής μηχανής (Σχήμα 3.1). Οι οπτικές ακτίνες ερεθίζουν ιδιαίτερα τα κωνία και τα ραβδία (φωτοευαίσθητες δομικές μονάδες του αμφιβληστροειδή) και προκαλούν φωτοχημικές διεργασίες και βιοηλεκτρικές μεταβολές που τελικά γίνονται νευρικά σήματα και μεταφέρονται με το οπτικό νεύρο και όλη την οπτική οδό στον εγκέφαλο. Στον εγκέφαλο, τα σήματα αυτά κατά κάποιο τρόπο αποκωδικοποιούνται και ολοκληρώνεται η λειτουργία της όρασης.

Σχήμα 3.1: Σχηματικά ο μηχανισμός της όρασης (Α), σε σύγκριση με τη λειτουργία της φωτογραφικής μηχανής (Β).

3.2 Ανατομία του Βολβού του Οφθαλμού

Ο βολβός του οφθαλμού, με βάρος 6,5-7,5 gr και διαστάσεις 24 mm (προσθοπίσθια διάμετρος), 23 mm (κάθετη διάμετρο) και 23,5 mm (οριζόντια διάμετρο) μαζί με τα υπόλοιπα στοιχεία του που περιγράφονται στη συνέχεια, αποτελεί το όργανο της όρασης.² Εμφανίζει σχήμα σφαιρικό και ως εκ τούτου από περιγραφικής απόψεως δύο πόλους, τον πρόσθιο και τον οπίσθιο. Ο γεωμετρικός άξονας που ενώνει τους δύο πόλους, συμπίπτει με τον οπτικό άξονα. Αποτελείται από τρεις χιτώνες και τρεις θαλάμους (Σχήμα 3.2) και βρίσκεται μέσα στην οφθαλμική κοιλότητα που περιβάλλει και τα υπόλοιπα στοιχεία του.

Οι τρεις χιτώνες αφορούν:

- Τον έξω ή ινώδη που αποτελείται από τον κερατοειδή και τον σκληρό χιτώνα.
- Τον μέσο ή αγγειώδη που αποτελείται από την ίριδα, το ακτινωτό σώμα, και τον χοριοειδή χιτώνα.
- Τον έσω ή νευρικό που αποτελείται από το επιθήλιο του ακτινωτού σώματος (Σχήμα 3.14) και τον αμφιβληστροειδή.

Οι τρεις χώροι αφορούν :

- Τον πρόσθιο θάλαμο και τη γωνία αυτού, απ' όπου αποχετεύεται το υδατοειδές υγρό.
- Τον οπίσθιο θάλαμο και το ακτινωτό σώμα όπου παράγεται το υδατοειδές υγρό.

- Το υαλώδες σώμα που καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος του οφθαλμικού βολβού.

Τα υπόλοιπα τμήματα αφορούν:

- Τα τμήματα που προστατεύουν το μάτι, άνω και κάτω βλέφαρο και βλεφαρίδες.
- Τους δακρυϊκούς αδένες, οι οποίοι διατηρούν υγρό και διαυγές το επιθήλιο του κερατοειδούς.
- Τις αποχετευτικές δακρυϊκούς οδούς, που διατηρούν καθαρά τα κολπώματα του επιπεφυκότα, αλλά και λόγω της λυσοζύμης που περιέχεται στα δάκρυα αναπτύσσουν βακτηριοκτόνο δράση κατά των μικροοργανισμών του επιπεφυκότα.
- Την οφθαλμική κοιλότητα που περιλαμβάνει τους οφθαλμικούς μύες, τα αγγεία και τα νεύρα, το λιπώδες υπόστρωμα και το σύστημα του συνδετικού ιστού.

A

- I) Κερατοειδής και σκληρός.
II) Ίριδα, ακτινωτό σώμα, χοριοειδής.
III) Αμφιβληστροειδής.

- 1) Πρόσθιος θάλαμος.
2) Οπίσθιος θάλαμος.
3) Χώρος του υαλοειδούς σώματος.

B

Σχήμα 3.2: (Α) Τομή του βολβού του οφθαλμού. (Β) Χιτώνες (I-III) και χώροι (1-3) του βολβού του οφθαλμού.

Για τα πειράματα της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν χοιρινοί οφθαλμοί, που τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στις οφθαλμολογικές έρευνες λόγω των ομοιοτήτων που παρουσιάζουν με το ανθρώπινο μάτι, τόσο στο μέγεθος και την ανατομία όσο και στην φυσιολογία. Υπάρχουν διάφορα είδη χοίρων με κρανία διαφορετικού σχήματος, γεγονός που έχει σαν συνέπεια και βολβό με διαφορετικό μέγεθος και σχήμα. Παρολαυτά από μετρήσεις έχει εκτιμηθεί το μέσο μέγεθος για αυτά τα ζώα, (20,1x23,5x24,9 mm).³

Παρακάτω αναπτύσσονται τα βασικότερα από τα τμήματα του οφθαλμού που προαναφέρθηκαν.

3.3 Κερατοειδής

Ο κερατοειδής (Σχήμα 3.3) είναι διαφανής ιστός, δεν έχει αγγεία αλλά παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία γιατί έχει πολλές νευρικές ίνες. Το σχήμα του είναι οβάλ με μέσο μήκος 11,7 mm και πλάτος 10,6 mm.⁴ Το πάχος του κερατοειδούς σε ενήλικες είναι περίπου 580 μm στο κέντρο ενώ αυξάνεται στην περιφέρεια και φτάνει περίπου τα 1 mm. Η καμπυλότητα της πρόσθιας επιφάνεια είναι κατά μέσο όρο 7,8 mm ενώ της οπίσθιας 6,4 mm.⁵ Η πρόσθια επιφάνεια του, είναι κυρτότερη στην κεντρική μοίρα και γενικώς κυρτότερη του σκληρού. Η περιφέρειά του μεταπίπτει βαθμιαία στον σκληρό επικαλυπτόμενη από αυτόν κυρίως πάνω και κάτω παρά στα πλάγια, για τον λόγο αυτό το σχήμα του είναι ελλειψοειδές. Η οπίσθια επιφάνεια του εφυγραίνεται από το υδατοειδές υγρό. Από οπτικής άποψης, ο κερατοειδής χρησιμεύει ως διαθλαστικό μέσο (43 διοπτρίες) για τη συγκέντρωση των φωτεινών ακτινών στο αμφιβληστροειδή.

Το νερό αποτελεί το 78% της σύστασής του, γεγονός στο οποίο οφείλει και τη διαφάνειά του. Επίσης περιέχει 15% κολλαγόνο, 5% άλλες πρωτεΐνες, 1% γλυκοσαμινογλυκάσες και 1% άλας.²

Σχήμα 3.3: Ο κερατοειδής του οφθαλμού

Η δομή του αποτελείται από πέντε στοιβάδες (Σχήμα 3.4):

Το επιθήλιο (εξωτερική στοιβάδα) είναι κυτταρικό στρώμα που καλύπτει την επιφάνεια του κερατοειδούς. Το πάχος του είναι μόνο 5-6 κυτταρικά επίπεδα και δρα ως φραγμός για την διείσδυση μικροβίων και νοσογόνων ουσιών. Σε περίπτωση τραυματισμού του κερατοειδούς αναπτύσσει μηχανισμούς αναγέννησης, όταν όμως το τραύμα διαπεράσει το επιθήλιο και φτάσει βαθύτερα στον κερατοειδή μπορεί να αφήσει κάποια ουλή, στο σημείο της οποίας ο κερατοειδής γίνεται αδιαφανής.

Το πρόσθιο πέταλο (βωμάντειο) βρίσκεται ακριβώς κάτω από το επιθήλιο. Είναι πολύ ανθεκτική επιφάνεια που προστατεύει τον κερατοειδή από τραυματισμούς.

Το στρώμα ή ίδια ουσία, αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα του, δηλαδή την παχύτερη στοιβάδα και βρίσκεται κάτω από το βωμάντειο στρώμα. Αποτελείται από κύτταρα και ίνες κολλαγόνου διατεταγμένες παράλληλα μεταξύ τους. Η διάταξη αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στη διαύγειά του.

Το οπίσθιο ελαστικό πέταλο (Δεσκεμέτειος υμένας ή "μεμβράνη"), είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό και προστατεύει από σοβαρούς τραυματισμούς το ευαίσθητο ενδοθήλιο που βρίσκεται από κάτω.

Το ενδοθήλιο αποτελείται από ένα κυτταρικό στρώμα, συντελεί στη διατροφή του κερατοειδούς γιατί αφήνει να περνούν θρεπτικά συστατικά που περιέχει το υδατοειδές υγρό και ρυθμίζει πόσο νερό πρέπει να συγκεντρώνεται στο κερατοειδή. Στη περίπτωση τραυματισμού δεν έχει την ικανότητα αναγέννησης.

Σχήμα 3.4: Τα κυτταρικά επίπεδα του κερατοειδούς.

Το μέγεθος του κερατοειδή στους χοίρους είναι συγκρίσιμο με αυτό του ανθρώπου. Η επιφάνειά του μετρήθηκε⁶ $\sim 1.2 \text{ cm}^2$, ενώ στον άνθρωπο $\sim 1.3 \text{ cm}^2$.⁷ Έχει σχήμα ελλειψοειδές (οριζόντια) με μήκος 17-19 mm και πλάτος 14-16,5 mm. Η καμπυλότητα της εξωτερικής επιφάνειας θεωρείται ότι έχει ακτίνα 10-11 mm και το πάχος του είναι μικρότερο του 1 mm, όπως και στον άνθρωπο.⁸ Η μορφή του κερατοειδούς είναι πολυστρωματική και η δομή του δεν διαφέρει από αυτή που περιγράψαμε.

3.4 Επιπεφυκότας

Ο Επιπεφυκότας (Σχήμα 3.5) είναι βλεννογόνος ιστός που καλύπτει εξωτερικά το ορατό μέρος του σκληρού και εσωτερικά τα βλέφαρα. Τροφοδοτείται από μικρά αιμοφόρα αγγεία που είναι διακριτά με γυμνό μάτι. Ο Επιπεφυκότας εκκρίνει υγρά και βλέννες που ενυδατώνουν και λιπαίνουν το μάτι.

3.5 Δακρυϊκός Υμένας (παραγωγή και αποχέτευση των δακρύων)

Τα δάκρυα παράγονται στον δακρυϊκό αδένα ο οποίος αποτελεί και την «εκκριτική συσκευή». Τα δάκρυα εφυγραίνουν την εξωτερική επιφάνεια του οφθαλμού (τον κερατοειδή και τον επιπεφυκότα) και τελικά εκρέουν στο αποχετευτικό σύστημα. Αποτελείται από τρεις στιβάδες: την λιπώδη, την υδατινή και την βλεννώδη. Η βλεννώδης στιβάδα συγκρατεί το δακρυϊκό υμένα στη θέση του. Η μεσαία στιβάδα αποτελείται κυρίως από νερό, ενώ η εξωτερική λιπώδης στιβάδα συγκρατεί την επιθυμητή υγρασία στον οφθαλμό. Ο δακρυϊκός υμένας δημιουργεί ένα λείο στρώμα που βοηθάει το φως να εισχωρήσει στον οφθαλμό, τρέφει το πρόσθιο τμήμα του και τον προστατεύει από τραυματισμούς και μολύνσεις.

Στα θηλαστικά το σχήμα του είναι ωοειδές. Στους χοίρους είναι σύνθετος σωληνοκυψελωτός βλεννογόνος αδένας και έχει μελετηθεί η λειτουργία του στο αποχετευτικό σύστημα του υδατοειδούς υγρού του οφθαλμού.⁹

3.6 Σκληρός

Ο σκληρός (Σχήμα 3.5) είναι κοινώς γνωστός σαν το λευκό μέρος του οφθαλμού. Αποτελεί τον πιο ανθεκτικό χιτώνα επάνω στον οποίο καταφύονται οι τένοντες των έξι οφθαλμικών μυών. Διάφορα αγγεία διασχίζουν το σκληρό όπως οι περιδίνητες φλέβες που αποχετεύουν το αίμα κ.α. Το πίσω μέρος του, το διαπερνά το οπτικό νεύρο. Στα παιδιά ο σκληρός είναι λεπτότερος και διαφανής, επιτρέποντας τους υποκείμενους ιστούς να φαίνονται δίνοντας του μια γαλαζωπή χροιά. Με την ηλικία ο σκληρός κιτρινίζει.

Σχήμα 3.5: Οφθαλμός: εξωτερική όψη, με ανοιχτά βλέφαρα.

Η μέση επιφάνεια του σκληρού σε χοιρινούς οφθαλμούς μετρήθηκε $\sim 10 \text{ cm}^2$,⁶ ενώ στον άνθρωπο είναι λίγο μεγαλύτερη ($16\text{-}17 \text{ cm}^2$). Το πάχος του είναι συγκρίσιμο με το πάχος του ανθρώπινου σκληρού, το οποίο κοντά στη περιφέρεια του κερατοειδούς μετρήθηκε $\sim 0.33 \text{ mm}$,⁶ ενώ το αντίστοιχο σημείο στον ανθρώπινο οφθαλμό έχει πάχος $\sim 0,4 \text{ mm}$.¹⁰

3.7 Χοριοειδής

Ο χοριοειδής (Σχήμα 3.6) χαρακτηρίζεται και ως τροφικός υμένας. Βρίσκεται μεταξύ του αμφιβληστροειδή και του σκληρού. Συνδέεται μέσω του ακτινωτού σώματος με το πρόσθιο τμήμα του οφθαλμού και φτάνει μέχρι τις απολήξεις του οπτικού νεύρου στο πίσω μέρος του οφθαλμού. Το χρώμα του είναι μαύρο επειδή περιέχει αρκετή χρωστική, όπως και πολλά αγγεία. Τα αγγεία, και πιο πολύ οι τελικές απολήξεις αυτών που ονομάζονται τριχοειδή, βοηθούν στη θρέψη του αμφιβληστροειδή.

Σχήμα 3.6: Τομή του οπίσθιου μέρους του οφθαλμού όπου φαίνεται ο υμένας του χοριοειδής.

3.8 Πρόσθιος Θάλαμος

Ο πρόσθιος θάλαμος (Σχήμα 2B) οριοθετείται μπροστά από την οπίσθια επιφάνεια του κερατοειδούς και πίσω από την ίριδα και το πρόσθιο μέρος του φακού. Το βάθος του πρόσθιου θαλάμου, που ορίζεται ως η απόσταση μεταξύ της οπίσθιας επιφάνειας του κερατοειδούς και του πρόσθιου τμήματος του φακού, ανέρχεται περίπου στα 3,4 mm, μια διάσταση η οποία μειώνεται με την ηλικία και μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 2mm.^{2,11} Η απόσταση αυτή μεταβάλλεται εξαρτώμενη από τη διάθλαση, την ικανότητα προσαρμογής και την ηλικία. Ο μέσος όγκος του πρόσθιου θαλάμου τόσο σε ανθρώπινο όσο και σε χοιρινό οφθαλμό είναι 0,3 mL.³

3.9 Το Υδατοειδές Υγρό

Το υδατοειδές υγρό παράγεται και εκκρίνεται από το επιθήλιο του ακτινωτού σώματος και πληροί τον πρόσθιο και οπίσθιο θάλαμο. Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην υγεία και την ισορροπία του ματιού (Σχήμα 3.7) και προέρχεται από το αίμα.

Το υδατοειδές υγρό κυκλοφορεί στον χώρο του πρόσθιου και τον οπίσθιου θαλάμου και έχει όγκο περίπου 0,3-0,4 mL. Διαβρέχει το φακό, την ίριδα και τον κερατοειδή και προσφέρει θρεπτικά συστατικά στα στοιχεία αυτά, εξασκώντας και διατηρώντας σταθερή πίεση στο μάτι (ενδοφθάλμια πίεση). Αποχετεύεται κυρίως από

μια περιοχή που λέγεται γωνία του πρόσθιου θαλάμου (Σχήμα 3.8). Η γωνία αυτή σχηματίζεται στην ένωση της πρόσθιας επιφάνειας της ίριδας και της πίσω επιφάνειας του κερατοειδούς (δεσκεμέντειος, ενδοθήλιο). Στην γωνία αυτή υπάρχει ένας πορώδης σχηματισμός, κάτι σαν το «σφουγγάρι» με πολλές τρύπες που λέγεται ηθμός. Μέσα από τους πόρους αυτού του ηθμού και ενός σωλήνα που τον περιβάλλει, αποχετεύεται το υδατοειδές υγρό που τελικά με ειδικές φλέβες ξαναγυρίζει στη φλεβική κυκλοφορία. Η διαδικασία αυτή είναι σημαντική διότι αν ελαττωθεί ή σταματήσει, τότε αυξάνεται η ενδοφθάλμια πίεση με αποτέλεσμα την δημιουργία της ασθένειας του γλαυκώματος. Φυσιολογικά υπάρχει ισορροπία στην παραγωγή και στην αποχέτευση του υδατοειδούς, δηλαδή όσο παράγεται τόσο αποχετεύεται με αποτέλεσμα η ενδοφθάλμια πίεση, να είναι σταθερή (φυσιολογικά επίπεδα 15-21 mm Hg) και το περιεχόμενο του οφθαλμικού θαλάμου να ανανεώνεται πλήρως ανά 10ωρο.

Αποτελείται περίπου από τα ίδια στοιχεία και συστατικά του ορού του αίματος χωρίς σχεδόν καθόλου πρωτεΐνες (0,5-1,6 mg/mL). Τροφοδοτεί το φακό και τον κερατοειδή με νάτριο, κάλιο, οξυγόνο και γλυκόζη. Σε φυσιολογικά επίπεδα περιέχει περίπου 98% νερό, έτσι η συγκέντρωση των βιολογικών μορίων είναι μικρότερη από 2%. Η σύσταση του υδατοειδούς υγρού φαίνεται στον πίνακα I. Η παραπάνω σύσταση μεταβάλλεται ανάλογα με το είδος.

Πίνακας I: Σύσταση του υδατοειδούς υγρού.

Συστατικό	Συγκέντρωση (mg/mL)
Νάτριο	3,75
Κάλιο	0,15
Ασβέστιο	0,07
Μαγνήσιο	0,03
Υδροχλωρικό Οξύ	7,7
Φωσφορικό άλας	0,06
Γαλακτικό οξύ	0,023
Γλυκόζη	0,6
Γλουταθιόνη	0,006

Σχήμα 3.7: Κυκλοφορία του υδατοειδούς υγρού. Παράγεται από το ακτινωτό σώμα, κυκλοφορεί στον πρόσθιο και οπίσθιο θάλαμο και αποχετεύεται από την γωνία του πρόσθιου θαλάμου.

Σχήμα 3.8: Γωνία του πρόσθιου θαλάμου, απ' όπου εκκρίνεται το υδατοειδές υγρό.

3.10 Ίριδα

Η ίριδα (Σχήματα 3.5 & 3.9) είναι επίπεδη και χωρίζει τον πρόσθιο από τον οπίσθιο θάλαμο. Λειτουργεί όπως το διάφραγμα της φωτογραφικής μηχανής. Έχει μια οπή στο κέντρο, την κόρη, απ' όπου περνούν οι ακτίνες του φωτός. Αν το φως είναι έντονο, η οπή αυτή κλείνει για να προστατέψει τον αμφιβληστροειδή. Αν ο φωτισμός είναι λιγοστός (σούρουπο, βράδυ), τότε η κόρη μεγαλώνει. Η ίριδα έχει μύες που ρυθμίζουν το εύρος της κόρης. Το σφιγκτήρα μυ που κλείνει την κόρη, δηλαδή προκαλεί μύση και το διαστολέα, που ο ερεθισμός του προκαλεί μυδρίαση. Το εύρος της κόρης ανάλογα με την πρόσπτωση του φωτός και την ηλικία κυμαίνεται μεταξύ 1,5 και 8 mm. Το χρώμα της ίριδας δίνει και την εντύπωση του χρώματος των ματιών μας. Το χρώμα αυτό εξαρτάται από τα χρωστικά στοιχεία της ίριδας (περισσότερα σε «μελαχρινά» άτομα) και από την αγγείωσή της. Η εμφάνισή της είναι μοναδική σε κάθε άτομο όπως και το δακτυλικό αποτύπωμα.

Η ίριδα των χοιρινών, παρουσιάζει ομοιότητες με του ανθρώπου περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο θηλαστικό. Όταν συστέλλεται σχηματίζει μικρή, οριζόντια ελλειψοειδή κόρη, ενώ όταν διαστέλλεται γίνεται τελείως κυκλική.

Σχήμα 3.9: Η ίριδα διαχωρίζει τον πρόσθιο και τον οπίσθιο θάλαμο.

3.11 Οπίσθιος Θάλαμος

Ο οπίσθιος θάλαμος (Σχήμα 2B) οριοθετείται μπροστά από την οπίσθια επιφάνεια της ίριδας και του ακτινωτού σώματος και πίσω από τον φακό. Διασχίζεται από την ίνες της Ζίνειας που συγκρατούν τον φακό. Στην περιοχή του οπίσθιου θαλάμου παράγεται το υδατοειδές υγρό, από τις ακτινοειδείς προβολές. Ο όγκος του οπίσθιου θαλάμου στον άνθρωπο είναι ~60-90 μL .¹²

3.12 Ακτινωτό Σώμα

Το ακτινωτό σώμα (Σχήμα 3.10) βρίσκεται ακριβώς πίσω από την ίριδα και είναι ουσιαστικά μια αγγειομυϊκή μεμβράνη. Αποτελείται από αγγεία σε ορισμένους ιδιαίτερους σχηματισμούς (που λέγονται ακτινοειδείς προβολείς) όπου παράγεται το υδατοειδές υγρό. Από την περιοχή αυτή ξεκινούν και οι ίνες (της Ζίνειας ή Ακτινωτής ζώνης) που συγκρατούν το φακό (Σχήμα 3.11). Εκτός από τα αγγεία υπάρχουν και μυϊκές ίνες (ο ακτινωτός μυς), που δρουν μαζί με τις ίνες της Ζίνειας ζώνης για να προκαλέσει μεγαλύτερη ή μικρότερη κύρτωση στο φακό. Όταν το ακτινωτό σώμα συστέλλεται, οι ίνες χαλαρώνουν κυρτώνοντας το φακό, κάτι που βοηθάει την ικανότητα του ματιού να εστιάσει σε κοντινά αντικείμενα. Όταν κοιτάμε σε απομακρυσμένα αντικείμενα, το ακτινωτό σώμα χαλαρώνει και οι ίνες που συγκρατούν τον φακό συστέλλονται εκτείνοντας τον φακό ο οποίος γίνεται λεπτότερος βοηθώντας το μάτι να εστιάσει στα μακρινά αντικείμενα. Με την ηλικία οι μύες του ακτινωτού σώματος και ο φακός χάνουν την ελαστικότητά τους προκαλώντας δυσκολίες στη εστίαση (πρεσβυωπία).

Η λειτουργία του ακτινωτού σώματος ως προσαρμογέα του φακού είναι ελλιπής στα θηλαστικά πέραν του ανθρώπου. Η κύρια δομή του ακτινωτού σώματος των χοίρων δεν έχει καλά διευκρινιστεί, όμως είναι γνωστό ότι οι μυϊκές ίνες του είναι ακτινωτές και επιμήκεις όπως του ανθρώπου σε αντίθεση με τα άλλα θηλαστικά που είναι κυκλωτερείς. Σε αυτό το ζώο δεν υπάρχει ένδειξη ότι οι αποφύσεις του ακτινωτού σώματος συνδέονται με την οπίσθια επιφάνεια της ίριδας, κάτι που μπορεί να δικαιολογήσει το γεγονός την κυκλικότητα της κόρης.

Σχήμα 3.10: Το ακτινωτό σώμα είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του υδατοειδούς υγρού.

3.13 Φακός

Ο διαφανής κρυσταλλοειδής φακός (Σχήμα 3.11) με βάρος ~3 g, βρίσκεται πίσω από τη ίριδα και μπροστά από το υαλώδες σώμα. Η διάμετρός του είναι 16 ± 6 mm περίπου και το μέγιστο πάχος του $4,2 \pm 1$ mm.¹⁰ Έχει σχήμα αμφίκυρτου φακού και περιβάλλεται από μια κάψα, το περιφάκιο. Περιέχει σε μεγάλο ποσοστό πρωτεΐνες (περίπου 34%) με ακανόνιστη κατανομή στην επιφάνεια του και μέγιστο πυκνότητας στην περιοχή του πυρήνα. Η σύσταση των πρωτεϊνών και του νερού μεταβάλλεται με το πέρασμα των χρόνων (στη γεροντική ηλικία), μετά από τραυματισμό ή και από άλλα αίτια με αποτέλεσμα να χάνει τη διαφάνεια του, να θολώνει, να γίνεται κίτρινος, ή να ασπρίζει (καταρράκτης).

Δρα ως διαθλαστικό μέσο που εστιάζει το φως πάνω στον αμφιβληστροειδή. Έχει την δυνατότητα να αυξάνει το προσθοπίσθιο πάχος του, αποκτώντας πιο σφαιρικό σχήμα, μεταβάλλοντας έτσι τη διαθλαστική του δύναμη, που υπολογίζεται περίπου σε 43 διοπτρίες. Η ελαστικότητα του επιτρέπει την αυξομείωση του βαθμού κυρτότητας έτσι ώστε να προσαρμόζεται η όραση από μακρινά σε κοντινά αντικείμενα σχεδόν ακαριαία, δηλαδή να μπορούμε να διακρίνουμε μια εκκλησία που βρίσκεται σε απόσταση και αμέσως μετά να μπορούμε να περάσουμε την κλωστή σε μια βελόνα.

Ο κρυσταλλοειδής φακός στους χοιρινούς οφθαλμούς έχει οπίσθια επιφάνεια μεγαλύτερης καμπυλότητας από την εμπρόσθια όπως και στον άνθρωπο. Έχει διάμετρο περίπου 12,5 mm και μέγιστο πάχος περίπου 9,2 mm.¹³ Το περιφάκιο έχει το ίδιο σχήμα με τον άνθρωπο και την ίδια κλιμάκωση του πάχους, με μικρή διαφορά στο πάχος της πρόσθιας επιφάνειάς του.

Σχήμα 3.11: Ο κρυσταλλοειδής φακός και οι μύες της Ζίνειας που τον συγκρατούν και ευθύνονται για την κύρτωσή του.

3.14 Υαλώδες Σώμα

Το υαλώδες σώμα (Σχήμα 3.12) είναι η διαφανής ουσία που πληροί το κέντρο του οφθαλμού. Βασικό του συστατικό είναι το νερό, ο όγκος του (~4 mL) αποτελεί τα 2/3 του όγκου του οφθαλμού. Χρησιμεύει όχι μόνον ως διαθλαστικό μέσο αλλά και για τη διατήρηση της θέσης και του σχήματος του βολβού καθώς και για την στήριξη του φακού. Η παχύρρευστη σύνθεσή του επιτρέπει στο μάτι να επανακτά το αρχικό του σχήμα όταν συμπιεστεί. Με την ηλικία το υαλώδες σώμα γίνεται πιο υδαρό.

Σχήμα 3.12: Το υαλώδες σώμα είναι μια διαφανής μάζα που μοιάζει σαν πήκτωμα και βρίσκεται μεταξύ του φακού και του αμφιβληστροειδούς.

3.15 Αμφιβληστροειδής

Ο αμφιβληστροειδής (Σχήμα 3.13) είναι διαφανές στρώμα, άχρωμο και παίρνει ρόδινη χροιά από τον χοριοειδή που βρίσκεται από κάτω (πιο πίσω). Το φως που μπορεί να φτάσει τον αμφιβληστροειδή έχει μήκος κύματος 400 με 1400 nm, παρόλο που δεν ανταποκρίνεται σε μήκος κύματος μεγαλύτερο από 760 nm. Περίπου το 10% του φωτός που προσπίπτει στο κερατοειδή φτάνει στον αμφιβληστροειδή ενώ το υπόλοιπο χάνεται μέσω της σκέδασης και της απορρόφησης στα διάφορα τμήματα του οφθαλμού, τα αιμοφόρα αγγεία και νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Είναι αισθητήριος πολυστρωματικός ιστός (Σχήμα 3.14), το μέγιστο πάχος του φτάνει τα 0,5 mm και περιέχει εκατομμύρια φωτοϋποδοχείς που συλλέγουν τις ακτίνες του φωτός σε μια μικρή περιοχή του που ονομάζεται ωχρά κηλίδα και τις μετατρέπουν σε ηλεκτρικά σήματα. Αυτοί οι ηλεκτρικοί παλμοί μεταφέρονται μέσω του οπτικού νεύρου στον εγκέφαλο όπου μετατρέπονται σε εικόνες. Υπάρχουν δύο τύποι φωτοϋποδοχέων, τα κωνία και τα ραβδία. Στον αμφιβληστροειδή υπάρχουν περίπου έξι εκατομμύρια κωνία συγκεντρωμένα στην ωχρά κηλίδα που ευθύνεται για την κεντρική όραση. Τα κωνία περιέχουν την χρωστική ροδοψίνη η οποία απορροφάει διαφορετικά μήκη κύματος. Υπάρχουν «μπλε», «πράσινα» και «κόκκινα» κωνία με μέγιστα απορρόφησης στα 425, 530 και 560 nm αντίστοιχα, τα οποία παίζουν ρόλο στην αντίληψη των χρωμάτων και αντιδρούν εύκολα στο δυνατό φως. Επίσης υπάρχουν περίπου 125 εκατομμύρια ραβδία που εκτείνονται στην περιφέρεια του αμφιβληστροειδή και αντιδρούν εντονότερα σε αμυδρό φωτισμό και είναι υπεύθυνα για τη νυκτερινή όραση.

Σχήμα 3.13: Ο αμφιβληστροειδής είναι φωτοευαίσθητος ιστός.

Σχήμα 3.14: Δομή αμφιβληστροειδούς και χιτώνες βολβού.

3.16 Ωχρά Κηλίδα

Η ωχρά κηλίδα (Σχήμα 3.15) βρίσκεται στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς πριν το οπτικό νεύρο και καλύπτει έκταση περίπου 5 mm^2 . Αποτελεί την πιο λεπτή περιοχή του αμφιβληστροειδή, ιδίως στο κέντρο της, για να επιτρέπει την απευθείας πρόσπτωση του φωτός στα οπτικά κύτταρα. Αυτή η περιοχή αποτελείται κυρίως από κωνία και δεν έχει ραβδία και ορίζεται ως το κέντρο της όρασης (δηλαδή η περιοχή όπου έχουμε την καθαρότερη όραση). Η ωχρά έχει χρυσοκίτρινο χρώμα και πάνω της συγκεντρώνονται οι ακτίνες του φωτός δηλαδή εδώ σχηματίζεται το είδωλο των διαφόρων αντικειμένων που προσηλώνουμε το βλέμμα μας.

Στους χοίρους και γενικά στα θηλαστικά κατοικίδια ζώα, η περιοχή αυτή ονομάζεται κεντρική άλως και είναι το πλέον ευαίσθητο σημείο της οράσεως. Συγκεκριμένα οι χοίροι δεν διαθέτουν ωχρά κηλίδα, αντ' αυτού έχουν μια περιοχή με φωτοϋποδοχείς κωνία.¹³

Σχήμα 3.15: Η ωχρά κηλίδα στον βυθό του οφθαλμού όπως φαίνεται από οφθαλμοσκόπιο

3.17 Οπτικό Νεύρο

Το οπτικό νεύρο (Σχήμα 3.16) διαβιβάζει ηλεκτρικούς παλμούς από τον αμφιβληστροειδή στον εγκέφαλο. Η αρχή του οπτικού νεύρου (στο βάθος του ματιού) καθορίζεται από μια περιοχή στον αμφιβληστροειδή στρογγυλή και λευκωπή, που ονομάζεται οπτική θηλή ή οπτικός δίσκος. Από εδώ φαίνεται να ξεπροβάλουν τα κεντρικά αγγεία του αμφιβληστροειδούς. Παρότι η περιοχή αυτή αναφέρεται ως τυφλή, διότι δεν μετέχει στην οπτική λειτουργία και στο οπτικό πεδίο, μέσω αυτής

διέρχονται όλα τα οπτικά νεύρα. Η τυφλή περιοχή είναι δύσκολο να βρεθεί καθώς η όραση των δύο ματιών αλληλεπικαλύπτεται.

Η θηλή του οπτικού νεύρου στους χοίρους είναι ελαφρώς ωειδής και χρώματος υπόλευκου και η διάμετρός της ποικίλει ανάλογα με το είδος.

Σχήμα 3.16: Το οπτικό νεύρο μεταφέρει ηλεκτρικούς παλμούς από τον αμφιβληστροειδή στον εγκέφαλο.

3.18 Οφθαλμικοί Μύες

Οι μύες που κινούν τον βολβό του οφθαλμού καλούνται οφθαλμοκινητικοί. Ο βολβός κινείται γύρω από ένα σημείο που είναι το κέντρο περιστροφής του και βρίσκεται περίπου στο ύψος του ισημερινού. Οι οφθαλμοκινητικοί μύες είναι 6 και ομαδοποιούνται στους 4 ορθούς (έσω, έξω, άνω και κάτω ορθός) και τους 2 λοξούς (άνω και κάτω λοξός). Ο άνω ορθός συσπώμενος στρέφει το βολβό προς τα επάνω, ο κάτω ορθός προς τα κάτω, ο έξω ορθός φέρει το βολβό προς τα έξω, ενώ ο έσω ορθός στρέφει το βολβό προς τα μέσα (προς τη μύτη). Οι δύο λοξοί μύες βοηθούν στην κίνηση του βολβού προς όλες τις κατευθύνσεις. Εκτός όμως από την πρωτεύουσα αυτή ενέργεια, ευθύνονται και για δευτερεύουσες, όπως η απαγωγή (φέρνουν το μάτι προς τα έξω) και η κυκλοστροφή (δηλαδή μια στροφική κίνηση).

Αναφορές

- 1 Κολιόπουλος, Ι. Οφθαλμολογία. Εκδόσεις Γρ. Παρισσιάνος 1995;pp 12-19.
- 2 Adler's Physiology of the Eye: Clinical application. Edited by: Kaufman, P., Albert, Alm. Philadelphia Mosby Tenth Edition, 2003.
- 3 McMenamin, P., Steptoe, R. Normal anatomy of the aqueous humor outflow system in the domestic pig eye. J. Anat. 1991; 178:65-77.
- 4 Anatomy and Physiology of Anterior Segment. IACLE contact lens course Module 1:First Edition. [www.iacle.org/pdf/ programs/course_sample.pdf](http://www.iacle.org/pdf/programs/course_sample.pdf)
- 5 Liou, HL., L., Brennan, A. Anatomically accurate, finite model eye for optical modeling. J. Opt. Soc. Am. A. 1997;14:1684.
- 6 Olsen, T., Sanderson, S., Feng, X., Hubbard, W. Porcine sclera: Thickness and surface area. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002;43:2529-2532.
- 7 Mizuno, A., Hayashi, T., Tashibu, K., Maraishi, S., Kawauchi, K., Ozaki, Y., Near Infrared FT-Raman spectra of the rat brain tissues. Neurosci. Lett. 1992;141:47-52.
- 8 Zeng Y, Yang J, Huang K, et al. A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. J Biomech. 2001;34:533-537.
- 9 May C, Skorski L, Lutjen-Drecoll E. Innervation of the porcine ciliary muscle and outflow region. J Anat 2005;206:231-236.
- 10 Van Best, J., van Gessel, P., Autofluorescence and light scatter in the human lens as measured by fluorophotometer. Exp. Eye Res., 1989;49:511-513.
- 11 Charles, M. Dimensions of Human Eye Relevant to Radiation Protection. Phys. Med. Biol. 1975;20:202-218.
- 12 Ira Seth Solomon, M.D. Aqueous Humor Dynamics. The New York Eye and Ear Infirmary. Revised 2002.
- 13 Prince, Jack H., Anatomy and Histology of the eye and orbit in domestic animals . 1960. CC Thomas, publisher.

Η ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN ΣΤΗΝ ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΑ

4.1 Φασματοσκοπικές Τεχνικές στην Οφθαλμολογία

Ο οφθαλμός είναι όργανο διαπερατό στο φως. Λόγω της ιδιότητας αυτής της λειτουργίας του οφθαλμού αλλά και των ανατομικών του χαρακτηριστικών, πολλές διαγνωστικές τεχνικές που χρησιμοποιούν φως εφαρμόζονται σε μελέτες της οφθαλμολογίας. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες πραγματοποιούνται με επεμβατικό τρόπο. Η συλλογή δείγματος πραγματοποιείται με παρακέντηση ή βιοψία και η μελέτη για την σύσταση των οφθαλμικών ιστών ή χημικών ουσιών που περιέχονται στον οργανισμό, πραγματοποιείται *in-vitro*. Οι τεχνικές αυτές εκτός του ότι είναι χρονοβόρες διότι απαιτούν αρκετό χρόνο για τη λήψη του δείγματος και την ανάλυσή του, εγκυμονούν κινδύνους όπως είναι η μετάδοση ασθενειών και μολύνσεων.

Καθώς οι προοπτικές της χρήσης οπτικών διαγνωστικών τεχνικών όλο και διευρύνονται στον "ευαίσθητο" αυτόν τομέα της ιατρικής, κρίνεται αναγκαία η συλλογή πληροφοριών με μη επεμβατικό τρόπο. Οι τεχνικές αυτές παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις επεμβατικές τεχνικές, όπως η ελάττωση του κινδύνου διάδοσης μεταδοτικών ασθενειών, η πρόληψη μολύνσεων κατά τη διάρκεια των ερευνών καθώς επίσης και η εξασφάλιση ταχείας, έγκαιρης και εστιασμένης (χωρικά) συλλογής πληροφοριών.

Η εξέλιξη στον τομέα της οφθαλμολογίας, οδήγησε στη χρήση πολλών μη επεμβατικών τεχνικών για τη συλλογή πληροφοριών που αφορούν στην υγεία και στην ακεραιότητα των οφθαλμικών ιστών (π.χ. σχισμοειδής λυχνία). Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι η κατοπτρική μικροσκοπία (*specular microscopy*)¹ και η μικροσκοπία συνεστίασης (*confocal microscopy*)² που χρησιμοποιούνται κυρίως για τη μελέτη της τοπογραφίας του κερατοειδούς³ και για τη μέτρηση της καμπυλότητα

και του πάχους του. Άλλη μη επεμβατική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μελέτη των μεταβολών στη δυναμική των υγρών του οφθαλμού είναι η αγγειογραφία φθορισμού.⁴ Επιπλέον το ανακλασίμετρο (laser flare meter) δίνει πληροφορίες για τη ποσότητα των πρωτεϊνών στον εμπρόσθιο θάλαμο,⁵ η οπτική τομογραφία (optical coherence tomography) αναπαριστά εγκάρσια τις διάφορες δομές του οφθαλμού,⁶ το σαρωτικό οφθαλμοσκόπιο δέσμης laser παρέχει πληροφορίες για την ροή του αίματος στον αμφιβληστροειδή ή μεταβολές στο οπτικό νεύρο⁷ και το παχύμετρο αμφιβληστροειδή (retinal thickness analyzer) δίνει τη δυνατότητα μέτρησης του πάχους του και το μέγεθος της ωχράς κηλίδας.^{8,9} Ωστόσο, ποσοτικές πληροφορίες για τη χημική σύσταση των ιστών έδιναν μόνο οι επεμβατικές τεχνικές. Πρόσφατα η χρήση της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT) στην περίπτωση ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας και η φωτοπηξία με χρήση laser σε αμφιβληστροειδοπάθειες ή μετά από εγχείρηση, εγκαινίασαν το πεδίο για την ανάπτυξη, την εξέλιξη και την εφαρμογή μη επεμβατικών τεχνικών με σκοπό τη χημική ανάλυση ιστών του οφθαλμού και την εξαγωγή ποσοτικών αποτελεσμάτων.

Η αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα και δίνει πολύ σημαντικές πληροφορίες στον τομέα αυτό. Φως που προσπίπτει σε κάποια επιφάνεια μπορεί να απορροφηθεί, να ξαναεκπεμφθεί ή να σκεδαστεί.^{10,11,12} Σήμερα, ευρέως διαδεδομένες φασματοσκοπικές τεχνικές είναι η απορρόφηση υπερύθρου, η φασματοσκοπία φθορισμού και η φασματοσκοπία σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, μέθοδοι που έχουν βρει εφαρμογή στη μελέτη διάφορων ιστών.^{13,14,15}

Η φασματοσκοπία Raman είναι τεχνική ανελαστικής σκέδασης φωτός ικανή να ανιχνεύει και να χαρακτηρίζει μόρια σε ποικιλία υδατικών διαλυμάτων,¹⁶ απαιτεί τη χρήση ισχυρά μονοχρωματικής ακτινοβολίας και για τον λόγο αυτό η τεχνική διαδόθηκε μετά την ανακάλυψη των lasers το 1960 και την ανάπτυξη ευαίσθητων ανιχνευτών φωτός.¹⁷ Κάθε χρόνο μεγάλος αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών παρουσιάζονται με εφαρμογές της φασματοσκοπίας Raman στο πεδίο των βιοιατρικών επιστημών και όχι μόνο.^{18,19,20,21,22}

Στη βιοιατρική, η φασματοσκοπία Raman έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό βιολογικών μορίων με βάση τα χαρακτηριστικά δονητικά φάσματά τους.^{23,24,25,26} Τα τελευταία χρόνια, η αύξηση του ενδιαφέροντος για τη χρήση της φασματοσκοπίας Raman στο πεδίο της οφθαλμολογίας τροφοδοτεί τις προσδοκίες για μελλοντικές κλινικές εφαρμογές.²⁷

Σε παθολογικές καταστάσεις, τα διάφορα τμήματα του οφθαλμού μεταβάλλουν τη διαφάνεια τους καθώς και τη χημική τους σύσταση. Συγκεκριμένα:

- Κάποιο τραύμα ή υψηλή ενδοφλέβια πίεση είναι ασθένειες που επηρεάζουν τη σύσταση και την διαφάνεια του κερατοειδή.

- Η βιολογική σύσταση του υδατοειδούς υγρού έχει βρεθεί ότι μεταβάλλεται στην περίπτωση διαβήτη και ραγγοειδίτιδας.
 - Μεταβολές στο φακό εμφανίζονται λόγω ασθενειών όπως ο ηλικιακός καταρράκτης, τραύματα αλλά και λόγω της ύπαρξης φαρμακευτικών ουσιών (π.χ κορτικοστεροϊδών).
 - Το υαλώδες σώμα μεταβάλλει τη σύσταση του στην περίπτωση συστηματικών και οφθαλμικών παθήσεων όπως ο διαβήτης.
 - Η δομή του αμφιβληστροειδή χιτώνα μεταβάλλεται στην περίπτωση ασθενειών όπως η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, η υπέρταση (διαβητική η υπερτασική αμφιβληστροειδοπάθεια) καθώς και στην περίπτωση κάποιου τραυματισμού.
 - Μεταβολές στη χημική σύσταση των προαναφερθέντων οφθαλμικών ιστών έχουν παρατηρηθεί και στην περίπτωση προσβολής τους από κάποιο βακτήριο ή ιό.
- Πολλές από τις παραπάνω μεταβολές μπορούν να μελετηθούν με φασματοσκοπία Raman.

4.2 Τεχνικές εξέλιξης της φασματοσκοπίας Raman

Μετά την ανακάλυψη του φαινομένου Raman πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω έρευνες για την ενίσχυση της πιθανότητας του φαινομένου και την ικανοποιητική οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, με σκοπό τη διεύρυνση των εφαρμογών του. Για παράδειγμα η φασματοσκοπία Raman συντονισμού (resonance Raman) που τυγχάνει όταν η συχνότητα διέγερσης προσεγγίζει ή έχει την ίδια τιμή με διεγερμένη ηλεκτρονιακή στάθμη του μορίου καθώς και η ROA (Raman Optical Activity) είναι τεχνικές πολύ ευαίσθητες που μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τις χειρομορφικές ιδιότητες των μορίων.^{28,29} Επιπλέον η ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων όπως π.χ. η μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares) και κατάλληλων λογισμικών, όπως η ανάλυση μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform Raman) ενισχύουν και διευρύνουν την ανιχνευτική ικανότητα της φασματοσκοπίας Raman και συμβάλλουν ουσιαστικά στην εξέλιξη της τεχνικής.^{27,30}

Τέλος για την ενίσχυση του φαινομένου έχει χρησιμοποιηθεί και η μέθοδος της επισήμανσης βιολογικών μορίων με μόρια υψηλής ενεργότητας Raman.^{31,32} Η μέθοδος αυτή είναι πολύ χρήσιμη ειδικά σε περιπτώσεις όπου μικρής ισχύος

διεγείρουσα ακτινοβολία είναι επιβεβλημένη για την αποφυγή τραυματισμού ευαίσθητων υλικών όπως π.χ οφθαλμικών ιστών.

Ο ακρογωνιαίος λίθος στην ραγδαία εξέλιξη της τεχνικής Raman στάθηκε η ανάπτυξη των lasers, που αποτέλεσαν ένα είδος επανάστασης στον τρόπο διέγερσης των μορίων.^{33,34} Πριν τη ανάπτυξη των lasers, η λήψη φασμάτων Raman ήταν μια χρονοβόρα διαδικασία (μέσος πειραματικός χρόνος 24 ώρες) και απαιτούσε μεγάλο όγκο δειγμάτων. Μετά την χρήση τους όμως η λήψη φασμάτων είναι ταχεία και απαιτείται ελάχιστος όγκος δοκιμίων που μπορεί να είναι αέρια, υγρά ή στερεά.³⁵ Για τη λήψη ενός φάσματος Raman, η χρήση μονοχρωματικής πηγής φωτός είναι πλέον επιβεβλημένη και όπως είναι γνωστό υπάρχει άμεση σχέση της έντασης του φαινομένου Raman, με το μήκος κύματος της μονοχρωματικής ακτινοβολία που χρησιμοποιείται ($I = \alpha/\lambda^4$).

Περαιτέρω βελτίωση του φαινομένου πραγματοποιείται με την συνεχή αύξηση της ευαισθησίας των συστημάτων φασματοσκοπίας Raman. Ο χρόνο λήψης φασμάτων έχει ελαττωθεί σημαντικά μέχρι και 1 μ s (microsecond), χάρη στην υψηλή κβαντική απόδοση (η πιθανότητα ενός φωτονίου να παράγει ένα μεμονωμένο ελεύθερο ηλεκτρόνιο στο εικονοστοιχείο του ανιχνευτή) των ανιχνευτών CCD (Charge Coupled Device).¹⁵ Ανιχνευτές αυτού του είδους είναι ευαίσθητοι στα 200-1100 nm με τη μέγιστη κβαντική απόδοση στην περιοχή 300-800 nm. Η ανάπτυξη ανιχνευτών CCD με τη μέγιστη κβαντική απόδοση γύρω στα 900 nm παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς τα φάσματα Raman σε αυτήν την περιοχή απομακρύνονται από την περιοχή φθορισμού των βιολογικών δειγμάτων βελτιώνοντας την ποιότητα των φασμάτων.³⁶ Ωστόσο, λαμβάνοντας υπ' όψη το γεγονός ότι η ένταση του φαινομένου Raman είναι αντιστρόφως ανάλογη της τέταρτης δύναμης του μήκους κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας, επιλέγοντας laser μεγάλου μήκους κύματος μειώνεται αυτόματα η ένταση της σκέδαση Raman. Δίνεται λοιπόν έμφαση στη λεπτή ισορροπία μεταξύ της πηγής διέγερσης και του ανιχνευτή για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων.

Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί συστήματα φασματοσκοπίας Raman με διάταξη κατεύθυνσης της δέσμης του laser βασισμένη σε οπτικές ίνες. Τέτοια συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη π.χ. χημικών διαδικασιών μέσα σε φούρνο.³⁷ Εν τούτοις, για τη λήψη φασμάτων Raman από ζωντανά κύτταρα ή ιστούς, είναι βασικό να ελέγχεται απόλυτα ο χώρος εστίασης της δέσμης στο δείγμα για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση του εν λόγω ιστού ή η λήψη σήματος φθορισμού από παρακείμενη περιοχή του δείγματος.^{38,39}

Άλλος παράγοντας που επηρεάζει την ένταση του σήματος Raman είναι ο τρόπος με τον οποίο απορρίπτεται η σκέδαση Reyleigh, πριν τα φωτόνια της σκέδασης

Raman οδηγούνται στο φασματοφωτόμετρο. Στα συστήματα με τριπλό grating, τα δύο πρώτα grating είναι δυνατό να διαταχθούν κατά τρόπο ώστε τα φωτόνια της σκέδασης Reyleigh να απορρίπτονται οπτομηχανικά. Ωστόσο, το μειονέκτημα αυτών των συστημάτων είναι ότι η ένταση του σήματος λόγω πολλαπλάσιων οπτικών στοιχείων μειώνεται κατά 87% περίπου. Στα φασματοφωτόμετρα με διάταξη απλού φασματογράφου (1 grating), το σήμα μειώνεται κατά 50% περίπου. Σε αυτήν την περίπτωση η απόρριψη του ισχυρού σήματος της Reyleigh ακτινοβολίας επιτυγχάνεται με τη χρήση φίλτρων όπως Chevron, κρυσταλλικά κολλοειδή φίλτρα (crystalline colloidal filters) και φίλτρα notch.^{40,41,42}

4.3 Εφαρμογές της Φασματοσκοπίας Raman στην Βιοϊατρική

Με τέτοια ραγδαία εξέλιξη της μεθόδου στο υλικοτεχνικό τομέα ήταν αναπόφευκτο το πεδίο εφαρμογών της φασματοσκοπίας Raman να διευρυνθεί σημαντικά. Με τη φασματοσκοπία Raman είναι δυνατόν να αναλυθούν ποιοτικά και ποσοτικά οργανικά και ανόργανα υγρά, στερεά και αέρια.³³ Μπορούν να μελετηθούν μικροσκοπικά δείγματα όπως χρωμοσώματα και μόρια πρωτεϊνών.³⁶ Καρκινικά κύτταρα έχουν μελετηθεί εκτενώς για την ανίχνευση και την γεωμετρία πεπτιδίων, δισουλφιδικών δεσμών, σουλφυδρυλομάδων (-SH) καθώς και μεθιονινικών υπολειμμάτων.^{43,44,45,46} Επίσης οι δονήσεις έκτασης των αρωματικών δακτυλίων των ομάδων της φαινυλαλανίνης, της τρυπτοφάνης, της τυροσίνης και της ιστιδίνης (αμινοξέων των πρωτεϊνών) παρουσιάζουν υψηλή ενεργότητα Raman με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ανίχνευσή τους σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Επιπλέον είναι δυνατή και η μελέτη της διαμόρφωσης των πρωτεϊνικών μορίων του DNA όπου βρέθηκε ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ των φασμάτων του DNA στη γηγενή μορφή του από τη μορφή του μέσα σε υδατικό περιβάλλον (relaxed conformation).⁴⁷ Επιπρόσθετα, με την τεχνική FT-Raman έχουν συγκριθεί παθολογικοί και φυσιολογικοί ιστοί.⁴⁸ Πολύ ενδιαφέρον παράδειγμα είναι η χρήση της μεθόδου για την μελέτη ιστού μικρών διαστάσεων (16,2 mg) που άνηκε σε Νεολιθικό άνθρωπο και βρέθηκε στους παγετώνες στα σύνορα Ιταλίας- Αυστρίας το 1991.⁴⁹ Από τις πιο πρόσφατες εφαρμογές είναι η παρακολούθηση αναισθητικών και μη αέριων στα χειρουργεία.⁵⁰ Τέλος, εφαρμογή της φασματοσκοπίας Raman, έχει αναφερθεί και στον τομέα της ενζυμολογίας.⁵¹

4.4 Εφαρμογές της Φασματοσκοπίας Raman στην Οφθαλμολογία

Στην οφθαλμολογία, η εφαρμογή φασματοσκοπίας Raman περιορίζεται, διότι απαιτεί φωτεινή ενέργεια υψηλής ισχύος, η οποία μπορεί να βλάψει τους ευαίσθητους οφθαλμικούς ιστούς. Εν τούτοις, με την ανάπτυξη κατάλληλων οπτικών συστημάτων σε συνδυασμό με ανιχνευτές υψηλής κβαντικής απόδοσης ανοίγει ο δρόμος ακόμη και για *in vivo* εφαρμογές.

Για τη συλλογή πληροφοριών από τον οφθαλμό με φασματοσκοπία Raman, εφαρμόζονται δύο γεωμετρίες συλλογής του σκεδαζόμενου φωτός, 180° και 90° (Σχήμα 4.1α και 4.1β).

Μέχρι στιγμής η γεωμετρία που χρησιμοποιείται κατά κόρον είναι της οπισθοσκέδασης (180°). Βασικό πλεονέκτημα της γεωμετρίας αυτής είναι η χρήση ενός μόνο φακού, τόσο για την εστίαση της δέσμης στο δείγμα όσο και για την συλλογή του σκεδαζόμενου φωτός, αίροντας την δυσκολία ευθυγράμμισης μεταξύ των φακών πρόσπτωσης και συλλογής. Τυπικά φάσματα Raman στη συγκεκριμένη γεωμετρία έχουν ληφθεί από οφθαλμό ποντικού, *in vivo*.^{37,52} Πολύ σημαντική εφαρμογή επίσης, είναι η ανίχνευση με μη επεμβατικό τρόπο των συγκεντρώσεων διάφορων φαρμακευτικών και φυσιολογικών ουσιών που περιέχονται στο υαλώδες σώμα και στο υδατοειδές υγρό.^{53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63}

Στην γεωμετρία σκέδασης 90° , με κατάλληλο τρόπο φωτισμού μπορεί να απομονωθεί και να μελετηθεί ένα συγκεκριμένο τμήμα του οφθαλμού όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της σχισμοειδούς λυχνίας. Οι περιορισμοί στην εύρεση της βέλτιστης γωνίας συλλογής εισέρχονται από την εναλλαγή των δεικτών διάθλασης μεταξύ του αέρα και του κερατοειδούς και του υδατοειδούς υγρού, από τη καμπυλότητα του κερατοειδούς και του μεγέθους της κόρης. Επιπλέον για λεπτομερή μελέτη του φακού ή του υαλώδους σώματος απαιτείται η διαστολή της κόρης του οφθαλμού. Οι κλινικές εφαρμογές της συγκεκριμένης τεχνικής είναι σαφώς περιορισμένες σε σχέση με τις μελέτες οπισθοσκέδασης, λόγω των προηγούμενων προβλημάτων. Ωστόσο οι πρώτες προσπάθειες έχουν γίνει λόγω ενός βασικού της πλεονεκτήματος: με κατάλληλο τρόπο πρόσπτωσης της δέσμης του laser στην κυρτή επιφάνεια του κερατοειδούς, η δέσμη εισέρχεται στον πρόσθιο θάλαμο με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται η αλληλεπίδρασή της με γειτονικούς, ευαίσθητους ιστούς του ματιού (φακό, αμφιβληστροειδή). Συγκεκριμένα έχει περιγραφεί διάταξη για τη μελέτη των χαρακτηριστικών των βιολογικών ιστών του οφθαλμού όπου η συλλογή των φωτονίων γίνεται σε διαφορετική διεύθυνση από την διεύθυνση

πρόσπτωσης.⁶⁴ Επίσης στην ίδια γεωμετρία έχουν γίνει μη επεμβατικές μετρήσεις των επιπέδων της γλυκόζης χρησιμοποιώντας την τεχνική SRS (stimulated Raman Scattering) όπου η δέσμη του laser εισέρχεται στον οφθαλμό από σημείο της περιφέρειας του κερατοειδούς, διέρχεται μέσα από τον πρόσθιο θάλαμο και εξέρχεται από αντιδιαμετρικό σημείο της περιφέρειας του κερατοειδή.⁶⁵

Σχήμα 4.1: Φασματοσκοπία σκεδασης Raman σε γεωμετρία 180° (α) και 90° (β).

Παρακάτω αναφέρονται μελέτες που έχουν γίνει με φασματοσκοπία Raman στον τομέα της οφθαλμολογίας σε συγκεκριμένους ιστούς (κερατοειδή, σκληρό, υδατοειδές υγρό, φακό, υαλώδες σώμα και αμφιβληστροειδή).

4.4.1 Κερατοειδής και σκληρός

Έχει μελετηθεί φασματοσκοπικά το κολλαγόνο του κερατοειδούς από οφθαλμό γάτας μετά από γήρανση, θέρμανση και ξήρανση.⁶⁶ Με φασματοσκοπία FT-Raman έχουν μελετηθεί τα χαρακτηριστικά του κολλαγόνου του κερατοειδή και του σκληρού σε οφθαλμούς ποντικών in-vitro. Έχει προταθεί επίσης η χρησιμοποίηση της τεχνικής micro Raman για τον έλεγχο της ποιότητας των δειγμάτων στις τράπεζες κερατοειδούς.⁶⁷

Πολλές μελέτες έχουν γίνει και στο τομέα της φαρμακοκινητικής. Η δραστική ουσία δορζολαμίδη που χρησιμοποιείται ενάντια στο γλαύκωμα, χορηγήθηκε σε οφθαλμούς ποντικών in vivo, για τη μελέτη της κινητικής του φαρμάκου μέσω του κερατοειδούς.⁶⁸ Επίσης έχει μελετηθεί η ενυδάτωση του κερατοειδούς σε μοντέλο οφθαλμού αλλά και in vivo σε οφθαλμούς ποντικών. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τον λόγο των εντάσεων των κορυφών CH/OH που οφείλονται σε δονήσεις των μορίων των πρωτεϊνών και του νερού αντίστοιχα.⁶⁹ Η συγκεκριμένη μελέτη εφαρμόσθηκε με επιτυχία και σε τυφλούς ασθενείς, in-vivo.⁷⁰

4.4.2 Υδατοειδές Υγρό

Τα μόρια των βιολογικών ουσιών σε μοντέλο αλλά και δείγμα πραγματικού υδατοειδούς υγρού, σκεδάζουν ανεξάρτητα το ένα από την παρουσία του άλλου και η ένταση του σήματος Raman είναι γραμμικά εξαρτημένη από τη συγκέντρωσή τους.⁷¹ Οι Wicksted et al. έδειξαν ότι με τη χρήση ανιχνευτών CCD, μπορούν να διεξαχθούν μετρήσεις σε υδατοειδές ανθρώπου και κουνελιών in-vitro, χρησιμοποιώντας μικρότερη ισχύ και λιγότερο χρόνο έκθεσης.⁷² Επίσης οι Ernest et al. έχουν προτείνει οπτική τεχνική όπου η σκέδαση Raman χρησιμοποιείται για την ανίχνευση βιολογικών μορίων στο υδατοειδές υγρό, in-vivo.⁷³

4.4.3 Φακός

Μεταβολές στη σύσταση των πρωτεϊνών και του νερού κυρίως στις μεγαλύτερες ηλικίες έχουν ως αποτέλεσμα την αδιαφάνεια του, γνωστή ως καταρράκτη. Η ασθένεια αυτή που θεωρείται η πρώτη αιτία τύφλωσης στον κόσμο έχει μελετηθεί διεξοδικά με φασματοσκοπία Raman.^{74,75}

Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, ο φακός ενδείκνυται για μελέτη με φασματοσκοπία Raman.^{76,77,78} Ωστόσο, ο ισχυρός φθορισμός που προέρχεται κυρίως από καταρακτικούς φακούς αποτελεί τροχοπέδη και απαιτείται περαιτέρω προσπάθεια για την αποφυγή αυτών των «ανεπιθύμητων» φωτονίων. Ωστόσο φάσματα Raman έχουν ληφθεί από κατατμημένους φακούς που ανήκαν σε ασθενείς με καταρράκτη⁷⁹ αλλά και από ομογενοποιημένους φακούς με κατάλληλη προετοιμασία των δειγμάτων.^{80,81} Τέλος, ο φθορισμός μπορεί να περιοριστεί με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-Raman στο κοντινό υπέρυθρο. Η φασματοσκοπία Raman είναι η πιο διαδεδομένη μη επεμβατική τεχνική στη μελέτη του φακού που δίνει πληροφορίες για τη δομή των πρωτεϊνών,^{82,83} των αμινοξέων (Try, Trp, Phe),⁸⁴ καθώς και των θειικών δεσμών (-SH, S-S).^{85,86,87,88}

4.4.4 Υαλώδες Σώμα

Συγκριτικά με το φακό, το υαλώδες σώμα περιέχει πολύ μικρότερη συγκέντρωση βιολογικών μορίων και για τον λόγο αυτό δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Βρίσκεται πίσω από το φακό και μπροστά από τον αμφιβληστροειδή και η θέση του καθιστά πολύ δύσκολη την μελέτη του με φασματοσκοπικές τεχνικές. Έχει πραγματοποιηθεί η λήψη φασμάτων κατά την εγχείρηση ασθενών (υαλοεκτομή) ώστε να μελετηθούν οι ιστοί και οι μοριακές δομές του.⁸⁹ Επιπλέον, έχει μελετηθεί και με ημιεπεμβατικές μεθόδους, χρησιμοποιώντας οπτικές ίνες για την καθοδήγηση της δέσμης μέσα στον οφθαλμό.⁹⁰

4.4.5 Αμφιβληστροειδής

Οι ιστοί του αμφιβληστροειδή έχουν μελετηθεί φασματοσκοπικά *in vitro* με σκοπό την αναγνώριση σύγχρονων ασθενειών που επηρεάζουν την οπτική ικανότητα.⁹¹ Πρόσφατες μελέτες της ωχράς κηλίδας έχουν επιφέρει αξιόλογα αποτελέσματα που δίνουν βάσιμες ελπίδες για την εφαρμογή της τεχνικής στην κατανόηση, αντιμετώπιση και διάγνωση της εκφυλισής της.^{92,93}

4.5 Ασφαλής χρήση των lasers στον οφθαλμό.

Για να χρησιμοποιηθεί η φασματοσκοπία Raman σε *in-vivo* εφαρμογές θα πρέπει να τηρηθούν όλοι οι κανόνες ασφαλείας για τη χρήση των lasers στον οφθαλμό. Όταν βιολογικός ιστός εκτίθεται σε ακτινοβολία laser, η θερμοκρασία του μπορεί να αυξηθεί τόσο ώστε να βλάψει τον ιστό ή μπορεί να προκληθούν φωτοχημικές αντιδράσεις με επιβλαβή αποτελέσματα. Ο οφθαλμός είναι ο πιο ευπαθής ιστός στην έκθεση σε ακτινοβολία laser. Το μέγεθος της βλάβης που προκαλείται εξαρτάται από το μήκος κύματος, την ισχύ της δέσμης και το χρόνο έκθεσης.

Τα μήκη κύματος από 400 μέχρι 1400 nm διαπερνούν τον κερατοειδή και εστιάζονται μέσω του φακού στην επιφάνεια του αμφιβληστροειδή με μεγέθυνση πάνω από 100.000 φορές. Laser με μήκη κύματος σε αυτή την περιοχή είναι τα πιο επικίνδυνα για το μάτι διότι είναι δυνατό να προκαλέσουν ανεπανόρθωτες βλάβες στον αμφιβληστροειδή που είναι από τους πιο ευπαθείς ιστούς του οφθαλμού.

Lasers με μήκος κύματος εκτός της ορατής περιοχής απορροφούν από τον κερατοειδή ή τον φακό. Ο κερατοειδής και ο φακός είναι γενικότερα ιστοί πιο ανθεκτικοί στο φως από τον αμφιβληστροειδή. Ακτινοβολία με μήκος κύματος 315-400 nm (UVA) και 100-280 nm (UVC) απορροφείται από τον κερατοειδή. Ακτινοβολία με μήκος κύματος 315-400 nm (UVA) απορροφείται κυρίως από το φακό. Ενώ ακτινοβολία στην περιοχή από 1400 (FIR) μέχρι και την περιοχή των μικροκυμάτων προκαλεί βλάβες στον κερατοειδή.

Το σχήμα 4.2 απεικονίζει τα μήκη κύματος που απορροφούνται και διαπερνούν τους διάφορους ιστούς του οφθαλμού.

OCULAR ABSORPTION SITE vs WAVELENGTH

Σχήμα 4.2: Απορρόφηση των ιστών του οφθαλμού στα διάφορα μήκη κύματος.

Τα μέγιστα επιτρεπτά όρια για απευθείας έκθεση του εσωτερικού του ματιού στη δέσμη του laser (intrabeam viewing) παρουσιάζονται στον πίνακα II.I για μήκη κύματος 315-400 και 400-700nm.

Πίνακας II.I: Τα μέγιστα επιτρεπτά όρια έκθεσης του εσωτερικού του οφθαλμού απευθείας στη δέσμη του laser.

Wavelength (nm)	Exposure duration (s)	(MPE) Maximum Permissible Exposure
400-700	$18 \cdot 10^{-6}$ to 10	$1,8t^{3/4} \cdot 10^{-3} \text{ J/cm}^2$
315-400	10^{-9} to 10	$0,56t^{1/4} \text{ J/cm}^2$

Όταν όμως ο οφθαλμός δεν εκτίθεται κοιτώντας απευθείας τη δέσμη, τα όρια αυτά μεταβάλλονται ανάλογα με τον ιστό στον οποίο προσπίπτει η δέσμη. Για παράδειγμα τα όρια αντοχής του κερατοειδούς σε ακτινοβολία laser αργού (514,5nm) έχει βρεθεί ότι είναι της τάξης μερικών χιλιάδων mJ/mm^2 (2547 mJ/mm^2 , 8000 mJ/mm^2).^{94,95}

Δεδομένων των πληροφοριών που μπορεί να δώσει η φασματοσκοπία Raman στην οφθαλμολογία και των μελλοντικών προοπτικών της, αναδεικνύεται η σημασία της για τις βιοιατρικές επιστήμες, καθώς ανταποκρίνεται στις σύγχρονες απαιτήσεις για μη επεμβατική και αβλαβή μελέτη βιολογικών συστημάτων.

Αναφορές

- 1 Sugar, A., Clinical Specular Microscopy. *Surv Ophthalmol.* 1979;24:21-32.
- 2 Minsky, M., Memoir on Inventing the confocal scanning microscope. *Scanning.* 1988;10:128-138.
- 3 Jongsma, F., de Brabander, J., Henrikse, F., Review and classification of corneal topographers. *Lasers Med. Sci.* 1999;14:2-19.
- 4 Novothy, H., Alvis, D., A method of photographing fluorescence in circulating blood of the human retina. *Circulation.* 1961;24:82.
- 5 Sawa, M., Clinical application of laser flare-cell meter. *Jpn. J. Ophthalmol.* 1990;34:346-63.
- 6 Huang, D., Swanson, E., Lin, C., Optical coherence tomography. *Science.* 1991;254:1178-81.
- 7 Webb, R., Scanning laser ophthalmoscope. *IEEE Transact. Biomed. Eng.* 1981;28:488-492.
- 8 Maier, P., Funk, J. Diagnostic Accuracy of the retinal thickness analyzer: Differentiation between normal eye and eyes with glaucoma or macular pathologies. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2006;march 8 (Epub. Ahead of print)
- 9 Montero, J., Ruiz- Moreno, J. Macular Thickness in patients with choroidal neovasculation determined by RTA and OCT3 comparative results. *Eye* 2005;19:72-76
- 10 Ditchburn, R., Light. Mineola, NY: Dover Publications, 1991.
- 11 Skoog, D., Leary, J., Principles of Instrumental Analysis, 4 edn, Orlando, FL:Saunders College Publishing, 1992.
- 12 Ramaseshan, S., Scientific papers of C.V. Raman, Vol.1: Scattering of Light. Bangalore: Indian Academy of Sciences, 1988.
- 13 Masters, B., Noninvasive Diagnostic Techniques in Ophthalmology. New York. Springer-Verlag, 1990.
- 14 McCully, K., Mancini, D., Levine, S., Nuclear magnetic resonance spectroscopy: it's role in providing valuable insight into diverse clinical problems. *Chest.* 1999;116:1434-1441.
- 15 De Graaf, R., In vivo NMR spectroscopy. Chichester: John Wiley, 1998.
- 16 Raman, C., Krishnan, K., A new type of secondary radiation. *Nature.* 1928; 121:105.
- 17 Boyle, W., Smith, G., Charge coupled semiconductor devices. *Bell Systems Technical Journal.* 1970;49:587-593.
- 18 Gerrard, D., Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* 1994;66:547R-57R.
- 19 Lyon, L., Ketaing, C., Fox, A., Baker, B., He, L., Nicewarner, S., Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* 1998;70:341R-61R.
- 20 Mulvaney, S., Ketaing, C., Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* 2000;72:145R-57R.
- 21 Carey, P., Raman spectroscopy, the sleeping giant in structural biology, awakes. *J. Biol. Chem.* 1999;274:26625-26628.
- 22 Hanlon, E., Manoharan, R., Koo, T., Shafer, K., Motz, J., Fitzmaurice, M., Prospects for in vivo Raman Spectroscopy. *Phys. Med. Biol.* 2000;45:R1-59.
- 23 Borchert M, Storrie-Lombardi M, Lambert J. A noninvasive glucose monitor: preliminary results in rabbits. *Diabetes Technol Ther* 1999 ;1:145-151.
- 24 Caspers P, Lucassen G, Carter E, Bruining H, Puppels G. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: Noninvasive determination of molecular concentration profiles. *J Invest Dermatol* 2001;116:434-442.

- 25 Bauer N, Wicksted J, Jongsma F, March W, Hendrikse F, Motamedi M. Non-invasive assesment of the hydration gradient across the cornea using confocal Raman spectroscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:831-835.
- 26 Koo T, Berger A, Itzkan I, Horowitz G, Feld M. Reagentless blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy. *Diabetes Technol Ther* 1999;1:153-157.
- 27 Erckens R, Jongsma F, Wicksted J, Hendrikse F, March W, Motamedi M. Raman Spectroscopy in ophthalmology: From experimental tool to application in vivo. *Lasers Med Sci (Review)* 2001;16:236-252.
- 28 Carey, P., Resonance Raman Spectroscopy in biochemistry and biology. *Q. Rev. Biophys.* 1978;11:309-370.
- 29 Barron, L., Hecht, L., Bell, A., Raman optical activity: an incisive new probe of the structure and dynamics of biomolecules. *Sci. Prog.* 1998;81:17-34.
- 30 Chase B. A new generation of Raman Instrumentation. *Appl. Spetrosc.* 1994; 48(7):14A-19A.
- 31 Sijtsema, N., Duindam, J., Puppels, G., Otto, C., Greve, J., Imaging with extrinsic Raman labels. *Appl. Spectrosc.* 1996;50:545-551.
- 32 Carey, P., Resonance Raman labels and Raman labels. *J. Raman Spectrosc.* 1998;29:861-868.
- 33 Evans, T., Application of lasers to chemical problems. *Techniques o Chemistry Vol. XVII*, New York, John Wiley, 1982.
- 34 Hilinski, E., Rentzepis, P., Biological application of picosecond spectroscopy. *Nature* 1983;302:481-487.
- 35 Gardiner, D., Graves, P., *Practical Raman Spectroscopy*, Berlin: Springer- Verlag, 1989.
- 36 Puppels, G., Olminkhof, J., Segers-Nolten, G., Otto, C., de Mul, F., Greve, J., Laser Irradiation and Raman spectroscopy of single living cells and chromosomes: sample degradation occurs with 514.5nm but not with 660 nm laser light. *Exp. Cell Res.* 1991;195:361-367.
- 37 Schoen, C., Cooney, T., Sharma, S., Carey, D., Long fiber optic remote Raman probe for detection nad identification of weak scatteres. *Appl. Optics.* 1992;31:7707-7715.
- 38 Puppels, G., de Mul, F., Otto, C., Greve, J., Robert-Nicoud, M., Arndt-Jovin, D., Studing single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy. *Nature.* 1990;347:301-303.
- 39 Jongsma, F., Erckens, R., Wicksted, J., Bauer, N., Hendrikse, F., March, W., Confocal Raman spectroscopy system for noncontact scanning of ocular tissues: an in vitro study. *Optical Engineering.* 1997;36:3193-3199.
- 40 Battey, D., Slater, J., Wludyka, R., Owen, H., Pallister, D., Morris, M., Axial transmissive f/1.8 imaging Raman spectrograph with volume-phase holographic filterand grating. *Appl. Spectrosc.* 1993;47:1913-1919.
- 41 Kim, M., Owen, H., Carey, P., High-performance Raman spectroscopic system based on single spectrograph, CCD, notch filters, and Kr+ laser ranging from the near-IR to near-UV regions. *Appl. Spectrosc.* 1993;47:1780-1783.
- 42 Puppels, G., de Grauw, C., te Plate, M., Greve, J., Chevron-type dielectric filter set for efficient narrow- band laser line rejection in Raman microspectrometers. *Appl. Spectrosc.* 1994;48:1399-1402.
- 43 Grasselli, G., Bulkin, B., *Analytical Raman Spectroscopy*, Chemical Analysis series, vol 114. New York: John Wiley, 1991.
- 44 Lord, R., Yu, N., Laser-excited Raman Spectroscopy of biomolecules I. *J. Mol. Biol.* 1970;50:509-524..

- 45 Lord, R., Yu, N., Laser-excited Raman Spectroscopy of biomolecules II. *J. Mol. Biol.* 1970;51:203-213.
- 46 Lord, R., Strategy and tactics in the Raman spectroscopy of biomolecules. *Appl. Spectrosc.* 1977;31:187-194.
- 47 Peticolas, W., Pattapoff, T., Thomas, G., Postlewait, J., Powell, J., Laser Raman microscopy of chromosomes in living eukaryotic cells: DNA Polymorphism in vivo. *J. Raman Spectrosc.* 1996;27:571-578.
- 48 Kellers, S., Schrader, B., Hoffmann, A., Schrader, W., Metz, K., Dudach, W., Application of near infrared-Fourier transform Raman spectroscopy in medical research. *J. Raman Spectrosc.* 1994;25:663-671
- 49 Williams, A., Edwards, H., Barry, B., The Iceman molecular structure of 5200-year-old skin characterized by Raman Spectroscopy and electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995;1246:98-105.
- 50 Westenskow, D., Smith, K., Coleman, D., Gregonis, D., van Wageningen, R., Clinical evaluation of a Raman scattering multiple gas analyzer for the operating room. *Anesthesiology.* 1989;70:350-355.
- 51 Carey, P., Raman spectroscopy in enzymology: the first 25 years. *J. Raman Spectrosc.* 1998;29:7-14.
- 52 Williams, A., Edwards, H., Barry, B., The Iceman molecular structure of 5200-year-old skin characterized by Raman Spectroscopy and electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995;1246:98-105.
- 53 Bauer N, Motamedi M, Wicksted J, March W, Webers C, Hendrikse F. Non-invasive assessment of ocular pharmacokinetics using Raman spectroscopy. *J Ocul Pharmacol Ther* 1999;15:123-134.
- 54 Hosseini K, March W, Jongsma F, Hendrikse F, Motamedi M. Noninvasive detection of ganciclovir in ocular tissue by Raman spectroscopy: implication for monitoring of drug release. *J Ocul Pharmacol Ther* 2002;18:277-285.
- 55 Hosseini K, Jongsma F, Hendrikse F, Motamedi M. Non-invasive monitoring of commonly used intraocular drugs against endophthalmitis by Raman spectroscopy. *Lasers Surg Med* 2003;32:265-270.
- 56 Katz A, Kruger E, Minko G, Liu C, Rosen R, Alfano R. Detection of glutamate in the eye by Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 2003;8:167-172.
- 57 Lambert J, Pelletier C, Borchert M. Glucose determination in human aqueous humor with Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 2005;10:031110.
- 58 Davies P, Duncan G, Pynsent-Arber D, Lucas V. Aqueous humor glucose concentration in cataract patients and its effect on the lens. *Exp Eye Res* 1984;39:605-609.
- 59 Lambert J, Morookian J, Sirk S, Borchert M. Measurement of aqueous glucose in a model anterior chamber using Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc* 2002;33:524-529.
- 60 Wicksted J, Erckens R, Motamedi M, March W. Raman spectroscopy studies of metabolic concentration in aqueous solution and aqueous humor specimens. *Appl Spectr* 1995;49:987-993.
- 61 Pelletier C, Lambert J, Borchert M. Determination of glucose in human aqueous humor using Raman spectroscopy and designed-solution calibration. *Appl Spectrosc* 2005;59:1024-1031.
- 62 Steffes P. Laser-based measurement of glucose in the ocular aqueous humor: an efficacious portal for determination of serum glucose levels. *Diabetes Technol Ther* 1999;1:129-133.
- 63 Lambert J, Storrie-Lombardi M, Borchert M. Measurement of physiologic glucose levels using Raman spectroscopy in rabbit aqueous humor model. *Leos Newsletter* 1998;12:19-22.

- 64 Samuels, M., Patterson, S., Eppstein, J., Yu, N., Bursell, S., Apparatus and method for measuring characteristics of biological tissues and similar materials. USA Patent Number 5,582,168, Dec. 10, 1996.
- 65 Tarr, R., Steffes, P., Non-invasive blood glucose measurement system and method using stimulated Raman spectroscopy. USA Patent Number 5,243,983, Sep. 14, 1993.
- 66 Gohee, S., Lis, L., Kauffman, J., Raman spectroscopy of intact feline corneal collagen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1978;536:197-204.
- 67 Siew, D., Clover, G., Cooney, R., Wiggins, P., Micro-Raman spectroscopic study of organ cultured corneae. *J. Raman Spectrosc.* 1995;26:3-8.
- 68 Bauer, N., Motamedi, M., Wicksted, J., March, W., Webers, C., Hendrikse, F., Motamedi, M., Non contact assessment of ocular pharmacokinetics using confocal Raman spectroscopy. *J. Ocular Pharm. Ther.* 1999;15:123-134.
- 69 Bauer, N., Hendrikse, F., March, W., Hendrikse, F., Motamedi, M., Noninvasive assessment of the hydration gradient across the cornea using confocal Raman spectroscopy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998;39:831.
- 70 Bauer, N., Hendrikse, F., March, W., In vivo confocal Raman spectroscopy of the human cornea. *Cornea.* 1999;18:483-488.
- 71 Wang, S., Hasty, C., Watson, P., Wicksted, J., Stith, R., March, W., Analysis of metabolites in aqueous solution by using laser Raman spectroscopy. *Appl. Opt.* 1993;49:987-993.
- 72 Wicksted, J., Erckens, R., Motamedi, M., March, W., Raman spectroscopy studies of metabolic concentrations in aqueous solutions and aqueous humor specimens. *Appl. Spectrosc.* 1995;49:987-993.
- 73 Erckens, R., Wicksted, J., March, W., Motamedi, M. Raman spectroscopy for non-invasive characterization of ocular tissues: Potential for detection of biological molecules. *J. Raman Spectrosc.* 1997;28:293-299.
- 74 Schachar, R., Solin, S., The microscopic protein structure of the lens with a theory for cataract formation as determined by Raman spectroscopy of intact bovine lenses. *Invest. Ophthalmol.* 1975;14:380-396.
- 75 Shun-Shin, G., Vrensen, G., Brown, N., Willekens, B., Smeets, M. Morphologic characteristic and chemical composition of cataract. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993;34:3489-3496.
- 76 Yu, N., East, E., Laser Raman spectroscopic studies of ocular lens and its isolated protein fractions. *J. Biol. Chem.* 1975;250:2196-2202.
- 77 Yu, N., East, E., Chang, R., Kuck, J., Raman spectra of bird and reptile lens proteins. *Exp. Eye Res.* 1977;24:321-334.
- 78 Yu, N., Raman spectroscopy: a conformational probe in biochemistry. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1977;4:229-280.
- 79 Bot, A., Huizinga, A., De Mul, F., Vrensen, G., Greve, J., Raman microspectroscopy of fixed rabbit and human lenses and lens slices: new potentialities. *Exp. Eye Res.* 1989;49:161-169.
- 80 Nie, S., Castillo, C., Bergbauer, K., Kuck, J., Nabiev, I., Yu, N., Surface-enhanced Raman spectra of eye lens pigments. *Appl. Spectrosc.* 1990;44:571-575.
- 81 Sokolov, K., Lutsenko, S., Nabiev, I., Nie, S., Yu, N., Surface-enhanced Raman analysis of biomedical eye lens extracts. *Appl. Spectrosc.* 1991;45:1143-1148.
- 82 Yu, N., East, E., Laser Raman spectroscopic studies of ocular lens and its isolated protein fraction. *J. Biol. Chem.* 1975; 250:2196-2202.

- 83 Schachar, R., Solin, S. The microscopic protein structure of the lens with a theory of cataract formation as determined by Raman spectroscopy of intact bovine lenses. *Invest. Ophthalmol.* 1975;14:380-396.
- 84 Yu, N., DeNagel, D., Pruett, P., Kuck, J. Disulfide bond formation in the eye lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985; 82:7965-7968
- 85 Mizuno, A., Ozaki, Y. Aging nad cataractous process of the lens detected by Raman spectroscopy. *Lens Eye Toxic. Res.* 1991; 8:177-187.
- 86 Ozaki, Y., Mizuno, A., Itoh, K., Yoshiura, M., Iwamoto, T., Iriyama, K. Raman spectroscopic study og age-related structural changes in the lens proteins of an intact mouse lens. *Biochemistry.* 1983;22:1773-1778.
- 87 Iriyama, K., Mizuno, A., Ozaki, Y., Itoh, K., Matsuzaki, H. An application of laser Raman spectroscopy to the study of the hereditary cataractous lens; on the Raman band for a diagnostic marker of cataractous signature. *Current. Eye Res.* 1982/1983;2:489-492.
- 88 Itoh, K., Ozaki, Y., Mizuno, A., Iriyama, K. Structural changes in the lens proteins of hereditary cataracts monitored by Raman spectroscopy. *Biochemistry.* 1983;22:1773-1778. Sebag, J., Nie, S., Reiser, K., Charles, M., Yu, N. Raman spectroscopy of human vitreous in proliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994;35:2976-2980.
- 89 Sebag, J., Nie, S., Reiser, K., Charles, M., Yu, N. Raman spectroscopy of human vitreous in proliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994;35:2976-2980.
- 90 Niemczyk, T., Delgado-Lopez, M., Newman, C., Multichannel Raman spectroscopy tackles industrial problems. *Laser Focus World.* 1993;March:85-98. Sebag, J., Nie, S., Reiser, K., Charles, M., Yu, N. Raman spectroscopy of human vitreous in proliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994;35:2976-2980.
- 91 Mathies, R. Photons, femtosecinds and dipolar interactions: a molecular picture of primary events in vision. *Novartis Found. Symp.* 1999;224:70-101
- 92 Bernstein, P., Yoshida, M., Katz, N., Mc Clane, R., Gellermann, W., Raman detection of macular carotenoid pigments in intact human retina. *Invest. Ophtahlmol. Vis. Sci.* 1998;38:2003-2011.
- 93 Bernstein, P., Zhao, D., Ermakov, I., Mc Clane, R., Gellerman, W., Resonance Raman measurment of macular pigment levels in the living human retina. *ARVO abstract issue Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000;41 abstract 3185:S600.
- 94 Kremer, I., Even, A., Sandbank, J., Giler, S., Yassur, Y. Effect of green argon (514nm) laser exposure on rose bengal-stained guinea pig cornea. *Isr. J. Med. Sci.* 1996;32:1243-1248
- 95 Dannheim F, Rassow B. Laser lesions of the anterior segment of the rabbit eye. Studies of cornea, iris, lens and sclera using an argon, ruby and YAG-laser. *Albrecht Von Graefes Arch Klein Exp Ophthalmol* 1978;205:175-205.

ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ

Οι φαρμακοκινητικές μελέτες είναι πολύ σημαντικό πεδίο έρευνας των ιατρικών επιστημών και αυτό γιατί μετά τη χορήγηση ενός φαρμάκου, είναι αναγκαίο να γνωρίζουμε τη συγκέντρωσή του, στους διάφορους ιστούς και όργανα του οργανισμού, για να ελέγχεται αν επιτυγχάνονται τα επιθυμητά θεραπευτικά επίπεδα ή ακόμα και αν υπερβαίνονται τα όρια τοξικότητας για τη συγκεκριμένη ουσία. Κάθε αντιβιοτικό που χορηγείται στον οργανισμό για να είναι αποτελεσματικό έναντι σε συγκεκριμένο παθογόνο μικροοργανισμό είναι απαραίτητο να έχει μια ελάχιστη συγκέντρωση, η οποία ονομάζεται ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (minimum inhibitory concentration-MIC).

Κύριο αντικείμενο των φαρμακοκινητικών μελετών είναι ο καθορισμός της πορείας που ακολουθούν τα φάρμακα στο σώμα, από τη στιγμή της χορήγησης μέχρι την πλήρη απομάκρυνση τους από τον οργανισμό. Μελέτες έχουν γίνει σε μεγάλη έκταση στα διάφορα όργανα έμβιων οργανισμών με σκοπό να αποσαφηνισθεί η επίδραση φαρμακευτικών ουσιών στις διαφορετικές φάσεις ασθενειών. Το κεφάλαιο αυτό επικεντρώνεται στις μελέτες της φαρμακοκινητικής στον τομέα της οφθαλμολογίας.

Βασικός στόχος κάθε φαρμακευτικής αγωγής είναι η ασφαλής χρήση των χημικών ουσιών έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται οι ανεπιθύμητες ενέργειες αλλά και να αντιμετωπίζονται αποτελεσματικά ασθένειες στο συντομότερο δυνατό χρονικό διάστημα. Ο οφθαλμός είναι ευπρόσβλητος σε επιθέσεις από μικρόβια, ιούς και πρωτόζωα του περιβάλλοντός του αλλά και λόγω της ανατομίας και της φυσιολογίας του, τα διάφορα στοιχεία-του προσεγγίζονται δύσκολα από μόρια φαρμακευτικών ουσιών τα οποία χορηγούνται στον ασθενή με διάφορους τρόπους. Για τους λόγους αυτούς, οι φαρμακευτικές ουσίες είναι ορισμένες φορές αναγκαίο να τοποθετηθούν στην οφθαλμική κοιλότητα έτσι ώστε να προσεγγίσουν άμεσα τον προσβαλλόμενο ιστό. Οι κυτταροϋποδοχείς για τα μυδριατικά και τα μειωτικά φάρμακα βρίσκονται στην ίριδα και το ακτινωτό σώμα, ενώ για τα αντιβιοτικά, τα αντιϊκά και τα στεροειδή βρίσκονται σε περιοχές τόσο του πρόσθιου όσο και του οπίσθιου τμήματος του οφθαλμού. Στο παρελθόν ο κύριος όγκος των ερευνών πραγματοποιούνταν στους οπίσθιους ιστούς του οφθαλμού (αμφιβληστροειδή), ενώ τα τελευταία χρόνια έχουν

προσανατολισθεί οι έρευνες σε ιστούς τους πρόσθιου τμήματός του (ίριδα, υαλώδες σώμα, χοριοειδή, υδατοειδές υγρό).

Η επιτυχία μιας φαρμακευτικής αγωγής εξαρτάται από τον τρόπο χορήγησης του φαρμάκου, άμεσα ή με τη χρήση διάφορων εμφυτευμάτων. Γενικά, υπάρχουν τέσσερις τρόποι χορήγησης φαρμάκων στην οφθαλμολογία, ο συστηματικός, η τοπική εφαρμογή με ενστάλαξη στην επιφάνεια του οφθαλμού,^{1,2} η απευθείας έγχυση με παρακέντηση του οφθαλμού,^{3,4} και η εμφύτευση μοσχευμάτων σταδιακής αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών.^{5,6} Μέχρι στιγμής η τοπική ενστάλαξη οφθαλμικών διαλυμάτων, εναιωρημάτων και αλοιφών δεν αντιμετωπίζουν ικανοποιητικά ασθένειες του οφθαλμού όπως φλεγμονές και αμφιβληστροειδοπάθειες, έτσι οι έρευνες έχουν στραφεί στην χορήγηση των ουσιών τοπικά με παρακέντηση που σε συνδυασμό με την επίτευξη της ακριβούς φαρμακευτικής δόσης βελτιστοποιούν την δραστικότητα των φαρμάκων, ελαχιστοποιώντας τις παρενέργειες και τα προβλήματα τοξικότητας που παρουσιάζονται κατά την συστηματική χορήγηση.

Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τις φαρμακοκινητικές μελέτες και πρέπει να ληφθούν υπόψη και να αξιολογηθούν είναι η βιοσυμβατότητα των φαρμάκων, η κινητικότητα της δραστικής ουσίας, η ικανότητα της να διαπερνά τους διάφορους βιολογικούς ιστούς, ο χρόνος που παραμένει η ουσία ενεργή αλλά και ο αστάθμητος παράγοντας “ασθενής”. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη της φαρμακοδυναμικής και φαρμακοκινητικής των διάφορων ουσιών για να κατανοηθεί η δράση ενός φαρμάκου, η αλληλεπίδρασή του με επικείμενους ιστούς ώστε να προταθεί ο αποτελεσματικότερος τρόπος χρήσης του.

Η μελέτη στη φαρμακοκινητική του ματιού παρουσιάζει δυσκολίες καθώς ο οφθαλμός, όπως προαναφέρθηκε, είναι όργανο απομονωμένο, προστατευμένο από περιβάλλοντες ιστούς και δεν μπορεί να προσεγγιστεί άμεσα. Οι προς εξέταση ιστοί, δεν μπορούν να αφαιρεθούν από τον άνθρωπο για να μελετηθούν, για τον λόγο αυτό στα αρχικά τουλάχιστον στάδια των μελετών της κινητικής μιας ουσίας, κρίνεται επιτακτική η χρήση είτε πειραματοζώων, με παρόμοια οφθαλμική λειτουργία με την ανθρώπινη, είτε μοντέλων που προσεγγίζουν τη φαρμακοκινητική λειτουργία (drug delivery system) του ανθρώπινου οφθαλμού. Παρά τις δυσκολίες που υπάρχουν, τα τελευταία 20 χρόνια πραγματοποιείται συστηματική έρευνα στον τομέα αυτόν και έχουν γίνει βελτιώσεις που σηματοδοτούν σημαντικές εξελίξεις. Οι περισσότερες μελέτες πραγματοποιούνται με επεμβατικό τρόπο,^{7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17} κάτι που απέχει από τις in-vivo εφαρμογές, για αυτό τα τελευταία χρόνια οι έρευνες στρέφονται σε μη επεμβατικές τεχνικές¹⁸ όπως η φασματοσκοπία φθορισμού^{19,20} το

σπινθηρογράφημα²¹, υπέρηχο (sonography)²² και πρόσφατα η φασματοσκοπία Raman.^{23,24,25}

5.1 Φαρμακοκινητικές μελέτες σε ζώα

Το πρώτο βήμα για να καθοριστεί ένας ρεαλιστικός μηχανισμός μεταφοράς μιας φαρμακευτικής ουσίας σε έμβιο οργανισμό είναι ο καθορισμός της συγκέντρωσής της στους διάφορους ιστούς. Είναι προφανές ότι τέτοιου είδους πειράματα είναι δύσκολο να πραγματοποιηθούν απευθείας στον άνθρωπο. Στο στάδιο αυτό, όπως προαναφέρθηκε είναι αναπόφευκτη η χρήση πειραματόζων.

Στον τομέα της οφθαλμολογίας τα κουνέλια είναι αυτά που χρησιμοποιούνται ευρέως για πειράματα τέτοιου είδους, ενώ οι οφθαλμοί ποντικών και αρουραίων δεν χρησιμοποιούνται λόγω του μικρού τους μεγέθους. Μεγαλύτερα θηλαστικά χρησιμοποιούνται σπανιότερα διότι απαιτείται μεγάλος αριθμός πειραματόζων που πρέπει να θυσιαστούν για τις εγχειρητικές φαρμακοκινητικές μελέτες. Για παράδειγμα, για να μετρηθεί η μέση συγκέντρωση σε συνάρτηση με το χρόνο για επτά ζώα σε οχτώ χρονικές στιγμές, απαιτούνται 28 ή 56 ζώα αν χρησιμοποιηθούν τα δύο ή το ένα μάτι αντίστοιχα.

Όπως προκύπτει, δύο είναι οι βασικοί παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη πριν την επιλογή του κατάλληλου πειραματόζου. Πρώτον θα πρέπει ο οφθαλμός του ζώου να έχει ομοιότητες με τον ανθρώπινο οφθαλμό τόσο στο μέγεθος όσο και στη λειτουργία του έτσι ώστε τα αποτελέσματα των πειραμάτων να προσεγγίζουν την πραγματικότητα. Δεύτερον, θα πρέπει να περιοριστεί όσο το δυνατόν ο αριθμός των πειραματόζων που θυσιάζονται για τις μελέτες.

Σε πιο πρόσφατες in-vitro μελέτες χρησιμοποιούνται οφθαλμοί χοίρων λόγω των ομοιοτήτων που παρουσιάζουν με το ανθρώπινο μάτι, τόσο στο μέγεθος όσο στην ανατομία και την φυσιολογία.^{26,27,28,29,30} Οι χοιρινοί οφθαλμοί έχουν μελετηθεί με διαγνωστικά όργανα που χρησιμοποιούνται στην οφθαλμολογία, όπως οπτική τομογραφία (optical coherence tomography), τοπογραφία κερατοειδούς (corneal topography imaging) και πολυεστιακή ηλεκτροαμφιβληστροειδογραφία (multifocal electroretinography) ενισχύοντας την άποψη ότι οι χοιρινοί οφθαλμοί είναι ικανοποιητικά μοντέλα για οφθαλμολογικές μελέτες.^{31,32,33} Επιπλέον, ειδικά στο ελλαδικό χώρο, υπάρχει πληθώρα δειγμάτων για in vitro μελέτες χωρίς την επιπλέον θανάτωση ζώων, πέραν του αριθμού που προορίζονται για τα τοπικά κρεοπωλεία.

5.2 Βασικές Αρχές Φαρμακοκινητικής

Ο οφθαλμός είναι ένα από τα πιο πολύπλοκα όργανα σε μακροσκοπικό επίπεδο στον άνθρωπο και τα θηλαστικά γενικότερα. Ο τρόπος που οι δομές του λειτουργούν και συνδυάζονται έτσι ώστε λαμβάνοντας χημικά μόρια να τα μεταφέρουν είναι αρκετά περίπλοκος.

Στο σχήμα 5.1 φαίνονται οι βασικότεροι τρόποι αλληλεπίδρασης μιας φαρμακευτικής ουσίας με τους γειτονικούς ιστούς του πρόσθιου θαλάμου κατά την έγχυση της ουσίας αυτής, μέσω του σκληροκερατοειδούς ορίου. Μεγάλη ποσότητα του φαρμάκου χάνεται μέσω του επιπεφυκότα, κάποια ποσότητα απορροφείται από τον κερατοειδή, ενώ κάποιο ποσοστό μεταφέρεται στον οπίσθιο θάλαμο μέσω της κυκλοφορίας του υδατοειδούς υγρού και στη συνέχεια διαχέεται στη κυκλοφορία του αίματος μέσω του ραγοειδή χιτώνα του οφθαλμού.

Οι βασικοί μηχανισμοί που περιγράφουν τη φαρμακοκινητική μιας ουσίας στον οφθαλμό συνοδεύονται και από δευτερεύουσες ενέργειες που αναφέρονται παρακάτω:

1. Ανάμειξη της ουσίας με τα δακρυϊκά υγρά.
2. Αραίωση λόγω της φυσιολογικής παραγωγής δακρύων.
3. Απορρόφηση (π.χ απορρόφηση στον επιπεφυκότα).
4. Ιονισμός.
5. Πρωτεϊνική αλληλεπίδραση.
6. Μεταβολισμός και χημική αποικοδόμιση.
7. Μεταφορά προς διάφορους ιστούς, όπως την ίριδα και τον φακό.

Οι παραπάνω μηχανισμοί που τυγχάνουν κατά την τοπική χορήγηση, αναδεικνύουν την πολυπλοκότητα του συστήματος μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών στα διάφορα τμήματα του οφθαλμού.

Σχήμα 5.1: Βασικό μοντέλο φαρμακοκινητικής μιας ουσίας στον πρόσθιο θάλαμο, μετά τη χορήγησή της μέσω του σκληροκερατοειδούς ορίου με σύριγγα.

Αναφορές

- 1 Lee, V., Robinson, J. Review: Topical ocular drug delivery recent developments and future challenges. *J. Ocul. Pharm.* 1986;2:67-108.
- 2 Nagataki, S., Mishima, S. Pharmacokinetics of instilled drugs in the human eye. *Int. Ophthalmol. Clin.* 1980;20:33-49.
- 3 Yamada, N., Hiraki, S. Pharmacokinetics of subconjunctivally injected drugs in the anterior segment of rabbit eyes. *Nippon. Ganka. Gakkai. Zasshi.* 1995;99:262-270.
- 4 Mc Closkey, R. Topical antimicrobial agents and antibiotics for the eye. *Med. Clin. North. Am.* 1988;72:717-722.
- 5 Chan, M., Dunn, J. Ganciclovir implant in the treatment of cytomegalovirus retinitis. *Expert. Rev. Med. Devices.* 2005;2:421-427.
- 6 Yasukawa, T., Ogura, Y., Sakurai, E., Tabat, Y., Kimura, H. Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005;57:2033-2046.
- 7 Putterman, J., Davidson, J., Albert, J. Lack of metabolism of timolol by ocular tissues. *J. Ocular Pharmacol.* 1985;1:287-295.
- 8 Hui, W., Zeleznick, L., Robinson, R. Ocular disposition of topically applied histamine, cimetidine, and pyrilamine in the albino rabbits. *Curr. Eye Res.* 1984;3:321-330.
- 9 Saettone, F., Giannaccini, B., Savigi, P., Wirth, A. The effect of different ophthalmic vehicles on the activity of tropicamide in man. *J. Pharm. Pharmacol.* 1980;32:519-521.
- 10 Berthe, P., Baudouin, C., Garraffo, R., Hoffmann, P., Taburet, A., Lapalus, P. Toxicologic and pharmacokinetic analysis of intravitreal injection of Foscarnet, either alone or in combination with Ganciclovir. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994;35:1038-1045.
- 11 Barza, M., Doft, E., Lynch, E., Ocular penetration of ceftriazone, ceftazidime, and vancomycine after subconjunctival injection in humans. *Arch. Ophthalmol.* 1993;1:492-494.
- 12 Miller, S., Himmelstein, C., Patton, T. A physiologically based pharmacokinetic model for the intraocular distribution of pilocarpine in rabbits. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1981;9:653-677.
- 13 Schoenwald, R., Deshpande, G., Rethwisch, D., Barfknecht, C. Penetration into the anterior chamber via the conjunctival/scleral pathway. *J. Ocul. Pharmacol. Therapeutics.* 1997;13:41-59.
- 14 Sato, H., Fukuda, S., Inatomi, M., Koide, R., Uchida, N., Kanda, Y., Kiuchi, Y., Oguchi, K. Pharmacokinetics of norfloxacin and lomefloxacin in domestic rabbit aqueous humor analyzed by microdialysis. *J. Jpn. Ophthalmol. Soc.* 1996;100:513-519.
- 15 Donnenfeld, E., Perry, h., Snyder, R., Moadel, K., Elsky, M., Jones, H. Intracorneal, Aqueous Humor, and Vitreous humor penetration of topical and oral ofloxacin. *Arch. Ophthalmol.* 1997;115:173-176.
- 16 Beer, P., Bakri, S., Singh, R., Liu, W., Peters, G., Miller, M. Intraocular concentration and pharmacokinetics of Triamcinolone Acetonide after a single intravitreal injection. 2003;110:681-686.
- 17 Souli, M., Kopsinis, G., Kavouklis, E., Gabriel, L., Giamarellou, H. Vancomycin levels in humans aqueous humor after intravenous and subconjunctival administration. 2001;18:239-243.
- 18 Ben-Nun, J., Cooper, R., Cringle, S., Constable, I. Ocular Dialysis: A new technique for in-vivo intraocular pharmacokinetic measurements. *Arch. Ophthalmol.* 1998;106:254-259.

- 19 Adler, C., Maurice, M., Palerson, M., The effect of viscosity of the vehicle on the penetration of fluorescein into the human eye. *Exp. Eye Res.* 1971;11:34.
- 20 Nagataki, S. Human aqueous humor dynamics, *Jpn. J. Ophthalmol.* 1975;19:235.
- 21 Trueblood, H., Rossosmondo, M., Carlton, H., Wilson, A. Corneal contact times of ophthalmic vehicles, *Arch. Ophthalmol.* 1975;93:127.
- 22 Shiver, S., Lyon, M., Blaivas, M. Detection of metallic ocular foreign bodies with handheld sonography in porcine model. *J. Ultrasound Med.* 2005;24:1341-1346.
- 23 Lambert J, Pelletier C, Borchert M. Glucose determination in human aqueous humor with Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 2005;10:031110.
- 24 Hosseini K, Jongsma F, Hendrikse F, Motamedi M. Non-invasive monitoring of commonly used intraocular drugs against endophthalmitis by Raman spectroscopy. *Lasers Surg Med* 2003;32:265-270.
- 25 Hosseini K, March W, Jongsma F, Hendrikse F, Motamedi M. Noninvasive detection of ganciclovir in ocular tissue by Raman spectroscopy: implication for monitoring of drug release. *J Ocul Pharmacol Ther* 2002;18:277-285
- 26 Camber, O., An in-vitro model for determination of drug permeability through the cornea. *Acta. Pharm. Suec.* 1985;22:335.
- 27 Ruiz-Ederra, J., Garcia, M., Hernandez, M., Urcola, H., Hernandez-Barbachano, E., Araiz, J., Vecino, E. The pig eye as a novel model of glaucoma. *Exp. Eye Res.* 2005;81:561-569.
- 28 De Korte, C., Van der Steen, A., Thijssen, J., Duindam, J., Otto, C., Puppels, G. Relation between Local Acoustic Parameters and protein distribution in human and porcine eye lenses. *Exp. Eye Res.* 1994;59:617-627.
- 29 Schmidt Laugesen, C., Steffansen, B., Scherfig, E., la Cour, M., Pharmacokinetics of intravitreal 5-fluorouracil products in silicone oil: experiments studies in pigs. *Acta Ophthalmol. Scand.* 2005;83:184-190.
- 30 Ruiz-Ederra, J., Garcia, M., Martin, F., Urcola, H., Hernandez, M., Araiz, J., Duran, J., Vecino, E. Comparison of three methods of inducing chronic elevation of intraocular pressure in the pig (experimental glaucoma). *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 2005;80:571-579.
- 31 Kyhnl, M., Kiilgaardl, J., Scherfigl, E., Prausel, J. Multifocal electroretinogram (mfERG) and simultaneously monitoring of the funduspicture in the domestic pig. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004;45:e-abstract 4247.
- 32 Maverick, K., Conners, M., Huang, A. Effect of intraocular pressure on keratometry in porcine eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004;45: e-abstract 2876.
- 33 Van Velthovenl, M., Willekens, B., Verbaakl, F., De Vos, K., De Smet, M. Histological correlation of en face OCT scans using a porcine retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004;45: e-abstract 2371.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (PLS ANALYSIS)

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα στον τομέα της αναλυτικής χημείας έχει αλλάξει ουσιαστικά με την εισαγωγή χημειομετρικών μεθόδων ανάλυσης. Η αλλαγή αυτή οφείλεται στη δυνατότητα ψηφιακής καταγραφής και επεξεργασίας ευρύτατων συνόλων δεδομένων από κάθε παρατηρούμενο αντικείμενο και για μεγάλο αριθμό αντικειμένων. Η χημειομετρία είναι η μαθηματική μεθοδολογία (εφαρμογή στατιστικής και γραμμικής άλγεβρας) που επιτρέπει τον εντοπισμό εκείνου του υποσυνόλου των δεδομένων που σχετίζεται με την ιδιότητα του αντικειμένου που μας ενδιαφέρει, και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του αντικειμένου ή για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ιδιότητας που μας ενδιαφέρει. Σχετίζεται με το κλάδο της αναλυτικής χημείας που χρησιμοποιεί στατιστικές μεθόδους ανάλυσης με τη βοήθεια πολλών μεταβλητών (multivariate calibration methods). Σε αυτές τις μεθόδους χρησιμοποιείται πλήθος στοιχείων για την ανάλυση, έναντι ενός που χρησιμοποιείται στις στατιστικές μεθόδους μιας μεταβλητής. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτού του τύπου στατιστικής ανάλυσης είναι ότι το πλήθος των μεταβλητών συνεπάγεται και πλήθος πληροφοριών που σχετίζονται με τα δεδομένα. Αυτό σημαίνει ότι ακόμη και πολύ μικρές μεταβολές μεταξύ των δεδομένων της ανάλυσης μπορούν να προσδιοριστούν. Τέτοιου είδους μαθηματικές μέθοδοι πολλών μεταβλητών έχουν βρει ευρύ φάσμα εφαρμογών διεπιστημονικού χαρακτήρα. Για παράδειγμα χημειομετρικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί:

- Για τον διαχωρισμό της γεροντικής άνοιας και της νόσου του Alzheimer.¹
- Για τον διαχωρισμό μεταξύ ποικιλιών του καφέ (Arabica και Robusta).²
- Για την ταξινόμηση της μόλυνσης υδατικών αποβλήτων.³
- Για τον διαχωρισμό ενεργών και μη ενεργών συστατικών και τη ποσοτικοποίηση της σχέσης δομής-ενεργότητας.⁴
- Για τον διαχωρισμό δύο ποικιλιών σκληρού κόκκινου σίτου σε συνδυασμό με φασματοσκοπία κοντινού υπερύθρου.⁵

- Για την ταυτοποίηση transsexual προσωπικοτήτων.⁶
- Για τον προσδιορισμό της χρονιάς παραγωγής του κρασιού.⁷
- Για το διαχωρισμό της σάλτσας σόγιας ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή προέλευσης.⁸
- Για τον προσδιορισμό πηγών εκπομπής από μελέτες των αερολυμάτων της ατμόσφαιρας.⁹
- Για την εύρεση της συγκέντρωσης συστατικών σε διαλύματα με βάση τα αντίστοιχα φάσματα (IR, Raman, UV).¹⁰

Στη βιβλιογραφία υπάρχει πληθώρα αναφορών για το συγκεκριμένο θέμα, αλλά η μαθηματική προσέγγιση είναι συχνά δύσκολο να κατανοηθεί. Εν τούτοις, αυτές οι νέες τεχνικές αποδεικνύονται ανεκτίμητα εργαλεία για τις σύγχρονες πειραματικές αναλύσεις καθώς επιτρέπουν την εξέταση πολύπλοκων συστημάτων τα οποία δεν μπορούσαν να προσεγγιστούν λίγα χρόνια πριν.

Σκοπός αυτού του κεφαλαίου είναι η περιγραφή των βασικών λογικών βημάτων της χημειομετρικής ανάλυσης πολλών μεταβλητών με όσο το δυνατόν απλούστερο τρόπο και η περιγραφή των θεμελιωδών αρχών της. Τα αυστηρά μαθηματικά σύμβολα παραλείπονται και μόνο οι πιο βασικές μαθηματικές σχέσεις παρουσιάζονται.

6.1 Στατιστικές Μέθοδοι Πολλών Μεταβλητών στην Αναλυτική Χημεία

Ο βασικός στόχος κάθε ποσοτικής αναλυτικής τεχνικής είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των ιδιοτήτων (Y) ενός συνόλου δειγμάτων από τα αποτελέσματα μετρήσεων που πραγματοποιούνται στα ίδια τα δείγματα (X). Στην περίπτωση μας Y= *συγκέντρωση* και X= *φάσματα*. Ο στόχο αυτός επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας γνωστά δείγματα αναφοράς για την κατασκευή ενός μοντέλου που συνδέει τις παραμέτρους ενός συστήματος X και των αντίστοιχων ιδιοτήτων ενός συστήματος Y. Η συνολική διαδικασία εξελίσσεται σε δύο στάδια: τη βαθμονόμηση των δεδομένων (φασμάτων και συγκεντρώσεων), δηλαδή την εύρεση μιας συνάρτησης (συνάρτηση βαθμονόμησης) που συνδέει τα δύο συστήματα X και Y και την ανάλυση, δηλαδή την εφαρμογή του μοντέλου σε άγνωστα δείγματα για την πρόβλεψη των αντίστοιχων ιδιοτήτων.

Στην περίπτωση της ανάλυσης με χρήση μιας μεταβλητής συσχετίζεται μια παράμετρος των δεδομένων (π.χ ένα σημείο του φάσματος-μέγιστο μιας κορυφής) με κάποια ιδιότητα του συστήματος που μελετάται (π.χ συγκέντρωση). Υπολογίζεται η συνάρτηση βαθμονόμησης από τα φασματικά δεδομένα και από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις και στη συνέχεια καθορίζονται ποσοτικά οι συγκεντρώσεις νέων άγνωστων δειγμάτων χρησιμοποιώντας την ίδια παράμετρο που χρησιμοποιήθηκε και στην διαδικασία της βαθμονόμησης (π.χ ένταση του φάσματος στον ίδιο κυματάρημο). Το αποτέλεσμα της όλης διαδικασίας είναι η δημιουργία ενός γραμμικού συστήματος εξισώσεων που μπορεί να επιλυθεί.

Για πολλούς λόγους οι αναλύσεις μιας μεταβλητής κρίνονται ανεπαρκείς για την πρόβλεψη πολύπλοκων συστημάτων. Το βασικό μειονέκτημα προέρχεται από το γεγονός ότι η συγκέντρωση των άγνωστων, μη βαθμονομημένων δειγμάτων, συσχετίζεται μόνο με ένα σημείο του φάσματος (μια πληροφορία). Έτσι τυχαία στατιστική μεταβολή του συγκεκριμένου αυτού σημείου (π.χ θόρυβος ανιχνευτή) μεταφέρεται άμεσα στα αποτελέσματα της συγκέντρωσης με αποτέλεσμα λανθασμένη ερμηνεία οποιουδήποτε σήματος προσδιορίζεται από συγκεκριμένο σημείο του φάσματος. Η αναπόφευκτη αύξηση της αβεβαιότητας μπορεί να βελτιωθεί με πολλαπλές μετρήσεις και την εύρεση του μέσου όρου. Απαιτείται δηλαδή, μεγάλος αριθμός μετρήσεων για την αποφυγή σφαλμάτων κάτι που ελαττώνει σημαντικά την χρηστικότητα των αποτελεσμάτων.

Για τους λόγους αυτούς στην επίλυση πολύπλοκων συστημάτων επιλέγεται η εφαρμογή στατιστικών μοντέλων πολλών μεταβλητών. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναφερθεί πολλές εφαρμογές τέτοιων μεθόδων στην αναλυτική χημεία.^{11,12,13,14,15} Από αυτές το μοντέλο ανάλυσης που χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι αυτό των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (**P**artial **L**east **S**quare). Εκτενή παραδείγματα της μεθόδου PLS αναφέρουν οι Haaland et al., Martens et al. και Brown et al.^{11,14,15}.

6.2 PLS ανάλυση- Βαθμονόμηση (Calibration)

Το στάδιο της βαθμονόμησης αφορά στον υπολογισμό της συνάρτησης βαθμονόμησης από γνωστά φασματικά και αναλυτικά δεδομένα ενός πληθυσμού δειγμάτων αναφοράς.

Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, παρασκευάζονται Ν δείγματα αναφοράς και λαμβάνονται ισάριθμα φάσματα Μ σημείων το καθένα. Οι τιμές των εντάσεων του σήματος Raman στους Μ

κυματάριθμους τοποθετούνται σε πίνακα X διαστάσεων $N \times M$ ενώ οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τοποθετούνται σε πίνακα στήλη $Y_{N \times 1}$ που στοιχεία του είναι οι συγκεντρώσεις ενός συστατικού στα N φάσματα. Στο σχήμα 6.1 περιγράφεται αυτή η διαδικασία.

Σχήμα 6.1: Αναπαράσταση των φασματικών δεδομένων και των συγκεντρώσεων με τη μορφή πινάκων.

Στο στάδιο της βαθμονόμησης, αναζητείται ο συσχετισμός του πίνακα X με τα δεδομένα του πίνακα Y . Ο συσχετισμός αυτός προϋποθέτει ότι μεταβολή στη συγκέντρωση κάποιου συστατικού συνεπάγεται κάποια μεταβολή του σήματος Raman και αντίστροφα (μεταβολές στο σήμα Raman ενός συστατικού δηλαδή σε στοιχεία του πίνακα X , αντιστοιχούν σε μεταβολές στον πίνακα των συγκεντρώσεων Y). Συνεπώς οι μεταβολές στα φασματικά δεδομένα (πίνακα X) κωδικοποιούν τις πληροφορίες που σχετίζονται με φυσικές ιδιότητες του συστήματος.

Στην ανάλυση PLS ο πίνακας των φασματικών δεδομένων X αναλύεται σε άθροισμα παραγόντων (σχέση 6.1), που ονομάζονται *ranks*. Ο κάθε παράγοντας περικλείει μέσα του πληροφορία, που σχετίζεται με μεταβολές των στοιχείων του πίνακα, δηλαδή μεταβολές στα φασματικά χαρακτηριστικά. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντί του αρχικού πίνακα για την ανάλυση και αναφέρονται ως «λανθάνοντες παράγοντες» διότι αναπαράγουν πιστά, εν δυνάμει ιδιότητες του συστήματος, αν και οι ίδιοι δεν προσδιορίζονται άμεσα από τις

μετρήσεις.^{5,16} Στην περίπτωση της ανάλυσης PLS αυτοί οι παράγοντες επιλέγονται έτσι ώστε να προσεγγίζουν με όσο το δυνατόν καλύτερο τρόπο τα δεδομένα. Οι πρώτοι παράγοντες εκφράζουν την κύρια μεταβολή (μαθηματικά: τη μεγαλύτερη μεταβολή) σε στοιχεία του πίνακα. Αυτοί οι παράγοντες είναι πολύ σημαντικοί στη διαδικασία της ανάλυσης. Οι τελευταίοι παράγοντες εκφράζουν μικρές αλλαγές στα φασματικά χαρακτηριστικά. Συνεπώς οι παράγοντες μικρής τάξης κωδικοποιούν τις μεγαλύτερες μεταβολές σε στοιχεία του πίνακα X , ενώ οι παράγοντες υψηλότερης τάξης τείνουν να εκπροσωπούν μικρότερες μεταβολές όπως μεταβολές που συμβαίνουν στην περιοχή θορύβου του φάσματος.

Οι παράγοντες είναι γινόμενα, των υποτιθέμενων συντελεστών διανυσμάτων t_i (score vectors) με τα διανύσματα p_i (loading vectors).¹²

$$X = \underbrace{t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + \dots + t_N p_N^T}_{\text{Ranks}} \quad (6.1)$$

Στο σχήμα 6.2 αναπαριστάται σχηματικά η προηγούμενη εξίσωση.

Σχήμα 6.2: Γραφική αναπαράσταση της εξίσωσης (6.1) που αναλύει τον πίνακα X σε άθροισμα γινομένων.

Στη διαδικασία αυτή, οι τιμές των συγκεντρώσεων συσχετίζονται με εύρος φασματικής περιοχής αντί με ένα σημείο του φάσματος. Οι πληροφορίες που εμπεριέχονται στα δεδομένα που αναλύονται με αυτή τη μέθοδο είναι σαφώς περισσότερες από αυτές που λαμβάνονται στην ανάλυση με τη χρήση μιας μεταβλητής. Δηλαδή, χρησιμοποιώντας εύρος φασματικής περιοχής αντί για συγκεκριμένο σημείο φάσματος ως δεδομένο, η ανάλυση μπορεί να χειριστεί περισσότερες πληροφορίες για την εύρεση της πιο ρεαλιστικής και αξιόπιστης συνάρτησης βαθμονόμησης (b). Οι πληροφορίες αυτές μπορεί να αφορούν όχι μόνο το μέγιστο κορυφής αλλά και το εμβαδόν της, το FWHM, σχετικές εντάσεις των κορυφών της διαλυμένης ουσίας και του διαλύτη κ.α. Έτσι, αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές μπορούν να διαχωριστούν εφόσον διαφέρουν έστω και λίγο στο σχήμα τους.¹⁷

Ο μέγιστος αριθμός γραμμικών όρων, στον οποίο αναλύεται ο πίνακας X είναι N (δηλαδή ίσος με τον αριθμό των φασμάτων αναφοράς). Η τιμή του R^2 (determination coefficient) και του σφάλματος (RMSE- Root Mean Square Error) ενός μοντέλου σε σχέση με τον αριθμό των γραμμικών όρων που αναλύεται ο πίνακας X , φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα (Σχήμα 6.3). Παρόλο που η βελτιστοποίηση φαίνεται να επιτυγχάνεται στο νιοστό Rank, μια μέθοδος που θα χρησιμοποιεί το σύνολο των N ανυσμάτων βάσης για να προβλέψει την τιμή της ιδιότητας Y , προφανώς θα ήταν τετριμμένη διότι θα κατέληγε σε πρόβλεψη με βάση την ταυτότητα.

Σχήμα 6.3: Θεωρητική συσχέτιση του R^2 και του RMS error ενός μοντέλου σε συνάρτηση με των αριθμό των Ranks.

Για να υπολογιστεί ο βέλτιστος αριθμός Ranks ο οποίος μεγιστοποιεί την ποιότητα του μοντέλου χωρίς να στηρίζεται σε άσχετη πληροφορία ή θόρυβο (overfitting) απαιτείται η εφαρμογή ενός σταδίου επικύρωσης του μοντέλου. Αυτή η διαδικασία βελτιστοποίησης είναι το σημαντικότερο στάδιο της ανάπτυξης μιας μεθόδου PLS, μετά την επιλογή των δειγμάτων αναφοράς.

6.3 PLS ανάλυση- Επικύρωση (Validation)

Η αποφυγή τετριμμένης λύσης γίνεται με την αξιολόγηση φασμάτων για τα οποία είναι γνωστή η τιμή του Y αλλά δεν συμμετέχουν στην κατάστροψη του πίνακα X . Δύο διαφορετικοί τρόποι επικύρωσης υπάρχουν, η εσωτερική και η εξωτερική.

Στην εξωτερική επικύρωση τα δείγματα (φάσματα αναφοράς) χωρίζονται σε δείγματα βαθμονόμησης και δείγματα αξιολόγησης (συνήθως αναλογία 2:1). Η βαθμονόμηση (πίνακας X και ανάλυσή του σε γραμμικούς όρους) στηρίζεται αποκλειστικά στο υποσύνολο βαθμονόμησης. Η μέθοδος που προκύπτει

εφαρμόζεται στα φάσματα αξιολόγησης και οδηγεί στην πρόβλεψη των συγκεντρώσεων.

Στην εσωτερική επικύρωση (internal validation) ένα μικρό υποσύνολο (<5%) των δειγμάτων φασμάτων αναφοράς χαρακτηρίζεται προσωρινά ως υποσύνολο αξιολόγησης. Η βαθμονόμηση στηρίζεται στα υπόλοιπα δείγματα (>95%) και χρησιμοποιείται για να προβλέψει τη συγκέντρωση του υποσυνόλου αξιολόγησης. Κατόπιν τα φάσματα που απετέλεσαν το υποσύνολο αξιολόγησης επανεντάσσονται στη βαθμονόμηση ενώ το επόμενο 5% των φασμάτων εξαιρείται από αυτήν και αποτελεί το νέο υποσύνολο αξιολόγησης. Η διαδικασία αυτή τελειώνει όταν όλα τα φάσματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την επικύρωση του μοντέλου. Η μέθοδος αυτή είναι γνωστή ως leave-some-out. Στην περίπτωση όπου ένα-ένα φάσματα αφήνεται εκτός της διαδικασίας βαθμονόμησης η μέθοδος είναι γνωστή ως leave-one-out.

Και στις δύο περιπτώσεις, η μέθοδος αξιολογείται με βάση το R^2 και το RMS error της ευθείας, προβλεπόμενη συγκέντρωση = γνωστή συγκέντρωση (true-fit). Ο υπολογισμός γίνεται συναρτήσει του αριθμού των Ranks (ο οποίος είναι μικρότερος ή ίσος του αριθμού των δειγμάτων βαθμονόμησης). Επιλέγεται η μέθοδος που οδηγεί στο βέλτιστο R^2 και RMSE. Επειδή η μέθοδος αξιολογείται με βάση τα φάσματα/δείγματα που δεν συμμετέχουν στη βαθμονόμηση, ο αριθμός των Ranks δεν μπορεί να περιγράψει πλέον τυχαία ή άσχετη πληροφορία. Στην πράξη παρατηρείται ότι υπάρχει συγκεκριμένος αριθμός γραμμικών όρων στον οποίο το μοντέλο έχει το βέλτιστο R^2 και RMS error (Σχήμα 6.3).

Σχήμα 6.3: Συσχέτιση του R^2 και του RMS error ενός μοντέλου σε συνάρτηση με των αριθμό των Ranks.

6.4 PLS ανάλυση- Πρόβλεψη (Prediction)

Το στάδιο της πρόβλεψης αφορά τη χρήση της συνάρτησης βαθμονόμησης (b) στην πρόβλεψη της ιδιότητας Y με βάση τα φάσματα X δειγμάτων που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στη βαθμονόμηση αλλά είναι της ίδιας φύσης με αυτά.

Για την πρόβλεψη δεδομένων αυτό που έχει την βαρύνουσα σημασία είναι η συνάρτηση βαθμονόμησης b που προσδιορίζεται στο πρώτο στάδιο της ανάλυσης PLS. Καταρχήν λαμβάνονται τα φάσματα που πρόκειται να μελετηθούν και στη συνέχεια εφαρμόζεται η συνάρτηση βαθμονόμησης b στον πίνακα των νέων φασματικών δεδομένων, κάτι που οδηγεί άμεσα στον υπολογισμό των αντίστοιχων συγκεντρώσεων (σχέση 6.2).

$$Y_{\text{prediction}} = (X_{\text{analysis}}) \cdot b \quad (6.2)$$

Όπου X_{analysis} : Πίνακας φασματικών δεδομένων των προς ανάλυση δειγμάτων.

$Y_{\text{prediction}}$: Προβλεπόμενη συγκέντρωση των φασμάτων αγνώστων δειγμάτων.

Έτσι η ποιότητα της ανάλυσης εξαρτάται από το πόσο καλά καθορισμένη είναι η συνάρτηση b . Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να βρεθεί συνάρτηση βαθμονόμησης b , η οποία εκφράζει πληρέστερα τη συσχέτιση μεταξύ φασματικών χαρακτηριστικών και συγκέντρωσης.

Αναφορές

- 1 Gottfries, J., Blennow, K., Wallin, A., Gottfries, C. Diagnosis of dementias using partial least squares discriminant analysis. *Dementia* 1995; 6: 83-88.
- 2 Brianded, R., Kemsley, E., Wilson, R. Discrimination of Arabica nad Robusta in instant coffe by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *J. Agric. Food. Chem.* 1996; 44: 170-174.
- 3 Saaksjarvi, E., Khalighi, M., Minkinen, P. Waste water pollution modeling in southern area of lake Saimaa, Finland, by the SIMCA pattern recognition method. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 1989;7:171-180.
- 4 Berntsson, P., Wold, S. Comparison between x-ray crystallographic data and physicochemical parameters with respect to their information about the calcium channel antagonist activity of 4-phenyl-1,4-dihydropyridines. *Quant. Struct.-Activ. Relat.* 1986;5:45-50.
- 5 Delwiche, S., Chen, Y-R, Hruschka, W. Differentiation of hard red wheat by near infrared analysis of bulk samples. *Grain Qual.* 1972; 3: 243-247.
- 6 Sundborn, E., Bondlund, O., Hojerback, T. Object relation and defensive operations in transsexuals and borderline patients as measured us measured by the defense mechanism test. *Nordic. J., Psychiatry* 1995; 49: 379-388.
- 7 Ortiz, M., Sarabia, L., Symington, C., Santamaria, F., Iniguez, M. Analysis of ageing and typification of vintage ports by partial least squares and soft independent modelling class analogy.
- 8 Lizuka, K., Aishina, T. Soy sauce classification by geographic region based on NIR spectra and chemo metrics pattern recognition. *J. Food Sci.* 1997; 62: 101-104.
- 9 Vong, R., Geladi, P., Wold, S., Esbensen, K. Source constribution to ambient aerosol calculated by discriminant partial least squares regression. *J. Chemometrics* 1988; 2: 281-296.
- 10 Pelletier, C., Lambert, J., Borchert, M. Determination of glucose in human aqueous humor using Raman Spectroscopy and designed-solution calibration.
- 11 Geladi, P., Kowlski, B. Partial Least Squares Regression: a tutorial. *Anal. Chim. Acta* 1986;185:1-17
- 12 Beebe, K., Kowlski, B. *Anal. Chem.* 1987;59:1007A Naes, T. Multivariate Calibration, J. Wiley & Sons, New York (1989): chapter 3.5
- 13 Martens, H., Naes, T. Multivariate Calibration, J. Wiley & Sons, New York (1989): chapter 3.5
- 14 Brown, S. Chemical systems under indirect observation Latent properties and chemometrics. *Apl. Spectrosc.* 1995;49:14a
- 15 Haaland, D., Thomas, E. Partial Least Squares Methods for spectral analysis. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Anal. Chem.* 1988;60:1193-1202
- 16 Geladi, P. Notes on the history and nature of partial least squares (PLS) modeling. *J. Chemometrics* 1988;2:231
- 17 Conzen, J., Burck J., Ache, H. Determination of chlorinated hydrocarbins in water by fiberoptics evanescent-wave spectroscopy and partial least squares regression. *Freshenious J. Anal. Chem.* 1994;348:501-505.

ΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

7.1 Σύστημα T-64000 Jobin Yvon

Το φασματοφωτόμετρο που αποτέλεσε τη βασική πειραματική διάταξη της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για την μελέτη του μοριακού προσανατολισμού πολυμερών¹ και σε πειράματα υψηλών θερμοκρασιών.² Διαθέτει τη δυνατότητα χρησιμοποίησης συμβατικών φακών εστίασης και συλλογής σε γεωμετρίες σκέδασης 90° και 180°. Η διάταξη σκέδασης Raman 90° (macro-Raman) τροποποιήθηκε για να εξυπηρετήσει τα πειράματα της παρούσας μελέτης.

Η διάταξη (Σχήμα 7.1) μπορεί να διαχωριστεί σε δύο βασικά τμήματα. Το πρώτο τμήμα βρίσκεται εκτός του φασματοσφωτόμετρου και αποτελείται από την πηγή του laser, ένα ορθογώνιο πρίσμα, συμβολομετρικό φίλτρο (interference filter) σφαιρικό φακό, δύο φακούς συλλογής, δύο καθρέπτες, έναν επιπλέον συγκλίνοντα φακό και φίλτρο Notch. Το δεύτερο τμήμα είναι αυτό που βρίσκεται μέσα στο φασματοφωτόμετρο και αποτελείται από τη σχισμή εισόδου, το φράγμα περίθλασης (grating) και τον ανιχνευτή.

Ως πηγή διεγείρουσας ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε υδρόψυκτο laser ιόντων Αργού (Ar^+) με ακτινοβολία μήκους κύματος στα 514,5 nm. Η μέγιστη ένταση του laser ήταν 900 mW, ενώ για τα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε ένταση 25 mW. Η απόρριψη των γραμμών εκπομπής του πλάσματος του laser Ar^+ πραγματοποιήθηκε από ειδικό συμβολομετρικό φίλτρο (interference filter).

Η δέσμη του laser κατευθύνεται στο δείγμα μέσω μιας νέας γεωμετρικής διάταξης που αποτελείται από ορθογώνιο πρίσμα και σφαιρικό φακό με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Αυτή η γεωμετρική διάταξη περιγράφεται εκτεταμένα στο κεφάλαιο 9 και δίνει την δυνατότητα στη δέσμη του laser να διασχίζει εγκάρσια τον πρόσθιο θάλαμο οφθαλμού.

Μετά το δείγμα, αντί για ένα σταθερό αντικειμενικό φακό που συνήθως χρησιμοποιείται για τη συλλογή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, υπάρχει ένα afocal σύστημα δύο φακών. Ο πρώτος φακός που βρίσκεται κοντά στο φασματογράφο έχει εστιακή απόσταση 260 mm ενώ ο δεύτερος που βρίσκεται κοντά στο δείγμα (οφθαλμός) 160 mm. Το συγκεκριμένο σύστημα συλλογής των δύο φακών, μεγεθύνει την εικόνα του πεδίου εστίασης, κατά ένα παράγοντα $\sim 1,6$ (260/160).

Μέσω ενός καθρέπτη και ενός συγκλίνοντα φακού, η σκεδαζόμενη ακτινοβολία διαπερνά ένα φίλτρο super Notch που απορρίπτει σχεδόν τελείως την ελαστική σκέδαση, αλλοιώνει όμως φασματική περιοχή $\pm 100 \text{ cm}^{-1}$ περίπου εκατέρωθεν της Rayleigh και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για διεγείρουσα ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος (514,5 nm). Στην επιφάνεια ενός δεύτερου καθρέπτη η σκεδαζόμενη ακτινοβολία ανακλάται και κατευθύνεται προς την αξονική σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα (entrance slit).

Στη συνέχεια, η ακτινοβολία που εισέρχεται στο φασματογράφο αναλύεται από ένα φράγμα περίθλασης υψηλής διασποράς (500 nm grating) 600 εγκοπών ανά mm επιφανείας (76mm x 76mm). Το συγκεκριμένο σύστημα διαθέτει και grating με 1800 εγκοπές ανά mm, ενισχύοντας την ανάλυση του.

Πρακτικά το φίλτρο Notch έχει απόδοση 80% περίπου, ενώ αν η απόδοση ενός φράγματος περίθλασης (grating) είναι γύρω στο 70%* ο απλός μονοχρωμάτορας έχει απόδοση 56%.

Ο ανιχνευτής του συστήματος είναι μια CCD (Spectraview-2DTM, 1024x256 pixels) κάμερα, δύο διαστάσεων, ψυχόμενη με τη βοήθεια υγρού αζώτου στους 140 K.² Σημειώνεται ότι η ονομαστική μέγιστη κβαντική απόδοση της συγκεκριμένης CCD είναι 50% στα 750 nm και 35% στην περιοχή του φασματικού παράθυρου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ($\sim 560 \text{ nm}$), ενώ οι νέες τεχνολογίας CCD παρουσιάζουν κβαντικές αποδόσεις της τάξης του 95 % σε μεγάλο φασματικό εύρος. Τέτοιου είδους ανιχνευτές επιτυγχάνουν ταχείες μετρήσεις καλύπτοντας ταυτόχρονα μια εκτεταμένη φασματική περιοχή. Επίσης παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία σε ασθενή σήματα αλλά όμως περιορίζουν τη διακριτική ικανότητα και την ευαισθησία σε ισχυρά σήματα λόγω φαινομένων κορεσμού. Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής κρίνεται κατάλληλος για το σκοπό των πειραμάτων της συγκεκριμένης εργασίας, καθώς δίνει τη δυνατότητα ταχέων μετρήσεων, κάτι που κρίνεται απαραίτητο στα πειράματα βιολογικών συστημάτων λόγω της ευαισθησίας τους.

Η καταγραφή των φασμάτων Raman γίνεται με χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή. Το σήμα εξόδου, πριν εισαχθεί στον υπολογιστή, μετατρέπεται σε ψηφιακό με την

* Το ποσοστό αυτό εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του grating καθώς και από το μήκος κύματος και την πόλωση της ακτινοβολίας.

παρεμβολή κατάλληλης κάρτας (A/D card, τύπου DAS-16, Omega Engineering Inc., Stamford Connecticut, USA). Τα συγκριτικά πλεονεκτήματα της αυτοματοποίησης αυτής τόσο για τη λήψη, όσο και για την επεξεργασία των φασμάτων είναι προφανής. Ο έλεγχος του συστήματος καθώς και η ευθυγράμμιση γινόταν με πρότυπα δείγματα κυκλοεξανίου (C_6H_{12}) και βενζολίου (C_6H_6).

Σχήμα 7.1: Σχηματική αναπαράσταση του τμήματος της διάταξης T-64000 της εταιρείας Jobin Yvon.

7.2 Ευέλικτη οργανολογία Raman (532 nm)

Το συγκεκριμένο σύστημα φασματοσκοπίας Raman (Σχήμα 7.2) σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε σε συνεργασία τις Jobin Yvon & Dilor και το τμήμα τεχνικής υποστήριξης του ΕΙΧΗΜΥΘ.

Στη διάταξη αυτή εφαρμόζεται η γεωμετρία σκέδασης 180° . Τα βασικά τμήματα της αποτελούνται από:

- Την κεφαλή Raman με την πηγή laser και όλα τα οπτικά που αυτή διαθέτει.
- Τον μονοχρωμάτορα με το σύστημα ανίχνευσης και την οπτική ίνα.
- Το τροφοδοτικό της πηγής laser μαζί με τα ηλεκτρονικά ελέγχου.

Χρησιμοποιήθηκε laser στερεάς κατάστασης Nd:YAG που λειτουργεί με διπλασιασμό συχνότητας στα 532 nm και είναι τοποθετημένο μέσα στην «κεφαλή» Raman. Η ένταση της εξερχόμενης από αυτό ακτινοβολίας είναι 60 mW. Δυνατότητα επιλογής χαμηλότερης έντασης γίνεται με την κατάλληλη χρησιμοποίηση ενός από τα έξι φίλτρα μείωσης της ισχύς της ακτινοβολίας (neutral density filters) που είναι τοποθετημένα περιφερειακά σε ηλεκτρονικά περιστρεφόμενο τροχό που περιέχει εννέα θέσεις με δυνατότητα επιλογής μεταξύ 60, 30, 15, 6, 0.6, 0.06 και 0.006 mW. Για την επίτευξη μετρήσεων σε γεωμετρία σκέδασης 180° χρησιμοποιήθηκε κατάλληλα τοποθετημένος καθρέπτης και πρίσμα ορθής γωνίας μικρών διαστάσεων, τοποθετημένο πριν από τον αντικειμενικό φακό. Ο αντικειμενικός φακός που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις είναι ο 50x, 0,55 μεγάλης εστιακής απόστασης (10 mm) της εταιρείας Olympus. Μεταξύ πρίσματος και αντικειμενικού φακού υπάρχει διαχωριστής δέσμης (beam splitter), ο οποίος χρησιμοποιείται στην περίπτωση που χρειαστεί να γίνει παρατήρηση της επιφάνειας του δείγματος και της ποιότητας της εστίασης. Ο διαχωριστής δέσμης έχει την ικανότητα να αφήνει μέρος της έντασης της ακτινοβολίας laser να εστιάσει στο δείγμα. Επιπλέον επιτρέπει λευκό φως προερχόμενο από λάμπα να φωτίσει το δείγμα. Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία διέρχεται πρώτα από το φίλτρο Notch για την απόρριψη της ελαστικής σκέδασης Rayleigh πριν την εισαγωγή της στην οπτική ίνα, διαμέτρου 100 μm , που επιτρέπει τη διέλευση φωτονίων που αποτελούν το φάσμα Raman από 150 cm^{-1} και πάνω, όταν η διεγείρουσα ακτινοβολία έχει μήκος κύματος 532 nm. Μετά την έξοδο από την οπτική ίνα η ακτινοβολία εισέρχεται σε μονοχρωμάτορα με εστιακή απόσταση 28 cm. Το σύστημα χρησιμοποιεί ένα κοίλο φράγμα περίθλασης (grating) 920 grooves/mm που μονοχρωματίζει και εστιάζει ταυτόχρονα την ακτινοβολία σε έναν ανιχνευτή. Ο τελευταίος είναι μια δύο διαστάσεων κάμερα CCD με 1024×256 pixels Si που ψύχεται θερμοηλεκτρονικά στους 211 K με επίπεδο κορεσμού τα 32000 counts. Ο έλεγχος της συσκευής γίνεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού.

Σχήμα 7.2: Φωτογραφία της ευέλικτης κεφαλής της διάταξης *micro-Raman*

7.3 Τεχνικές μετασχηματισμού Raman

Η κλασσική διάταξη των τεχνικών μετασχηματισμού Raman στηρίζεται πλέον στο συμβολόμετρο διπλής δέσμης που σχεδιάστηκε από τον Michelson το 1891, το οποίο φαίνεται στο σχήμα 7.3 και χρησιμοποιείται για τον μονοχρωματισμό της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Η δέσμη από την πηγή προσπίπτει σε έναν 50/50 διαχωριστή δέσμης. Το μισό της ακτινοβολίας διέρχεται και το άλλο μισό ανακλάται. Η ανακλώμενη μετά από μια απόσταση L , προσπίπτει σε καθρέπτη $M1$ και ανακλάται προς τα πίσω σε απόσταση L όπου συναντά και πάλι τον διαχωριστή δέσμης. Η δέσμη που διέρχεται από τον διαχωριστή, ακολουθεί πορεία ίσου μήκους L , επιπλέον ο καθρέπτης $M2$ μπορεί να κινηθεί κατά μήκος του οπτικού άξονα σε απόσταση x . Για το λόγο αυτό το συνολικό μήκος που διατρέχει ακτινοβολία είναι $2(L+x)$. Όταν οι δύο δέσμες ξανασυναντιούνται στον διαχωριστή δέσμης έχουν διανύσει οπτικά μονοπάτια που διαφέρουν κατά $\Delta=2x$. Η δέσμη στη συνέχεια εστιάζεται στον ανιχνευτή όπου σχηματίζεται σχήμα που ονομάζεται συμβολόγραμμα. Στην έξοδο του οργάνου υπάρχει ειδική ηλεκτρονική πλακέτα που κάνει αυτόματο μετασχηματισμό Fourier του μετρούμενου σήματος έτσι ώστε το τελικό αποτέλεσμα να περιέχει ζευγάρια (f, I) όπου f η συχνότητα που μπορεί να γραφεί και στη συνήθη

μορφή μονάδων μέτρησης δηλαδή cm^{-1} . Η βασική σχέση που συνδέει την ένταση του ανιχνευτή $I(x)$, με την ένταση του φάσματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος $\bar{\nu}$, δίνεται από το μέγεθος $B(\bar{\nu})$:

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} I(x) \cos 2\pi \bar{\nu} x dx \quad (7.1)$$

Σχήμα 7.3: (A) Σχηματικό διάγραμμα του συμβολόμετρου Michelson, (B) το σήμα που καταγράφει ο ανιχνευτής – συμβολόγραμμα και (C) το φάσμα που λαμβάνεται μετά τον μετασχηματισμό Fourier του συμβολογράμματος. M_1 : σταθερός καθρέπτης, x : μετατόπιση του καθρέπτη M_2 .

Όλα τα φασματοφωτόμετρα μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιούν δευτερεύουσα μονοχρωματική δέσμη φωτός He-Ne για τον έλεγχο και τη μέτρηση της διαφοράς του οπτικού δρόμου Δ (η θέση του μετακινούμενου καθρέπτη μπορεί να καθοριστεί με ακρίβεια $0,005 \mu\text{m}$).

7.3.1 Raman μετασχηματισμού Fourier (FT-Raman)

Η φασματοσκοπία Raman μετασχηματισμού Fourier είναι ένας από τους πλέον αναπτυσσόμενους τομείς, μετά την φασματοσκοπία Raman με τη χρήση ακτινοβολίας laser στο κοντινό υπέρυθρο. Οι Chantru et al πρώτοι πρότειναν την τεχνική το 1964.³ Στις συνήθεις διατάξεις φασματοσκοπίας Raman χρησιμοποιείται διεγείρουσα δέσμη Laser στο ορατό, ενώ στις διατάξεις FT-Raman χρησιμοποιείται

διεγείρουσα ακτινοβολία κοντά στο υπέρυθρο. Η ακτινοβολία με ορατή ακτινοβολία συχνά προκαλεί φαινόμενα φθορισμού που προέρχονται είτε από το δείγμα είτε από προσμείξεις. Το πρόβλημα αυτό περιορίζεται με τη χρήση διόδου laser (neodymium yttrium aluminium garnet Nd:YAG) στα 1064 nm (9395 cm^{-1}) καθώς σε αυτό το μήκος κύματος κοντά στο υπέρυθρο δεν προκαλείται σχεδόν καμία ηλεκτρονική μετάπτωση.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος FT-Raman της εταιρείας Bruker μοντέλο FRA-106/S που φαίνεται στο σχήμα 7.5. Η δέσμη του laser εστιάζεται πάνω στο δείγμα σε περιοχή διαμέτρου 100 μm και συλλέγεται είτε σε γεωμετρία 90° είτε 180° . Η μέγιστη ένταση του laser στο δείγμα ανέρχεται στα 500 mW. Το σκεδαζόμενο φως συλλέγεται από σφαιρικό φακό και διέρχεται μέσα από φίλτρο για την απόρριψη του σήματος που προέρχεται από σκέδαση Rayleigh (έτσι συλλέγονται σήματα Stokes συχνοτήτων από 50 μέχρι 3500 cm^{-1} καθώς και σήματα anti Stokes από 100 μέχρι 1500 cm^{-1}). Στη συνέχεια, η σκεδαζόμενη ακτινοβολία Raman διοχετεύεται στο συμβολόμετρο όπου χρησιμοποιείται διαχωριστής δέσμης CaF_2 και τέλος συλλέγεται από ανιχνευτή (Ge) ψυχώμενο με υγρό άζωτο. Το φάσμα FT-Raman δημιουργείται από το συμβολόγραμμα (το σήμα που καταγράφεται από τον ανιχνευτή).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ένταση Raman είναι ανάλογη της τέταρτης δύναμης της συχνότητας της μονοχρωματικής διεγείρουσας δέσμης σύμφωνα με την εξίσωση 2.13, η ευαισθησία του φαινομένου μειώνεται όταν χρησιμοποιείται ακτινοβολία διέγερσης στο υπέρυθρο σε αντίθεση με ορατή ακτινοβολία. Αυτό το μειονέκτημα όμως αντισταθμίζεται με τη χρήση της εξόδου της φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier που έχει την ικανότητα ανίχνευσης μικρών σημάτων.

Σχήμα 7.5: Σχηματικό διάγραμμα του Bruker FRA 106 και δεξιά ο χώρος που τοποθετείται το δείγμα.

7.4 Οργανολογία UV-Raman (HR-800)

Η διάταξη HR-800 της JY-Horiba συνίσταται:

- Σε ένα laser He-Cd που επιτρέπει τη διέγερση των δειγμάτων με τη μονοχρωματική ακτινοβολία στα 325 και 441,6 nm.
- Από ένα τρένο οπτικών στοιχείων που κατευθύνουν τη δέσμη laser μέσω ενός μικροσκοπίου επί του δείγματος. Το σύστημα για τη μέτρηση σε υγρά δίνει τη δυνατότητα χρησιμοποίησης συμβατικού φακού που εστιάζει τη δέσμη στο διάλυμα στρέφοντας την διαδρομή της κατά 90°.
- Ένα φίλτρο απόρριψης στενής φασματικής περιοχής (notch filter), το οποίο χρησιμοποιείται ταυτόχρονα ως τελευταίο οπτικό μέσο που κατευθύνει τη διεγείρουσα ακτινοβολία μέσω του φακού εστίασης στο δείγμα και ως το πρώτο οπτικό μέσο που δέχεται τη σκεδαζόμενη ακτινοβολία και την καθαρίζει από την ελαστική σκέδαση Rayleigh μετά τη συλλογή της από τον ίδιο φακό.
- Ένα υψηλής διακριτικής ικανότητας φασματογράφο εστιακής απόστασης 800 mm.
- Ένα υψηλής ευαισθησίας ανιχνευτή CCD ψυχώμενου στους 77 K.

Το σύστημα θεωρητικά είναι δυνατόν να παρουσιάσει δύο βασικά πλεονεκτήματα.

- Την ενδυνάμωση του φαινομένου Raman λόγω συντονισμού, με τη διέγερση εντός ζώνης απορρόφησης των υλικών, κάτι που συμβαίνει για τις περισσότερες μοριακές μονάδες που απορροφούν προς το UV.
- Τη μετατόπιση του φθορισμού σε υψηλότερα των φωτονίων Raman μήκη κύματος, μένοντας έξω από όλο ή ένα μεγάλο μέρος του φάσματος Raman.

7.5 Φασματοφωτόμετρο Απορρόφησης Hitachi 220s.

Για τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο (ΦΦΜ) Hitachi 220s, διπλής δέσμης. Το όργανο χρησιμοποιεί ως φωτεινή πηγή, λάμπα βολφραμίου για την ορατή περιοχή (900-350 nm) και λάμπα δευτερίου για την περιοχή του υπεριώδους (350-190 nm). Για το διαχωρισμό της ακτινοβολίας χρησιμοποιεί φράγμα (grating).

Στο σχήμα 7.6 φαίνεται σχηματικά η γενική αρχή λειτουργίας του ΦΦΜ διπλής δέσμης. Το συγκεκριμένο σύστημα είναι αρκετά αυτοματοποιημένο, πολύ απλό στο χειρισμό, προσφέροντας ταυτόχρονα τη δυνατότητα επιλογής των συνθηκών κάτω

από τις οποίες πραγματοποιούνται τα πειράματα. Βασικές παράμετροι που μπορούν να ρυθμιστούν είναι το είδος του φάσματος (απορρόφηση ή διαπερατότητα), η ταχύτητα σάρωσης και η φασματική περιοχή.

Σχήμα 7.6: Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης με περιστρεφόμενους καθρέπτες.

Αναφορές

- 1 Soto A, Iconomopoulou S, Manikas A, Voyiatzis G. Molecular orientation of Poly(ethylene terphthalate), PET and Poly(butylene terephthalate), PBT: a parallel study. Appl Spectrosc 2005;59:1257-1269.
- 2 Voyiatzis G, Kalampounias A, Papatheodorou G. The structure of molten mixtures of iron (III) chloride with cesium chloride. Physical Chemistry/Chemical Physics 1999;1/20:4797-4804.
- 3 Chantry, G., Gebbie, H., Helsum, C. Interferometric Raman Spectroscopy, using infrared excitation, Nature 1964;203:1052.

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Οι ουσίες που αρχικά προτάθηκαν για μελέτη σε αυτήν την εργασία αποτελούνται από πέντε αντιβιοτικά (ceftazidime, amphotericin B, amikacin sulfate, ciprofloxacin, vancomycin), δύο αντιγλαυκωματικά (dorzolamide, latanoprost) και τρεις φυσιολογικές ουσίες (glucose, lactate, glutamate). Οι ουσίες αυτές επιλέχθηκαν γιατί είναι μείζονος ιατρικού ενδιαφέροντος από την μία και από την άλλη οι δομές τους φαίνεται να περιέχουν δονήσεις που είναι ενεργές στη φασματοσκοπία Raman. Τα φάρμακα είναι ευρείας χρήσης με μεγάλη εμπορική επιτυχία, ενώ οι φυσιολογικές ουσίες αναφέρεται ότι είναι υπεύθυνες για ασθένειες όπως ο διαβήτης (γλυκόζη, γαλακτικό οξύ), το γλαύκωμα και η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (γλουταμικό οξύ). Η γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ έχει βρεθεί ότι σε διαβητικούς ασθενείς αυξάνουν τα επίπεδά τους στο πλάσμα και κατ' επέκταση στο υδατοειδές κατά το ίδιο ποσοστό.¹ Το γλουταμικό οξύ χρησιμοποιείται σαν δείκτης για το γλαύκωμα και τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια.² Από αυτές τις ουσίες διεξοδικά μελετήθηκαν οι 5, ενώ οι υπόλοιπες απορρίφθηκαν και οι λόγοι αναφέρονται στη συνέχεια του κεφαλαίου.

Για να επιλεγεί η ιδανική ακτινοβολία και οργανολογία για την βιοιατρική εφαρμογή της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε μια σειρά από προκαταρκτικά πειράματα. Σε αυτά συγκαταλέγονται φάσματα UV-Vis απορρόφησης για να ελεγχθεί αν κάποια από τις ουσίες που επρόκειτο να μελετηθούν απορροφά σε μήκη κύματος που αντιστοιχούν σε γραμμές laser, για να γνωρίζουμε αν ενδέχεται να παρουσιάσουν φαινόμενα Resonance Raman ή /και φθορισμού. Όταν κάποια ουσία που βρίσκεται μέσα στον οφθαλμό παρουσιάζει φαινόμενο Resonance Raman δίνει από τη μία τη δυνατότητα ανίχνευσής της σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, όμως από την άλλη μπορεί να προκαλέσει κάποιες ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως η υπερθέρμανση και η πρόκληση κάποιας μόνιμης βλάβης του ευπαθούς βιολογικού ιστού. Στην περίπτωση που η ουσία φθορίζει μπορεί να προκληθεί βλάβη στο βιολογικό σύστημα λόγω απορρόφησης ακτινοβολίας, ενώ επιπρόσθετα το φάσμα

που λαμβάνεται στο φασματοφωτόμετρο έχει τη μορφή συνεχούς υποστρώματος που επικαλύπτει τις όποιες δομικές πληροφορίες.

Φάσματα των προς εξέταση ουσιών - αντιβιοτικών, αντιγλαυκωματικών και φυσιολογικών ουσιών - μελετήθηκαν σε δύο συστήματα που υπάρχουν στο εργαστήριο και δίνουν τη δυνατότητα διέγερσης τους με μονοχρωματική ακτινοβολία laser στα 325 και 441.6 nm το ένα (HR-800) και στα 514,5 nm το άλλο (T-64000).

Για να επιλεγεί ποιο σύστημα συμφέρει να χρησιμοποιηθεί στην βιοιατρική εφαρμογή της παρούσας εργασίας, λήφθηκαν και τα φάσματα δύο ενδογενών ιστών του οφθαλμού (φακού και κερατοειδή) καθώς και του υδατοειδές υγρού σε κάθε μία από τις τρεις γραμμές διέγερσης.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της κάθε ουσίας καθώς επίσης τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα του κάθε συστήματος στα τρία διαφορετικά lasers, καταλήξαμε στη χρήση του ενός.

8.1 Οι χημικές ουσίες

Οι χημικές δομές των φαρμάκων και των φυσιολογικών ουσιών που προτάθηκαν αρχικά για μελέτη φαίνονται στους πίνακες IIX.I και IIX.II.

Πίνακας IIX.I: Χημικές δομές φαρμακευτικών ουσιών και η φαρμακοθεραπευτική κατηγορία τους.

Εμπορική ονομασία	Δραστική Ουσία	Φαρμακοθεραπευτική κατηγορία	Χημική Δομή
Solvetan	Κεφταζιδίμη	Αντιβιοτικό
Fungizone	Αμφοτερισίνη Β	Αντιβιοτικό
Briklin	Θειική Αμικασίνη	Αντιβιοτικό

Cipro	Σιπροφλοξασίνη	Αντιβιοτικό
Voncon	Βανκομυκίνη	Αντιβιοτικό
Trusopt	Δορζολαμίδη	Αντιγλαυκωματικό
Xalatan	Λατανοπρόστη	Αντιγλαυκωματικό

Πίνακας ΙΙΧ.ΙΙ: Χημικές δομές φυσιολογικών ουσιών και οι ασθένειες που η καθεμία δεικτοδοτεί.

Δραστική Ουσία	Ασθένειες	Χημική Δομή
Γλυκόζη	Διαβήτη
Γαλακτικό οξύ	Διαβήτη
Γλουταμικό οξύ	Γλαύκωμα, Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

8.2 Παρασκευή Δειγμάτων

Για την παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων των φαρμάκων και των φυσιολογικών ουσιών, απεσταγμένο νερό και ποσότητα των προς εξέταση ουσιών προστέθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες διαμέτρου 15 mm για τη γραμμή laser 514,5 nm και σε ορθογώνιες κυψελίδες quartz (1X1cm) για τις άλλες δύο γραμμές. Οι κυψελίδες quartz χρησιμοποιήθηκαν διότι στο UV το γυαλί από το οποίο είναι κατασκευασμένοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες, απορροφά. Ακολουθούσε ανάδευση ώστε να εξασφαλισθεί η ομοιογένεια των διαλυμάτων.

Ο φακός, ο κερατοειδής και το υδατοειδές υγρό προήλθαν από χοιρινούς οφθαλμούς μετά από εγχειρητικό διαχωρισμό τους. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται με περισσότερες λεπτομέρειες στο κεφάλαιο 10 όπου και γίνεται εκτενής μελέτη των φασματικών χαρακτηριστικών των τριών αυτών στοιχείων του οφθαλμού.

8.3 Πειραματικές Διατάξεις

Για τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης στο UV και στο ορατό χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης 220s της Hitachi, στην φασματική περιοχή 550 με 200 nm.

Για τη λήψη των φασμάτων Raman χρησιμοποιήθηκε το σύστημα HR-800 της Horiba-JY με laser He-Cd της Kimmon electric Co. που επιτρέπει τη διέγερση των δειγμάτων με ενέργεια 325 και 441.6 nm. Η διάταξη αυτή χρησιμοποιήθηκε σε γεωμετρία σκέδασης 180° όπως φαίνεται στο σχήμα 8.1A. Ο φακός που χρησιμοποιείται για την εστίαση της δέσμης και την συλλογή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι μεγάλης εστιακής απόστασης (4 cm) και ενδείκνυται για την λήψη φασμάτων από υγρά δείγματα. Η ισχύς του laser στα 441.6 nm ήταν ~3.5 mW και στα 325 nm, ~0,5 mW.

Τα φάσματα στο σύστημα T-64000 με γραμμή laser στα 514,5 nm (κεφ. 7) λήφθηκαν σε γεωμετρία σκέδασης 90° , όπως φαίνεται στο σχήμα 8.1B. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιείχαν τα διαλύματα τοποθετούνταν με κατάλληλη στήριξη στο κοινό σημείο εστίασης του φακού εστίασης της δέσμης στο δείγμα καθώς και του φακού συλλογής. Η ισχύς του laser που χρησιμοποιήθηκε ήταν 25 mW. Η ελάχιστη διάμετρος συγκλίνουσας δέσμης και για τις τρεις γραμμές laser είναι 1 mm. Στα φάσματα των ουσιών που παρουσιάζονται, ο χρόνος λήψης για σύγκριση επιλέχθηκε στο 1 s.

Και τα δύο συστήματα δίνουν τη δυνατότητα αύξησης του λόγου του σήματος προς το θόρυβο του ασθενούς σήματος Raman, με σύζευξη (“binning”) των εικονοστοιχείων του ανιχνευτή CCD. Η σύζευξη αυτή κατά μήκος του x-άξονα των εικονοστοιχείων του CCD ανιχνευτή βελτιώνει το λόγο σήματος /θορύβου, συνδυάζοντας την φόρτιση γειτονικών εικονοστοιχείων και αυξάνοντας την ένταση κατά ένα παράγοντα ανάλογο του αριθμού των εικονοστοιχείων που συζευγνύονται. Ο κατάλληλος παράγοντας “binning” επιλέγεται έτσι ώστε να επιτυγχάνεται ο συγκεκριασμός μεγιστοποίησης του λόγου σήματος/ θορύβου και ταυτόχρονα να διατηρείται ικανοποιητικά η διακριτική ικανότητα του οργάνου. Όταν εφαρμόζεται όμως η τεχνική binning για μικρής έντασης σήματα, οι μετρήσεις Raman πρέπει να επαναλαμβάνονται με μετακίνηση της θέσης του μονοχρωμάτορα, έτσι ώστε να διαφοροποιείται τυχόν επανυξημένο σήμα λόγω binning που προέρχεται από μεγενθυμένο θόρυβο.

Για τη λήψη των φασμάτων του φακού, του κερατοειδούς και του υδατοειδούς υγρού χρησιμοποιήθηκε αντικειμενικός φακός 10x με εστιακή απόσταση 5 mm στο σύστημα HR-800, ενώ στο σύστημα T-64000 οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στη γεωμετρία σκέδασης 90° , με χρήση κατάλληλης βάσης για τη στήριξη των ιστών.

Σχήμα 8.1: Α) Γεωμετρία σκέδασης 180° στο σύστημα HR-800. Β) Γεωμετρία σκέδασης 90° στο σύστημα T64000.

8.4 Μελέτη Απορρόφησης στο UV και το ορατό

Από τα φάσματα απορρόφησης των ουσιών αμφοτερισίνη Β και σιπροφλοξασίνη (Σχήμα 8.2α) φαίνεται ότι οι ουσίες αυτές απορροφούν στις περιοχές από 425 μέχρι 200 nm και από 400 μέχρι 200 nm αντίστοιχα. Και τα δύο φάρμακα είναι πιθανό να δώσουν φαινόμενο resonance Raman όταν ακτινοβοληθούν με τη δέσμη Laser στα 325 nm.

Στο σχήμα 8.2β παραθέτονται τα φάσματα απορρόφησης της θειικής αμικασίνης, της βανκομυκίνης και της κεφαζιδίμης. Οι δύο πρώτες ουσίες δεν απορροφούν στην περιοχή από 300 nm και πάνω. Η κεφαζιδίμη όμως παρουσιάζει ζώνη απορρόφησης που ξεκινάει από τα 330 nm, για το λόγο αυτό είναι πιθανό να παρουσιάζει φαινόμενο pre-resonance Raman όταν ακτινοβοληθεί με τη γραμμή laser στα 325 nm.

Τα αντιγλαυκωματικά και οι φυσιολογικές ουσίες δεν παρουσιάζουν απορρόφηση στην περιοχή τουλάχιστον μέχρι τα 300 nm όπου αρχίζει να απορροφά το γαλακτικό οξύ (Σχήμα 8.2γ και 8.2δ).

Σχήμα 8.2: Φάσματα απορρόφησης α) αμφοτερισίνης B και σιπροφλοξασίνης β) κεφαζιδίμης, βανκομυκίνης και θειικής αμικασίνης. γ) των αντιγλαυκωματικών δορζολαμίδης και λατανοπρόστη. δ) των φυσιολογικών ουσιών γλυκόζη, γαλακτικό οξύ και γλουταμινικό οξύ.

8.5 Φασματοσκοπική Μελέτη των υδατικών διαλυμάτων των ουσιών με γραμμή διέγερσης 325, 441.6 και 514.5 nm.

Το φάσμα της κεφαταζιδίμης ανιχνεύεται στα υδατικά διαλύματα από την πιο έντονη κορυφή της που παρατηρείται στους 1590 cm^{-1} . Με ακτινοβολήση στο UV (325 nm) η ουσία ανιχνεύεται σε συγκέντρωση μέχρι και $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ (Σχήμα 8.3α) ενώ στα φάσματα που λήφθηκαν με την 441.6 και την 514.5 διακρίνεται μέχρι και η συγκέντρωση των $0,5\text{ mg/mL}$ (Σχήμα 8.3β και 8.3γ). Η διαφορά αυτή πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι το μόριο της κεφαταζιδίμης αρχίζει να απορροφά στην περιοχή των 330 nm με αποτέλεσμα να εμφανίζει φαινόμενο pre-resonance όπως προαναφέρθηκε.

Σχήμα 8.3: Φάσματα Raman των υδατικών διαλυμάτων της κεφαταζιδίμης στις τρεις γραμμές διέγερσης.

Το μόριο της αμφοτερισίνης Β παρουσιάζει την πιο έντονη χαρακτηριστική της κορυφή στους 1554 cm^{-1} κάτι που τη διακρίνει στα υδατικά της διαλύματα. Η ουσία παρουσιάζει φαινόμενο συντονισμού Raman όταν διεγερθεί με Laser στα 325 nm και μπορεί να ανιχνευτεί σε συγκέντρωση $0,5\text{ }\mu\text{g/mL}$ χρησιμοποιώντας παράγοντα binning 4 (Σχήμα 8.4α). Διεγείροντας την ουσία με ενέργεια $441,6\text{ nm}$ και

514,5 nm είναι δυνατόν να διακριθεί σε συγκέντρωση 3 και 9 $\mu\text{g/mL}$ αντίστοιχα (Σχήμα 8.4β και 8.4γ).

Σχήμα 8.4: Φάσματα Raman των υδατικών διαλύμάτων του μορίου της αμφοτερισίνης B στις τρεις γραμμές διέγερσης.

Η θειική αμικασίνη ανιχνεύεται από την κορυφή που παρουσιάζει το μόριο της στους 984 cm^{-1} . Από τα αποτελέσματα της απορρόφησης της προηγούμενης παραγράφου, η ουσία δεν απορροφά στο UV και το ορατό. Το φάσμα της είναι διακριτό σε συγκέντρωση 1 mg/mL με διέγερση στα 325, 441.6 και 514,5 nm (Σχήμα 8.5α, 8.5β και 8.5γ) όμως στη τελευταία περίπτωση τα φάσματα εξομαλύνθηκαν με παράγοντα σύζευξης 4 (binning).

Σχήμα 8.5: Φάσματα Raman των υδατικών διαλύμάτων του μορίου της θειικής αμικασίνης στις τρεις γραμμές διέγερσης.

Η κύρια κορυφή σκέδασης των μορίων της σιπροφλοξασίνης είναι στους 1393 cm^{-1} . Η ουσία όπως προαναφέρθηκε απορροφά στην περιοχή που μελετάμε. Φθορίζει όταν ακτινοβοληθεί με φωτόνια ενέργειας 325 nm, ενώ παρουσιάζει φαινόμενο συντονισμού Raman όταν διεγερθεί με laser στα 441.6 nm, όπου η ελάχιστη συγκέντρωση που ανιχνεύτηκε ήταν $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ (Σχήμα 8.6α). Στο laser αργού η ουσία διακρίνεται σε υδατικό διάλειμμα συγκέντρωσης μέχρι $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ (Σχήμα 8.6β).

Σχήμα 8.6: Φάσματα Raman των υδατικών διαλύμάτων του μορίου της σιπροφλοξασίνης στις γραμμές διέγερσης 441.6 και 514,5nm.

Η βανκομυκίνη, που η δομή της φαίνεται στον πίνακα Χ.Ι, δεν παρουσιάζει έντονες χαρακτηριστικές κορυφές στα φάσματα των υδατικών της διαλυμάτων με καμία από τις τρεις γραμμές ακτινοβολήσης της παρούσας εργασίας ακόμη και σε μεγάλες συγκεντρώσεις.

Το φάσμα Raman του υδατικού διαλύματος της δορζολαμίδης παρουσιάζει έντονη χαρακτηριστική κορυφή με επίκεντρο τους 1423 cm^{-1} . Η ουσία μέσω της χαρακτηριστικής της συχνότητας διακρίνεται εύκολα σε συγκεντρώσεις 20 μg/mL και 40 μg/mL όταν διεγερθεί με ενέργεια 325 nm και 441.6 nm αντίστοιχα σε συνδυασμό με παράγοντα binning 3 (Σχήμα 8.7α και 8.7β). Στο τρίτο laser (514,5nm) και κατ' επέκταση σε γεωμετρία 90° όπως φαίνεται στο σχήμα 8.1β, η χαρακτηριστική κορυφή της ουσίας διακρίνεται σε συγκέντρωση 60 μg/mL (Σχήμα 8.7γ).

Το δεύτερο αντιγλαυκωματικό που εξετάσαμε, η λατανοπρόστη, όπως φαίνεται από το φάσμα του υδατικού διαλύματος της ουσίας με διέγερση στα 325 nm παρουσιάζει τρεις περίπου ίσης έντασης χαρακτηριστικές κορυφές στα 885, 1004 και 1090 cm^{-1} . Παρόλο που η ουσία φθορίζει σε αυτή τη γραμμή του laser, σε μεγάλο χρόνο έκθεσης (60s) διακρίνεται το χαρακτηριστικό της φάσμα σε συγκέντρωση 50 μg/mL (Σχήμα 8.8α). Η ίδια συγκέντρωση της ουσίας διακρίνεται και με τη χρήση των άλλων δύο lasers όπως φαίνεται στα φάσματα του σχήματος 8.8β με παράγοντα binning 3 και 8.8γ με παράγοντα binning 4.

Σχήμα 8.7: Φάσματα Raman των υδατικών διαλυμάτων του μορίου της δορζολαμίδης στις τρεις γραμμές διέγερσης.

Σχήμα 8.8: Φάσματα Raman των υδατικών διαλυμάτων του μορίου της λατανοπρόστης στις τρεις γραμμές διέγερσης.

Στη συνέχεια παρατίθεται ο συγκριτικός πίνακας (πίνακας IIX.III) που δίνει την κατώτερη περιοχή συγκεντρώσεων που μπορεί κάθε φάρμακο να ανιχνευτεί στις τρεις γραμμές lasers.

Πίνακας IIX.III: Όρια ανίχνευσης των φαρμακευτικών ουσιών και στις τρεις γραμμές διέγερσης.

Ελάχιστα όρια ανίχνευσης			
Ουσία	325nm	442nm	514,5nm
Αμφοτερισίνη B	0,5μg/mL 1s 4b	3μg/mL 1s	5μg/mL 1s
Κεφαζιδίμη	5μg/mL 1s 3b	0,5mg/mL 1s	0,5mg/mL 1s 4b
Αμικασίνη	1mg/mL 1s	1mg/mL 1s	1mg/mL 1s 4b
Σιπροφλοξασίνη	φθορίζει	2μg/mL 1s 3b	70μg/mL 4s 4b
Δορζολαμίδη	20μg/mL 1s 3b	40μg/mL 1s 3b	60μg/mL 1s
Λατανοπρόστη	φθορίζει (50μg/mL)	50μg/mL 1s 3b	50μg/mL 1s 4b
Βανκομυκίνη	Δεν παρουσιάζει χαρακτηριστικές κορυφές Raman σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων		

Διέγερση των ιστών του οφθαλμού κερατοειδή, φακού και υδατοειδές υγρού με ενέργεια 325 nm οδηγεί σε φαινόμενα φθορισμού όπως φαίνεται στο σχήμα 8.9α. Ενώ με μικρότερη ενέργεια (441.6 & 514,5nm) δε παρουσιάζουν ιδιαίτερα προβλήματα φθορισμού, όπως προκύπτει από τα φάσματα του σχήματος 8.9β και 8.9γ.

Σχήμα 8.9: Φάσματα Raman του φακού, του κερατοειδή και του υδατοειδούς υγρού χοιρινών οφθαλμών στις τρεις γραμμές διέγερσης. Για διέγερση στα 514.5 nm δίνονται ξεχωριστά τα φασματικά παράθυρα χαμηλών και υψηλών συχνοτήτων

Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα των υδατικών διαλυμάτων των τριών φυσιολογικών ουσιών, της γλυκόζης, του γαλακτικού οξέως και του γλουταμικού οξέος που μετρήθηκαν με πηγή διέγερσης στα 514,5 nm. Τα φάσματα τους παρουσιάζονται στα σχήματα 8.10, 8.11, και 8.12. Έχουν ληφθεί σε συγκεντρώσεις και χρόνο μέτρησης ώστε να αναδεικνύονται τα φασματικά χαρακτηριστικά της κάθε ουσίας όσο το δυνατόν καλύτερα. Το φάσμα της γλυκόζης σε συγκέντρωση 40 mg/mL παρουσιάζει κορυφές στις χαμηλές και τις υψηλές συχνότητες με πιο έντονη, τη διπλή κορυφή που εκτείνεται από 2800 μέχρι 3100 cm^{-1} περίπου (Σχήμα 8.10)

Σχήμα 8.10: Φάσμα υδατικού διαλύματος γλυκόζης χρησιμοποιώντας την ακτινοβολία διέγερσης στα 514,5nm (α) σε μεγάλο φασματικό παράθυρο, (β) στις χαμηλές συχνότητες και (γ) στις υψηλές συχνότητες.

Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέως στο σχήμα 8.11 είναι 850 mg/mL. Η πιο έντονη κορυφή και αυτής της ουσία παρουσιάζεται σε συχνότητες 2800 με 3100cm⁻¹.

Σχήμα 8.11: Φάσμα υδατικού διαλύματος γαλακτικό οξύς χρησιμοποιώντας την ακτινοβολία διέγερσης στα 514,5nm (α) σε μεγάλο φασματικό παράθυρο, (β) στις χαμηλές συχνότητες και (γ) στις υψηλές συχνότητες.

Το γλουταμικό οξύ παρουσιάζει την πιο έντονη κορυφή του στις υψηλές συχνότητες (Σχήμα 8.12). Παρόλα αυτά τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του δεν είναι τόσο έντονα όσο των άλλων δύο φυσιολογικών ουσιών (γλυκόζη, γαλακτικό οξύ).

Σχήμα 8.12: Φάσμα υδατικού διαλύματος γλουταμινικού οξέος χρησιμοποιώντας την ακτινοβολία διέγερσης στα 514,5nm (α) σε μεγάλο φασματικό παράθυρο, (β) στις χαμηλές συχνότητες και (γ) στις υψηλές συχνότητες.

8.6 Συμπεράσματα-Συζήτηση

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ώστε να επιλεγούν αφενός μεν οι ουσίες που τελικά μελετήθηκαν διεξοδικότερα αλλά και για να οδηγηθούμε μέσω μιας σειράς συλλογισμών στην ιδανικότερη διάταξη για τη συγκεκριμένη εφαρμογή. Ο πίνακας ΙΙΧ.ΙV περιέχει τα μειονεκτήματα και τα πλεονεκτήματα της κάθε διάταξης για την εκάστοτε γραμμή διέγερσης.

Πίνακας IIX.IV: Συγκριτικός πίνακας των δύο συστημάτων με τις τρεις γραμμές διέγερσης.

	HR-800 325nm	HR-800 441,6nm	T-64000 514,5nm
Όρια ανίχνευσης	Χαμηλά	Συγκρίσιμα	
Resonance Raman	✓	✓	X
Γεωμετρία Σκέδασης	180°	180°	90°
MPE	5,6mJ/mm ² Χρησιμοποιήσαμε: 0,64mJ/mm ² t=1sec P=0,5mW	0,018mJ/mm ² Χρησιμοποιήσαμε: 4,14mJ/mm ² t=1sec P=3,4 mW	2547 ³ -8000 ⁴ mJ/mm ² Χρησιμοποιήσαμε: 31,8mJ/mm ² t=1sec P=25mW
Φθορισμός	Ενδογενείς ιστοί του οφθαλμού	X	X

Οι παράμετροι που μελετήθηκαν είναι τα όρια ανίχνευσης, η ύπαρξη ή όχι φαινομένων Resonance Raman ή/ και φθορισμού, η γεωμετρία σκέδασης καθώς επίσης εξετάστηκε και αν η ισχύς του laser που χρησιμοποιήσαμε ήταν ασφαλής για τους ιστούς του οφθαλμού.

Βασικό πλεονέκτημα της γραμμής διέγερσης στα 325 nm, είναι ότι στις περισσότερες φαρμακευτικές ουσίες που εξετάσθηκαν επιτεύχθηκαν τα ελάχιστα όρια ανίχνευσης (στα μόρια που δεν φθορίζουν) και μάλιστα χρησιμοποιώντας στην περιοχή του ματιού ισχύ 0,64mJ/mm² για χρόνο έκθεσης 1s και με ισχύς του laser 0,5 mW. Η τιμή αυτή είναι μικρότερη από το ελάχιστο επιβλαβές όριο, που είναι MPE=5,6mJ/mm², για απευθείας εισαγωγή της ακτίνας του laser μέσω της κόρης στον οφθαλμό. Ο φθορισμός όμως των βιολογικών ιστών, που είναι και το βασικό μειονέκτημα, αποθάρρυνε περαιτέρω μελέτες σε αυτό το σύστημα.

Χρησιμοποιώντας γραμμή διέγερσης με φωτόνια ενέργειας 441.6 nm, οι ελάχιστες ποσότητες που ανιχνεύτηκαν για την κάθε φαρμακευτική ουσία είναι συγκρίσιμες με αυτές που επιτεύχθηκαν με διέγερση των ουσιών με φωτόνια ενέργειας 514,5 nm. Μπορεί οι ενδογενείς ιστοί του οφθαλμού να μην φθορίζουν στη συγκεκριμένη γραμμή διέγερσης όμως η ισχύς του laser για χρόνο έκθεσης ενός δευτερολέπτου και ισχύς της δέσμης 3,5 mW (4,14mJ/mm²), υπερβαίνει την τιμή του ελάχιστου επιβλαβούς ορίου που για απευθείας έκθεση του εσωτερικού του ματιού στη δέσμη είναι MPE=0,018mJ/mm².

Χρησιμοποιώντας τη γραμμή laser στα 514,5 nm το βασικό πλεονέκτημα δεν ήταν τόσο τα όρια ανίχνευσης των ουσιών αλλά το ότι το σύστημα T-64000 δίνει τη δυνατότητα φασματοσκοπίας Raman στις 90°, γεωμετρία που θεωρείται ιδανική για τη φασματοσκοπική μελέτη υγρών καθώς αλλάζει το πεδίο εστίασης και συλλογής των σκεδαζόμενων φωτονίων.

Γεννάται στο σημείο αυτό το ερώτημα αν και κατά πόσο είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί γεωμετρία σκέδασης 90° στον οφθαλμό συλλέγοντας σκεδαζόμενη πληροφορία από το υδατοειδές υγρό που περιέχει την ουσία, χωρίς αλληλεπίδραση της δέσμης του laser με ευπαθείς ιστούς του οφθαλμού (φακό και αμφιβληστροειδή). Δηλαδή η δέσμη να εισέλθει στον πρόσθιο θάλαμο από ένα σημείο του οφθαλμού, να τον διασχίσει κάθετα ως προς τον οπτικό άξονα και να εξέλθει από ένα αντιδιαμετρικό σημείο του κερατοειδή. Έτσι, αντί η ισχύς του laser των μετρήσεων να περιορίζεται από τα αυστηρά όρια για την προστασία του αμφιβληστροειδούς ($0,018 \text{ mJ/mm}^2$), θα λαμβάνονται υπόψη τα ελάχιστα επιβλαβή όρια για τον κερατοειδή ($2547^3 - 8000^4 \text{ mJ/mm}^2$), αφού είναι ο μόνος ευπαθής ιστός στη πορεία της δέσμης του laser μέσα στο μάτι. Η ισχύς που υπολογίστηκε στην επιφάνεια του κερατοειδή για χρόνο λήψης 1 s και ισχύ 25 mW ήταν $31,8 \text{ mJ/mm}^2$, τιμή στην περιοχή ασφαλείας του οφθαλμού όταν εκτίθεται με το συγκεκριμένο τρόπο. Οι προσπάθειες προς αυτή την κατεύθυνση παρουσιάζονται στο επόμενο κεφάλαιο.

Οι ουσίες που επιλέχθηκαν για μελέτη είναι τέσσερα αντιβιοτικά και μία φυσιολογική ουσία. Το αντιβιοτικό βανκομυκίνη απορρίφθηκε διότι έχει ασθενές σήμα στο Raman. Τα αντιγλαυκωματικά (δορζολαμίδη και λατανοπρόστη) δεν μελετήθηκαν περαιτέρω και αυτό γιατί χορηγούνται με ενστάλαξη οπότε η ποσότητα που φθάνει στο εσωτερικό του ματιού είναι πολύ μικρή κάτι που δυσχεραίνει το έργο της ανίχνευσής τους, γεγονός που ενισχύεται και από το είδος του φαρμάκου. Πιο συγκεκριμένα, τα αντιγλαυκωματικά για να ελαττώσουν την ενδοφθάλμια πίεση προκαλούν εκροή του υδατοειδούς υγρού με αποτέλεσμα μεγάλο ποσοστό αυτών των φαρμάκων να χάνεται. Από τις φυσιολογικές ουσίες το γαλακτικό οξύ ναι μεν έχει βρεθεί ότι αυξάνεται η συγκέντρωσή της στην ασθένεια του διαβήτη όμως αυτή είναι τρεις φορές μικρότερη από της αντίστοιχη της γλυκόζης. Το γλουταμικό οξύ σε μεγάλη συγκέντρωση δεν έδωσε αρκετά ισχυρό φάσμα Raman κάτι που υποδεικνύει ότι τα ελάχιστα όρια που θα ανιχνεύαμε στο οφθαλμό δεν θα είχαν κάποιο πρακτικό ενδιαφέρον.

Μετά από τον παραπάνω συλλογισμό καταλήξαμε να επιλέξουμε τη διάταξη των T-64000 σε γεωμετρία σκέδασης 90°, για να πραγματοποιήσουμε τα πειράματα σε χοιρινούς οφθαλμούς και οι ουσίες που μελετήθηκαν ήταν 4 αντιβιοτικά (κεφταζιδίμη, αμφοτερισίνη B, θειική αμικασίνη, σιπροφλοξασίνη) και η γλυκόζη.

Αναφορές

- 1 Schrader, WF., Stehberger, B., Meuer, P., The concentration and proportions of lactate and glucose levels in human aqueous humor and blood. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002;43: S.
- 2 Katz, A., Kruger, E., Minko, G., Liu, G., Rosen, R., Alfano, R.. "Detection of Glutamate in the eye by Raman spectroscopy" J. Biomed. Opt. 2003;8:167-72.
- 3 Kremer, I., Even, A., Sandbank, J., Giler, S., Yassur, Y. Effect of green argon (514nm) laser exposure on rose bengal-stained guinea pig cornea. Isr. J. Med. Sci. 1996;32:1243-1248
- 4 Dannheim F, Rassow B. Laser lesions of the anterior segment of the rabbit eye. Studies of cornea, iris, lens and sclera using an argon, ruby and YAG-laser. Albrecht Von Graefes Arch Klein Exp Ophthalmol 1978;205:175-205.

ΝΕΑ ΟΠΤΙΚΗ ΠΡΟΣΟΦΘΑΛΜΙΑ ΔΙΑΤΑΞΗ, ΒΕΛΤΙΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΤΡΟΠΕΣ

Όπως αναφέρθηκε και στο 1^ο κεφάλαιο, σκοπός αυτής της εργασίας είναι η ανάπτυξη μη επεμβατικής και αβλαβούς φασματοσκοπικής μεθόδου για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό φαρμακευτικών (π.χ αντιβιοτικών) αλλά και βιολογικών ουσιών (π.χ γλυκόζης) στο υδατοειδές υγρό του οφθαλμού. Βασικοί παράγοντες για την επιτυχία της παρούσας καθώς και κάθε σχετικής εργασίας, είναι η συλλογή, η ανάλυση και η ανίχνευση όσο το δυνατόν μεγαλύτερου ποσοστού σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το προς εξέταση δείγμα, χρησιμοποιώντας τη μικρότερη δυνατή ισχύ της ακτινοβολίας laser στον ελάχιστο χρόνο μέτρησης. Προκύπτει από τα προηγούμενα η ανάγκη για τη βελτίωση και τη ανάπτυξη κάποιων παραμέτρων όπως:

- Η πλήρης εκμετάλλευση της περιοχής του οφθαλμού που μας παρέχει πληροφορίες.
- Η βελτιστοποίηση των οπτικών και του ανιχνευτή που χρησιμοποιούνται.
- Η μεγιστοποίηση της στερεάς γωνίας συλλογής.

Στο κεφαλαίο αυτό θα περιγραφεί η νέα οπτική προσοφθάλμια διάταξη που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο με σκοπό την πλήρη εκμετάλλευση του πρόσθιου θαλάμου του οφθαλμού που είναι η περιοχή που παρέχει τις επιθυμητές φασματοσκοπικές πληροφορίες. Επίσης θα περιγραφούν οι μετατροπές και οι βελτιώσεις που έγιναν στο σύστημα T-64000 με σκοπό τη βελτιστοποίηση των οπτικών και τη μεγιστοποίηση της στερεάς γωνίας συλλογής.

9.1 Νέα Οπτική Προσοφθάλμια Διάταξη

Από τη στιγμή που στόχος μας ήταν η ανίχνευση μορίων φαρμάκων και φυσιολογικών ουσιών στο υδατοειδές υγρό, ενώ την ίδια στιγμή θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί η μικρότερη ισχύς laser στον ελάχιστο χρόνο, η πρώτη σκέψη μας ανέτρεξε στην γεωμετρία σκέδασης 90° , η οποία θεωρείται ως η πιο κατάλληλη για την μελέτη υγρών.

Η ανατομία όμως του οφθαλμού, όπως και η διαφοροποίηση των δεικτών διάθλασης του αέρα, του κερατοειδούς και του ίδιου του υδατοειδούς υγρού δεν μας επέτρεπε να χρησιμοποιήσουμε την γεωμετρία σκέδασης 90° όπως συμβατικά τη γνωρίζαμε, δηλαδή με συλλογή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε 90° της προσπίπτουσας.

Το ερώτημα που θέσαμε συνειδητοποιώντας ότι οι παραπάνω δείκτες διάθλασης εναλλάσσονται στις τιμές τους, ήταν αν είναι εφικτό να σταλεί δέσμη ακτινοβολίας laser στον οφθαλμό κατά τέτοιο τρόπο (συνδυασμός σημείου εισόδου στον κερατοειδή και γωνίας ως προς την καμπυλότητα του κερατοειδή) ώστε κατά την τελική διάθλασή της να βρεθεί κάθετη ως προς τον οπτικό άξονα του οφθαλμού, στην ουσία σε 90° από το σύστημα συλλογής της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Οι υπολογισμοί έδειξαν ότι κάτι τέτοιο ήταν εφικτό.

9.1.1 Περιγραφή

Η νέα οπτική προσοφθάλμια διάταξη, προσαρμόστηκε στο σύστημα Raman T-64000 και κατευθύνει με συγκεκριμένο τρόπο τη δέσμη laser ορατού στον οφθαλμό και δίνει τη δυνατότητα ευνοϊκής συλλογής του σκεδαζόμενου φωτός, σαρώνοντας τον πρόσθιο θάλαμο, σε γεωμετρία σκέδασης 90° . Συγκεκριμένα, ο συνολικός οπτικός σχεδιασμός αποβλέπει στο να απαντήσει το ερώτημα αν και κατά πόσο η δέσμη του laser μπορεί να προσπέσει στον οφθαλμό με τέτοιο τρόπο ώστε να εισέλθει στον πρόσθιο θάλαμο και να τον διαχύσει κάθετα στον οπτικό άξονα. Βασιζόμενοι στην εναλλαγή των τιμών του δείκτη διάθλασης του αέρα ($n=1$), του κερατοειδούς ($n=1,376$) και του υδατοειδούς υγρού ($n=1,336$), κάτι τέτοιο είναι δυνατόν να συμβεί συνδυάζοντας το σημείο και την γωνία πρόσπτωσης της δέσμης του laser στην καμπύλη επιφάνεια του κερατοειδούς. Το φως είναι δυνατό να εισέλθει στον οφθαλμό από ένα σημείο του κερατοειδούς, να διασχίσει τον πρόσθιο θάλαμο του οφθαλμού με τροχιά παράλληλη ως προς την ίριδα και τον φακό (κάθετα στον οπτικό άξονα) και να εξέλθει από ένα αντιδιαμετρικό σημείο του κερατοειδούς (Σχήμα 9.1). Μ' αυτό τον τρόπο μεγιστοποιείται το ποσοστό της σκεδαζόμενης Raman ακτινοβολίας που είναι δυνατόν να συλλεχθεί, ενώ συγχρόνως ελαχιστοποιείται η

όποια αλληλεπίδραση του φωτός με το φακό και τον αμφιβληστροειδή. Θα πρέπει επιπλέον να αναφερθεί ότι η δέσμη του laser δεν εστιάζεται στην επιφάνεια του κερατοειδούς, αλλά σε σημείο μέσα στο υδατοειδές υγρό, μειώνοντας σημαντικά τον κίνδυνο πρόκλησης τραυματισμού στο κερατοειδή.

Σχήμα 9.1: Για βελτιστοποίηση του σήματος και της ασφάλειας, η διαδρομή της δέσμης του laser στον πρόσθιο θάλαμο πρέπει να είναι κάθετη στον οπτικό άξονα του ματιού.

Στο σχήμα 9.2 απεικονίζεται το σύστημα πρόσπτωσης της δέσμης laser στον οφθαλμό, που χρησιμοποιήθηκε για τον μη επεμβατικό φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό του πρόσθιου θαλάμου οφθαλμού. Το σύστημα όπως προαναφέρθηκε προσαρμόζεται σε φασματοφωτόμετρο Raman με ανιχνευτή CCD και όλη η διάταξη λειτουργεί σε γεωμετρία σκέδασης 90° . Ένα ανάλογο σύστημα πρόσπτωσης της δέσμης στον οφθαλμό προτάθηκε από τους Tarr et al.,¹ για τις μετρήσεις με μη επεμβατικό τρόπο των επιπέδων της γλυκόζης στο πλάσμα χρησιμοποιώντας εξαναγκασμένη (stimulated) φασματοσκοπία Raman.

Στην παρούσα εργασία πιο συγκεκριμένα, όπως αναλυτικά προαναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, ως διεγείρουσα ακτινοβολία χρησιμοποιήθηκε υδρόψυκτο laser ιόντων αργού (Spectra-Physics Model 2017, 5W all lines) με μήκος κύματος διεγείρουσας ακτινοβολίας 514,5 nm. Για την απόρριψη των γραμμών του πλάσματος του laser Ar^+ χρησιμοποιήθηκε ειδικό συμβολομετρικό φίλτρο (interference filter). Η μονοχρωματική δέσμη laser κατευθύνεται από τη πηγή σε πρίσμα ορθής γωνίας και μέσω ενός απαλλαγμένου σφαιρικής εκτροπής φακού κατευθύνεται στο κατάλληλα τοποθετημένο δείγμα (Σχήμα 9.2).

Σχήμα 9.2: Η νέα οπτική προσοφθάλμια διάταξη που κατευθύνει με συγκεκριμένο τρόπο τη δέσμη laser στον οφθαλμό και δίνει τη δυνατότητα ευνοϊκής συλλογής του σκεδαζόμενου φωτός, σαρώνοντας τον πρόσθιο θάλαμο, σε γεωμετρία σκέδασης 90° (κάτοψη).-Ένθετη Φωτογραφία: Όψη ανθρώπινου οφθαλμού (προφίλ)
http://www.iacle.org/pdf/programs/course_sample.pdf

Ο συγκεκριμένος ασφαιρικός φακός χρησιμοποιείται σε οπτικά συστήματα όπου απαιτείται μεγάλη απόκλιση της δέσμης του laser καθώς και συλλογή ευρείας περιοχής. Παρουσιάζει μεγάλη διαπερατότητα καθώς μειώνει τις ανακλάσεις. Βασικό χαρακτηριστικό του είναι ότι ο αριθμός f (εστιακή απόσταση / διάμετρος του φακού), έχει τιμή μικρότερη της μονάδας, δίνοντας τη δυνατότητα υλοποίησης της προσδοκώμενης γεωμετρίας πρόσπτωσης της δέσμης του laser στον οφθαλμό καθώς και της βέλτιστης γεωμετρίας σκέδασης. Συγκεκριμένα δίνει τη δυνατότητα επίτευξης μεγάλου εύρους κατάλληλων γωνιών πρόσπτωσης θ_0 ($85 \leq \theta_0 \leq 39$), οι λόγοι αναφέρονται στη συνέχεια του κεφαλαίου. Τα κύρια χαρακτηριστικά του φαίνονται στο σχήμα 9.3.

Το πρίσμα και ο ασφαιρικός φακός έχουν την δυνατότητα παράλληλης κίνησης, ως προς τον οπτικό άξονα του οφθαλμού. Η κατάλληλη θέση των δύο αυτών οπτικών επιτρέπει την επιλογή της κατάλληλης γωνίας πρόσπτωσης θ_0 , ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη γεωμετρία σκέδασης. Επιπρόσθετα με αυτόν τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί και η οριζόντια σάρωση του πρόσθιου θαλάμου, δηλαδή η μετακίνηση της δέσμης του laser μέσα στον πρόσθιο θάλαμο κάθετα στον οπτικό άξονα.

Σχήμα 9.3: Τεχνικά χαρακτηριστικά ασφαιρικού φακού. Διάμετρος D : 75 mm, $E.F.L$: 50 mm, F : 0,6 mm, D_1 : 75 mm, Clear Aperture: 73 mm, $B.F.L$: 30,5 mm, $C.T$: 30 mm, $E.T$: 3 mm

9.1.2 Μαθηματική Προσέγγιση

Για τον υπολογισμό των βέλτιστων γεωμετρικών συνθηκών ελήφθησαν υπόψη ορισμένες παραδοχές. Ο κερατοειδής θεωρείται σφαιρική επιφάνεια με ίδιο κέντρο για την εξωτερική και εσωτερική επιφάνειά του (Σχήμα 9.4). Η βέλτιστη γεωμετρία (η οπτική ακτίνα του laser μέσα στον πρόσθιο θάλαμο να είναι κάθετη στον οπτικό άξονα) επιτυγχάνεται μέσα σε ένα εύρος γωνιών πρόσπτωσης (θ_0). Οι οριακές συνθήκες για την γωνία πρόσπτωσης της δέσμης του laser στην εξωτερική επιφάνεια του κερατοειδούς βρίσκονται με βάση δύο περιορισμούς. Πρώτον η γωνία πρόσπτωσης δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερη των 90° και δεύτερον η απόσταση KN του σχήματος 9.4 δεν μπορεί να υπερβεί το μήκος της απόστασης φακού-οπίσθιας επιφάνειας του κερατοειδούς, δηλαδή $KN \leq 2,8\text{mm}$.

Για να βρεθούν οι γεωμετρικές θέσεις του ασφαιρικού φακού (Δy) και του πρίσματος (Δz) θα πρέπει να είναι γνωστή η γωνία πρόσπτωσης της δέσμης του laser στην εξωτερική επιφάνεια του κερατοειδούς (θ_0) καθώς και η ακριβή θέση πρόσπτωσης της δέσμης που ορίζεται από την απόσταση MS (Σχήμα 9.4).

Αρχικά θα υπολογιστούν οι θέσεις των οπτικών για τις οριακές συνθήκες και στη συνέχεια για ενδεικτικές ενδιάμεσες τιμές.

Σχήμα 9.4: Γεωμετρική προσέγγιση της οπτικής διαδρομής της δέσμης του laser στον κερατοειδή και τον πρόσθιο θάλαμο. Οι διαστάσεις είναι ψευδείς και δεν τηρήθηκε καμία κλίμακα.

1^η οριακή συνθήκη (Σχήμα 9.5): Κάθετη γωνία πρόσπτωσης ($\theta_o=90^\circ$)

Νόμος του Snell στην διεπιφάνεια αέρα-κερατοειδή ($n_o \rightarrow n_1$)

$$n_o \sin \theta_o = n_1 \sin \theta_1' \Rightarrow \sin \theta_1' = 0,7267 \Rightarrow \theta_1' = 46,61^\circ \quad (9.1)$$

Νόμος ημίτονων στο τρίγωνο $\triangle CPS$

$$\frac{CP}{\sin \theta_1'} = \frac{CS}{\sin \theta_1''} \Rightarrow \sin \theta_1'' = 0,89 \Rightarrow \theta_1'' = 117,66^\circ \quad (9.2)$$

Από το τρίγωνο $\triangle CPS$

$$\theta' = 180 - \theta_1'' - \theta_1' = 15,73^\circ \quad (9.3)$$

Από το σχήμα 9.4 προκύπτει ότι:

$$\theta_1 = 180 - \theta_1'' \Rightarrow \theta_1 = 62,34^\circ \quad (9.4)$$

Νόμος του Snell στη διεπιφάνεια κερατοειδή-υδατοειδούς υγρού ($n_1 \rightarrow n_2$)

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \Rightarrow \sin \theta_2 = 0,91 \Rightarrow \theta_2 = 65,82^\circ \quad (9.5)$$

Από το ορθογώνιο τρίγωνο $\triangle CNP$

$$\theta = 180 - 90 - \theta_2 \Rightarrow \theta = 24,18^\circ \quad (9.6)$$

¹ Η γωνία θ_1 λαμβάνει την κρίσιμη τιμή ολικής ανάκλασης όταν $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin 90^\circ \Rightarrow \sin \theta_1 = \frac{n_2}{n_1} \Rightarrow \theta_1 = 76,15^\circ$.

Οι τιμές της γωνίας θ_1 κυμαίνονται μεταξύ $33,1^\circ \leq \theta_1 \leq 62,34^\circ$ στις δύο ακραίες θέσεις της βέλτιστης γεωμετρίας.

Ορίζουμε

$$\theta'_o = \theta + \theta' = 39,91^\circ \quad (9.7)$$

Από το ορθογώνιο τρίγωνο $\overset{\Delta}{CMS}$

$$\sin \theta'_o = \frac{MS}{CS} = \frac{MS}{R} \Rightarrow \boxed{MS = 5\text{mm}} \quad (9.8)$$

Σχήμα 9.5: 1^η οριακή συνθήκη πρόσπτωσης της δέσμης του Laser στην επιφάνεια του οφθαλμού ($\theta_o=90^\circ$).

2^η οριακή συνθήκη (Σχήμα 9.6): απόσταση CN=3,6mm (CN=r-u=6,4-2,8=3,6mm)

Από το ορθογώνιο τρίγωνο $\overset{\Delta}{CNP}$

$$\sin \theta_2 = \frac{CN}{CP} \Rightarrow \sin \theta_2 = 0,56 \Rightarrow \theta_2 = 34,23^\circ \quad (9.9)$$

Νόμος του Snell στη διεπιφάνεια κερατοειδή-υδατοειδούς υγρού ($n_1 \rightarrow n_2$)

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \Rightarrow \sin \theta_1 = 0,55 \Rightarrow \theta_1 = 33,1^\circ \quad (9.10)$$

Από το σχήμα 9.4 προκύπτει ότι:

$$\theta_1'' = 180 - \theta_1 \Rightarrow \theta_1'' = 146,9^\circ \quad (9.11)$$

Νόμος ημίτονων στο τρίγωνο $\triangle CPS$

$$\frac{CP}{\sin \theta_1'} = \frac{CS}{\sin \theta_1''} \Rightarrow \sin \theta_1' = 0,45 \Rightarrow \theta_1' = 26,62^\circ \quad (9.12)$$

Νόμος του Snell στην διεπιφάνεια αέρα-κερατοειδή ($n_o \rightarrow n_1$)

$$n_o \sin \theta_o = n_1 \sin \theta_1' \Rightarrow \sin \theta_o = 0,62 \Rightarrow \boxed{\theta_o = 38,1^\circ} \quad (9.13)$$

Από το τρίγωνο $\triangle CPS$

$$\theta' = 180 - (\theta_1'' + \theta_1') \Rightarrow \theta' = 6,48^\circ \quad (9.14)$$

Από το τρίγωνο $\triangle CNP$

$$\theta = 180 - 90 - \theta_2 \Rightarrow \theta = 55,77^\circ \quad (9.15)$$

Ορίζουμε:

$$\theta_o' = \theta + \theta' \Rightarrow \theta_o' = 62,25^\circ \quad (9.16)$$

Από το ορθογώνιο τρίγωνο $\triangle CMS$

$$\sin \theta_o' = \frac{MS}{CS} = \frac{MS}{R} \Rightarrow \boxed{MS = 6,9\text{mm}} \quad (9.17)$$

Σχήμα 9.6: 2^η οριακή συνθήκη πρόσπτωσης της δέσμης του Laser στην επιφάνεια του κερατοειδή.

Άρα τα όρια της απόστασης MS για να ισχύσει η παραπάνω γεωμετρία είναι:

$$5\text{mm} < \text{MS} < 6,9\text{mm}$$

$$38,1^\circ < \theta_0 < 90^\circ$$

Στον παρακάτω Πίνακα IX.I φαίνονται τυπικές τιμές του κατάλληλου σημείου και της γωνίας πρόσπτωσης, για να ισχύει η παραπάνω γεωμετρία.

Πίνακας IX.I: Τυπικές τιμές της γωνίας πρόσπτωσης (θ_0) και της απόστασης MS για να ισχύσει η βέλτιστη γεωμετρία σκέδασης στον οφθαλμό.

θ_0	MS (mm)
90	5
85	5,04
80	5,13
75	5,26
70	5,44
65	5,65
60	5,88
55	6,11
50	6,36
45	6,59
40	6,82
39	6,86

Σχήμα 9.7: Η γεωμετρική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για να βρεθούν οι γεωμετρικές θέσεις των οπτικών έτσι ώστε να πληρούνται οι βέλτιστες συνθήκες σκέδασης. Οι διαστάσεις κάθε αντικειμένου είναι ψευδείς και δεν τηρήθηκε καμία κλίμακα.

Για να υπολογιστούν στη συνέχεια οι γεωμετρικές θέσεις των οπτικών θεωρείται ότι η εστία του φακού συλλέκτη βρίσκεται στο κέντρο του υδατοειδούς υγρού. Η εστιακή του απόσταση είναι $F=160\text{ mm}$, οπότε η απόσταση της πρόσθιας επιφάνειας του κερατοειδούς από την ευθεία ϵ_0 που είναι η ευθεία αναφοράς και συμπίπτει με την είσοδο του φασματογράφου, βρίσκεται ως εξής (Σχήμα 9.5):

$$d = F - \frac{u}{2} - (R - r) = 157,2 \text{ mm} \quad (9.18)$$

Για $\theta_0 = 90^\circ$

$$\text{Θεωρούμε } \theta_\rho = \phi + \omega \quad (9.19)$$

Από το τρίγωνο $\triangle MSC$

$$\cos \omega = \frac{MS}{R} \Rightarrow \omega = 50,09^\circ \quad (9.20)$$

προκύπτει $\phi = 39,91^\circ$

Από το σχήμα 9.7 προκύπτει η σχέση:

$$\tan \phi = \frac{h}{f} \Rightarrow h = 41,82 \text{ mm} \quad (9.21)$$

($f=50\text{mm}$ είναι η εστιακή απόσταση του ασφαιρικού φακού)

Από το ορθογώνιο τρίγωνο $\triangle EMS$

$$\tan \phi = \frac{ME}{MS} \Rightarrow ME = 4,19 \text{ mm} \quad (9.22)$$

Από το ορθογώνιο τρίγωνο $\triangle CMS$ εφαρμόζοντας Πυθαγόρειο θεώρημα

$$CM^2 = R^2 - MS^2 \Rightarrow CM = 5,98 \text{ mm} \quad (9.23)$$

Από το σχήμα 9.7 προκύπτει ότι

$$LE = ME + MC - R \Rightarrow LE = 2,37 \text{ mm} \quad (9.24)$$

Οπότε η απόσταση του κέντρου του ασφαιρικού φακού από την ευθεία αναφοράς ε_0 υπολογίζεται:

$$\Delta y = d - LE \Rightarrow \Delta y = 154,83 \text{ mm} \quad (9.25)$$

Η απόσταση του πρίσματος από την ευθεία αναφοράς ε_0 υπολογίζεται ως εξής:

$$\Delta z = \Delta y + h \Rightarrow \Delta z = 196,65 \text{ mm} \quad (9.26)$$

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για όλες τις γωνίες πρόσπτωσης. Η ακολουθία αυτών των συλλογισμών κωδικοποιήθηκε σε κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα (Microsoft® Excel 2002 for Windows) με την βοήθεια του οποίου δίνοντας την γωνία πρόσπτωσης θ_0 , υπολογίζονται αυτόματα οι θέσεις των οπτικών σε σχέση με το φασματοφωτόμετρο. Στον Πίνακα IX.ΙΙ παρατίθενται αυτές οι γεωμετρικές θέσεις για ενδεικτικές γωνίες πρόσπτωσης της δέσμης του laser στην εξωτερική επιφάνεια του κερατοειδή.

Πίνακας IX. ΙΙ: Οι γεωμετρικές θέσεις του ασφαιρικού φακού (Δy) και του πρίσματος (Δz) για συγκεκριμένες γωνίες πρόσπτωσης (θ_0)

θ_0	$\Delta y(\text{mm})$	$\Delta z(\text{mm})$
90	154,8	196,7
85	155,5	190,8
80	156,0	186,2
75	156,5	182,5
70	157,0	179,5
65	157,4	177,0
60	157,9	175,0
55	158,3	173,3
50	158,8	171,8
45	159,3	170,6
40	159,9	169,6
39	160,0	169,4

Από τον πίνακα παρατηρείται ότι για τη γωνία 90° η απόσταση του κέντρου του πρίσματος από το κέντρο του φακού είναι μεγαλύτερη από 37,5 mm που είναι η ακτίνα του φακού ($\Delta z - \Delta y = 41.82\text{mm}$). Αυτό σημαίνει ότι ο συγκεκριμένος φακός καλύπτει γωνίες μικρότερες ή ίσες των 86° , όπου υπολογίστηκε ότι $\Delta y = 155,4\text{ mm}$ και $\Delta z = 191,8$ ($\Delta z - \Delta y = 36,5\text{mm}$).

Το πρίσμα ορθής γωνία καθώς και ο ασφαιρικός φακός τοποθετούνται πάνω σε βάσεις που έχουν την δυνατότητα κίνησης στις επιθυμητές κατευθύνσεις με την βοήθεια βερνιέρων. Η ακρίβεια των βερνιέρων είναι 0,01mm.

Σύμφωνα με αυτή την διάταξη και τις συγκεκριμένες θέσεις των οπτικών πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα σε γεωμετρία σκέδασης 90° , για την ανίχνευση μορίων στο υδατοειδές υγρό χοιρινών οφθαλμών in-vitro.

9.2 Βελτιώσεις στο σύστημα T-64000.

Στο σύστημα T-64000 έτσι όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7 (Σχήμα 7.1) η σκεδαζόμενη ακτινοβολία μετά από τους δύο φακούς συλλογής, εκτός από το φίλτρο Notch, μέχρι να εισέλθει στο μονοχρωμάτορα διαπερνά άλλα τρία οπτικά, ένα φακό και δύο καθρέπτες. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτελέσματα να χάνονται στα οπτικά αυτά ωφέλιμα φωτόνια Raman. Για το λόγο αυτό η όλη διάταξη τροποποιήθηκε έτσι ώστε το δείγμα να τοποθετηθεί ακριβώς απέναντι από τη σχισμή του μονοχρωμάτορα (Σχήμα 9.8). Έτσι εκτός από το διπλό σύστημα των φακών συλλογής και το φίλτρο Notch, κανένα άλλο οπτικό να μην εισέρχεται στη πορεία των σκεδαζόμενων φωτονίων από το δείγμα στην σχισμή του μονοχρωμάτορα. Πριν και μετά τη μετατροπή αυτή στο σύστημα λήφθηκαν τα φάσματα Raman του βενζινίου (C_6H_6), του τετραχλωροάνθρακα (CCl_4) και του νερού (H_2O) με τις ίδιες συνθήκες. Η σύγκριση (Σχήμα 9.9) ανέδειξε ότι το σήμα βελτιώθηκε κατά ένα παράγοντα τουλάχιστον 2.

Σχήμα 9.8: Σχηματική αναπαράσταση του τμήματος της διάταξης T-64000 της εταιρείας Jobin Yvon που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσας εργασίας.

Σχήμα 9.9: Σύγκριση των φασμάτων του C₆H₆, του CCl₄ και του νερού, πριν και μετά τη μετατροπή στο σύστημα T64000.

Το σύστημα των δύο φακών δίνει τη δυνατότητα επιλεκτικής εστίασης και συλλογής της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στην επιφάνεια της σχισμής. Όταν το πεδίο εστίασης έχει την ίδια μορφολογία με τη σχισμή, τότε θεωρείται ότι η γεωμετρία σκέδασης είναι η ευνοϊκότερη δυνατή.

Σε ορισμένα πειράματα της παρούσας εργασίας αντί του αντικειμενικού φακού εστιακής απόστασης 160 mm αγοράστηκε και χρησιμοποιήθηκε αντικειμενικός φακός 80 mm. Χρησιμοποιώντας φακό συλλογής με μικρότερη εστιακή απόσταση αυτόματα αυξάνεται η στερεά γωνία με την οποία ο φακός “βλέπει” το δείγμα (Σχήμα 9.10). Στη συγκεκριμένη περίπτωση υπολογίστηκε ότι η στερεά γωνία σχεδόν διπλασιάζεται ($34,7^\circ/17,76^\circ$). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να συλλέγονται περισσότερα σκεδαζόμενα φωτόνια από τη περιοχή του πρόσθιου θαλάμου. Το σύστημα των φακών συλλογής σε αυτή την περίπτωση επιτυγχάνει μεγέθυνση 3,25 (260/80) αντί για 1,63, κάτι που είναι ιδανικό για τη γεωμετρία σκέδασης του πειράματος καθώς το μέσο μήκος για το πεδίο εστίασης στον πρόσθιο θάλαμο υπολογίζεται ~4,5mm και το μέγιστο ύψος της σχισμής εισόδου του μονοχρωμάτορα στο σύστημα T64000 είναι

15 mm, με αποτέλεσμα να εκμεταλλευόμαστε σχεδόν τη συνολική επιφάνεια της σχισμής εισόδου ($4,5 \times 3,25 = 14,6$ mm). Πραγματοποιώντας αυτή την αλλαγή, τα όρια ανίχνευσης βελτιώθηκαν και μάλιστα περισσότερο από το αναμενόμενο θεωρητικό λόγο που είναι 2 ($260/80 : 260/160$), κάτι που αποδεικνύεται στη παράγραφο 12.7.4. Αυτό αποδίδεται στο ότι ο φακός των 80 mm είναι καινούριος πιο καθαρός και προφανώς η απόδοση του είναι η μέγιστη δυνατή.

Αλλάζοντας το φακό συλλογής ήταν απαραίτητα να υπολογιστούν εκ νέου οι αποστάσεις του ασφαιρικού φακού εστίασης και του πρίσματος από τον μονοχρωμάτορα. Οι αποστάσεις αυτές για φακό συλλογής με εστιακή απόσταση 80mm επαναπροσδιορίζονται όπως φαίνεται στον πίνακα IX.III

Πίνακας IX.III: Οι γεωμετρικές θέσεις του ασφαιρικού φακού (Δy) και του πρίσματος (Δz) για συγκεκριμένες γωνίες πρόσπτωσης (θ_0) όταν χρησιμοποιείται φακός συλλογής 80 mm.

θ_0	$\Delta y(\text{mm})$	$\Delta z(\text{mm})$
85	75,5	110,8
80	76,0	106,2
75	76,5	102,5
70	77,0	99,5
65	77,4	97,0
60	77,9	95,0
55	78,3	93,3
50	78,8	91,8
45	79,3	90,6
40	79,9	89,6
39	80,0	89,4

Αυτό που απομένει για τη βελτιστοποίηση του συστήματος T-64000 είναι η χρήση πλέον σύγχρονου back thinned ανιχνευτή CCD που μπορεί να παρουσιάζει κβαντική απόδοση τυπικά ανώτερη από 90%, σε αντίθεση με το σημερινό ανιχνευτή ο οποίος στην περιοχή που εργαζόμαστε παρουσιάζει απόδοση ~35%. Έτσι το σύστημα μπορεί προάγει την ένταση του σήματος Raman περαιτέρω κατά ένα παράγοντα 3. Με λίγα λόγια τα όποια όρια ανίχνευσης αυτής της εργασίας με κατάλληλο CCD νέας γενιάς είναι δυνατό να βελτιωθούν μ' ένα παράγοντα, τουλάχιστον 3. Δηλαδή, η συγκέντρωση των δύο αντιβιοτικών και της γλυκόζης που θα μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε με την βελτίωση της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, υπόσχεται διεύρυνση της χρήσης της συγκεκριμένης φασματοσκοπικής μεθόδου στον τομέα της οφθαλμολογίας.

Σχήμα 9.10: Η στερεά γωνία συλλογής σχεδόν διπλασιάζεται με τη χρήση φακού συλλογής με τη μισή εστιακή απόσταση.

Αναφορές

- 1 Tarr R, Steffes P. Non-invasive blood glucose measurement system and method using stimulated Raman spectroscopy. US5243983 patent 1993.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΟΦΘΑΛΜΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN

Τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες έχουν γίνει με φασματοσκοπία Raman για το βιοχημικό χαρακτηρισμό βιολογικών ιστών.^{1,2,3,4,5} Συγκεκριμένα στην οφθαλμολογία η φασματοσκοπία Raman έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη των διαφορετικών δομών του ματιού in-vitro,^{6,7} αναδεικνύοντας τα χαρακτηριστικά φάσματα του κερατοειδούς,^{8,9} του φακού,^{10,11,12,13,14,15,16,17,18,19} και του υδατοειδούς υγρού.^{20,21} Ωστόσο, σε αυτές τις μελέτες η ένταση της δέσμης laser ήταν υψηλή σχετικά με τα αποδεκτά όρια σε βιολογικούς ιστούς κάτι που είναι απαραίτητο για την επίτευξη αποδεκτού λόγου σήματος-θορύβου (signal to noise ratio, SNR). Επιπλέον, η ετερογενής φύση των ιστών προκαλεί φαινόμενο φθορισμού κάτι που ελαττώνει σημαντικά τη διακριτική ικανότητα σημάτων Raman.

Στο κεφάλαιο αυτό έγινε ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός του φακού, του κερατοειδούς και του υδατοειδούς υγρού χοιρινών οφθαλμών. Τα φάσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως αναφορές στα περαιτέρω πειράματα της συγκεκριμένης εργασίας.

10.1 Πειραματικές Διατάξεις

Για τον φασματικό χαρακτηρισμό των τριών βασικών ιστών του οφθαλμού, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Raman T-64000, σε γεωμετρία σκέδασης 90° όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.1.

10.2 Προετοιμασία Δειγμάτων

Οι χοιρινοί οφθαλμοί ήταν ευγενική χορηγία τοπικού κρεοπώλη. Οι χοιρινοί οφθαλμοί, μετά την σφαγή των ζώων, αφαιρέθηκαν και συντηρήθηκαν 24 ώρες το μέγιστο, σε θερμοκρασία 4°C έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν τυχόν διαδικασίες υποβάθμισης όπως η γλυκόλυση. Κάθε οφθαλμός μετά την αφαίρεση ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό και τοποθετείται σε δοχείο με κατάλληλη υγρασία. Με εγχειρητική διαδικασία διαχωρίστηκαν και απομονώθηκαν ο φακός και ο κερατοειδής. Η εξαγωγή έγινε με μεγάλη προσοχή έτσι ώστε να μην αλλοιωθούν οι ευπαθείς ιστοί. Συγκεκριμένα γίνεται τομή ~2 mm στον σκληρό με νυστέρι, σε απόσταση ~2 mm από το σκληροκερατοειδικό όριο και παράλληλα με αυτό. Η τομή εκτείνεται 360° χρησιμοποιώντας λαβίδα και κυρτό ψαλίδι. Απωθείται το ακτινωτό σώμα, μαζί με την ίριδα μακριά από το σκληροκερατοειδικό δίσκο. Αφαιρείται με αυτόν τον τρόπο ο κερατοειδής. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι η ίριδα συνδέεται με τον κερατοειδή με ισχυρούς στυλοειδείς κίονες ιστού, γι' αυτό απαιτείται προσοχή κατά την απομάκρυνση της έτσι ώστε να μην τραυματιστεί ο ευπαθής ιστός του κερατοειδούς. Τα υπολείμματα των ιστών της ίριδας που πιθανόν να απομείνουν πάνω στον κερατοειδή ή τον φακό μετά την εγχειρητική αφαίρεση τους, είναι πιθανό να προκαλέσουν φαινόμενο φθορισμού κατά την λήψη των φασμάτων, για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο τα δείγματα να ξεπλένονται πριν την χρήση. Μετά την εξαγωγή του, ο κερατοειδής τοποθετείται πάνω σε γυάλινη βάση στην εστιακή απόσταση του φακού συλλογής και του φακού εστίασης ταυτόχρονα, για να επιτευχθεί η λήψη του βέλτιστου φάσματος.

Μετά την αφαίρεση του σκληροκερατοειδικού κυκλικού τμήματος, ο βολβός του οφθαλμού μένει ακάλυπτος και ακολουθεί η αφαίρεση του περιεχομένου του. Στη συνέχεια ο φακός διαχωρίζεται με προσοχή από το υαλώδες σώμα και τοποθετείται σε γυάλινη βάση μπροστά στο φασματοσκόπιο για μελέτη.

Υδατοειδές υγρό συλλέχθηκε με παρακέντηση από τον πρόσθιο θάλαμο 10 οφθαλμών, έτσι ώστε να συγκεντρωθεί ποσότητα περίπου 3 mL. Το σημείο που εισέρχεται η βελόνα στον πρόσθιο θάλαμο βρίσκεται στο σκληροκερατοειδές όριο (Σχήμα 5.1). Η ποσότητα που συλλέχθηκε, τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα, διαμέτρου 16 mm, από όπου λήφθηκαν τα φάσματα Raman.

Χρησιμοποιήθηκε ισχύς laser 25-mW, ενώ η ελάχιστη διάμετρος της συγκλίνουσας δέσμης στο δείγμα ήταν ~1 mm². Ο χρόνος λήψης στις χαμηλές συχνότητες επιλέχθηκε 20 s (750-2000 cm⁻¹), στις υψηλές (2750-3800 cm⁻¹) 12 s για

τον φακό και τον κερατοειδή. Για το υδατοειδές υγρό επιλέχθηκαν 13 s και 1 s στις αντίστοιχες φασματικές περιοχές.

10.3 Αποτελέσματα

10.3.1 Φακός

Ο κρυσταλλοειδής φακός του ανθρώπου είναι μια ενθυλακωμένη δομή που αποτελείται κυρίως από μεγάλο αριθμό άκαμπτων επιμηκυμένων κύτταρων γνωστά ως ίνες του φακού ή ινώδη κύτταρα. Σε αυτά τα κύτταρα το 90 % κατέχουν οι πρωτεΐνες, συγκεκριμένα οι α-, β- και γ- κρυσταλλίνη, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την εξαιρετική διαφάνεια του φακού. Βασικές δομικές μονάδες των πρωτεϊνών του φακού είναι τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη που οι χημικές δομές τους φαίνονται στο σχήμα 10.1.

Σχήμα 10.1: Χημικές δομές α) Φαινυλαλανίνης, β) Τυροσίνης, γ) Τρυπτοφάνης

Το φάσμα του φακού στο φασματικό παράθυρο $625\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ φαίνεται στο σχήμα 10.2. Διακρίνονται πολλές και έντονες κορυφές που αποδίδονται σε δονήσεις των βασικών δομικών του μονάδων, αρωματικών αμινοξέων.

Η φαινυλαλανίνη²² στους 1008 cm^{-1} εμφανίζει κορυφή που οφείλεται σε δόνηση του φαινυλικού δακτυλίου του μορίου της. Η κορυφή στους 1035 cm^{-1} οφείλεται σε δόνηση του δεσμού C-H του φαινυλικού δακτυλίου. Τέλος η έκταση του δακτυλίου συνεισφέρει φασματοσκοπικά στην περιοχή των 1587 και 1609 cm^{-1} .

Η τυροσίνη²³ εμφανίζει έντονη κορυφή στους 835 cm^{-1} που αποδίδεται στη δόνηση αναπνοής του βενζοϊκού δακτυλίου της δομής της. Η κορυφή στους 1180 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση του C-H του βενζοϊκού δακτυλίου. Η δόνηση έκτασης C-H, η δόνηση κάμψης επιπέδου του δεσμού C-O-H και η δόνηση rocking του μορίου NH_3 , συνεισφέρουν φασματοσκοπικά στην περιοχή 1211 cm^{-1} . Τέλος στην Τυροσίνη αποδίδεται και η κορυφή 1622 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση τάσης του βενζοϊκού δακτυλίου.

Η τρυπτοφάνη^{24,25} στους 761 cm^{-1} εμφανίζει κορυφή που οφείλεται στη δόνηση αναπνοής του ινδολικού δακτυλίου της δομής της. Η κορυφή με επίκεντρο τους 884 cm^{-1} αποδίδεται σε δόνηση του δεσμού N-H που βρίσκεται στον ινδολικό δακτύλιο. Η εκτός επιπέδου δόνηση του δεσμού N-C του δακτυλίου συνεισφέρει φασματοσκοπικά στην περιοχή 1342 και 1363 cm^{-1} . Η ευρεία κορυφή στους 1424 cm^{-1} αντιστοιχεί σε συνδυασμό της συμμετρικής δόνησης έκτασης του δεσμού C-N-C του δακτυλίου, της δόνησης του δεσμού N-H και της δόνησης του δεσμού C-H του βενζοϊκού δακτυλίου. Η δόνηση κάμψης του δεσμού C-H της δομικής αλυσίδας του μορίου-της συνεισφέρει φασματοσκοπικά στους 1496 cm^{-1} . Τέλος η έντονη κορυφή στους 1552 cm^{-1} προσδιορίζει την δόνηση C=C του πυρολικού δακτυλίου.

Σε σκελετικές δονήσεις C-C αποδίδονται οι κορυφές στους 941 και 961 cm^{-1} . Οι κορυφές στους 1078 , 1099 , 1161 cm^{-1} καθώς και ο ώμος στους 1130 cm^{-1} αποδίδονται στη δόνηση έκτασης του δεσμού C-N των πρωτεϊνών. Η έντονη κορυφή στους 1240 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση αμιδίου III (κυρίαρχα N-H) η οποία πιθανότατα αντιστοιχεί στη διαμόρφωση α -helix.²⁶ Η ασθενής κορυφή στους 1405 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις του μορίου COO^- ενώ η ισχυρή κορυφή με επίκεντρο τους 1455 cm^{-1} οφείλεται στην κάμψη του δεσμού CH_2 των πρωτεϊνών. Επίσης σε δονήσεις του δεσμού C-H οφείλεται και η κορυφή στους 1326 cm^{-1} . Στους 1670 cm^{-1} το φάσμα του φακού παρουσιάζει κορυφή που οφείλεται κυρίως στη δόνηση C=O του Αμιδίου I.²⁶

Στη φασματική περιοχή $2750\text{-}3850\text{ cm}^{-1}$ παρουσιάζονται τρεις ομάδες κορυφών (Σχήμα 10.3). Ο ώμος που παρατηρείται στους 2880 cm^{-1} αποδίδεται στην συμμετρική δόνηση έκτασης του δεσμού CH_3 . Η ομάδα κορυφών με επίκεντρο τους 2940 cm^{-1} οφείλεται σε δόνηση έκτασης του δεσμού C-H των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, είναι συνδυασμός της αντισυμμετρικής δόνησης έκτασης της ομάδας CH_2 ($\sim 2940\text{ cm}^{-1}$) και της εκτός επιπέδου ασύμμετρης δόνησης κάμψης των μορίων CH_3 ($\sim 2960\text{ cm}^{-1}$).²⁶ Το σήμα στους 3069 cm^{-1} οφείλεται στην δόνηση έκτασης του αρωματικού δεσμού C-H των μορίων των πρωτεϊνών. Το ισχυρό σήμα της δόνησης έκτασης του υδροξυλίου (OH) που οφείλεται στο μόριο του νερού παρουσιάζει ευρεία τριπλή κορυφή που εκτείνεται από τους 2800 μέχρι τους 3800 cm^{-1} .

Σχήμα 10.2: Φάσμα Raman του κρυσταλλοειδούς φακού χοιρινών στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων.

Σχήμα 10.3: Φάσμα Raman του κρυσταλλοειδούς φακού χοιρινών οφθαλμών στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων.

Συγκεντρωτικά οι κορυφές του φάσματος του φακού και η απόδοσή τους παρουσιάζονται στον Πίνακα Χ.Ι.

Πίνακας Χ.Ι: Οι κορυφές του φάσματος Raman του φακού και η απόδοσή τους.

Συχνότητα (cm ⁻¹)	Δονήσεις Μορίων	Συχνότητα (cm ⁻¹)	Δονήσεις Μορίων
761	Τρυπτοφάνη	1363	Τρυπτοφάνη
835	Τυροσίνη	1405	COO ⁻
884	Τρυπτοφάνη	1424	Τρυπτοφάνης
941	ν (C-C)	1450	δ(CH ₂)
961	ν (C-C)	1496	Τρυπτοφάνη
1008	Φαινυλαλανίνη	1552	Τρυπτοφάνη
1035	Φαινυλαλανίνη	1587	Τυροσίνη - Φαινυλαλανίνη
1078	ν (C-N)	1609	Φαινυλαλανίνη
1099	ν (C-N)	1622	Τυροσίνη
1130	ν (C-N)	1670	Αμιδίο Ι
1161	ν (C-N)	2880	CH ₃
1180	Τυροσίνη - Φαινυλαλανίνη	2940	CH ₂
1211	Τυροσίνη	2960	CH ₃
1240	Αμιδίο ΙΙΙ	3069	CH
1326	δ(CH)	2800-3800	OH
1342	Τρυπτοφάνη		

10.3.2 Κερατοειδής

Ο κερατοειδής αποτελείται κατά 78% από νερό, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η διαφάνεια του. Επίσης, περιέχει 15% κολλαγόνο, 5% άλλες πρωτεΐνες, 1% γλυκοσαμινογλυκάνες και 1% άλας. Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης σε πρωτεΐνες το φάσμα του δεν παρουσιάζει το ίδιο έντονες κορυφές όπως το φάσμα του φακού. Το μεγαλύτερο μέρος του συνιστάται από μόρια κολλαγόνου ινώδους μορφής που τοποθετούνται σε παράλληλα επίπεδα. Στο φάσμα του κολλαγόνου παρατηρούνται κυρίως οι κορυφές των αμιδίων που είναι λίγο διαφορετικές από αυτές των σφαιρικών πρωτεϊνών λόγω κυρίως της διαφοράς στη σύσταση των αμινοξέων. Για παράδειγμα στο φάσμα του κολλαγόνου παρατηρούνται τρεις κορυφές του αμιδίου ΙΙΙ στις 1240 1258 και 1278 cm⁻¹ σε αντίθεση με τη μια κορυφή που παρουσιάζουν σε αυτήν την περιοχή οι αρωματικές πρωτεΐνες. Αυτές οι δύο κορυφές αποδίδονται στις πολωμένες και μη πολωμένες περιοχές της ελαστίνης του κολλαγόνου. Στο φάσμα του κερατοειδή παρατηρούνται και συνεισφορές των αμινοξέων τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη, όπως και στο φακό, αλλά και της προλίνης, υδροξυπρολίνης, δεσμοσίνης και ισοδεσμοσίνης, των οποίων οι δομές φαίνονται στο σχήμα 10.4.

Στο φάσμα του κερατοειδούς (Σχήμα 10.5), παρατηρούνται κορυφές στους 1108 και 966 cm⁻¹ που δεν εμφανίζονται ούτε στο κολλαγόνο ούτε στις αρωματικές πρωτεΐνες και αποδίδονται στα αμινοξέα δεσμοσίνη και ισοδεσμοσίνη.

Οι κορυφές στους 1240, 1258 και 1278 cm^{-1} οφείλονται στο μόριο του Αμιδίου III που βρίσκεται στα ινώδη μόρια του κολλαγόνου.²⁶ Η κορυφή στους 1240 cm^{-1} του αμιδίου III οφείλεται στις 3_{10} ελικοειδείς περιοχές του. Η εμφάνιση των δύο άλλων κορυφών του Αμιδίου III οφείλεται στο γεγονός ότι τα μόρια του τροποκολλαγόνου αποτελούνται από πολωμένες και μη περιοχές.²⁷

Σχήμα 10.4: Χημικές δομές α) προλίνης, β) υδροξυπρολίνης, γ) δεσμοσίνης και δ) ισοδεσμοσίνης

Χαρακτηριστικές κορυφές παρατηρούνται επιπλέον στους 1670-1645, 1450, 941-820-761, 923-860 και 864 cm^{-1} που αποδίδονται στη δόνηση $\text{C}=\text{O}$ του Αμιδίου I, στη δόνηση κάμψης του μορίου CH_2 , στη σκελετική δόνηση έκτασης του δεσμού $\text{C}-\text{C}$, στη δόνηση έκτασης του δεσμού $\text{C}-\text{C}$ του δακτυλίου στο μόριο της προλίνης και στη δόνηση έκτασης του δεσμού $\text{C}-\text{C}$ του δακτυλίου στο μόριο της υδροξυπρολίνης, αντίστοιχα. Βασικό χαρακτηριστικό στο φάσμα του κερατοειδούς είναι ότι η κορυφή στους 921 κυματάρθμους που οφείλεται σε δόνηση αναπνοής του μορίου της προλίνης²⁸, δεν παρατηρείται στο φάσμα του φακού κάτι που βοηθάει στο φασματικό διαχωρισμό τους.

Όπως και στο φάσμα του φακού, οι κορυφές στα 1326, 1405 αποδίδονται σε δονήσεις των μορίων $\text{C}-\text{H}$ και COO^- αντίστοιχα, όπως και οι κορυφές στους 1081, 1110 και 1130 cm^{-1} αποδίδονται σε δονήσεις του δεσμού $\text{C}-\text{N}$ των πρωτεϊνών. Ενώ η

κορυφή στους 1094 cm^{-1} αποδίδεται στην συμμετρική δόνηση έκτασης του δεσμού S-O. Η ένταση αυτής της κορυφής αποδεικνύει την πολύ μικρή συνεισφορά αυτών των δονήσεων στο φάσμα του κερατοειδούς.²⁹

Οι δονήσεις που αποδίδονται στο μόριο της Τρυπτοφάνης εμφανίζουν κορυφές στους 761 , 1342 , 1363 , 1496 και 1552 cm^{-1} . Το μόριο της Τυροσίνης παρουσιάζει κορυφές στους 820 , 1211 και 1587 cm^{-1} και το μόριο της Φαινυλλαλανίνης συνεισφέρει φασματοσκοπικά στους 1008 , 1035 , 1587 και 1609 cm^{-1} . Όλες οι παραπάνω κορυφές αποδίδονται όπως και στο φάσμα του φακού (παράγραφος 10.3.1). Τέλος στους $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή του νερού που αποδίδεται σε δονήσεις κάμψης του μορίου του υδροξυλίου.

Σχήμα 10.5: Φάσμα Raman του κερατοειδή χοιρινών οφθαλμών στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων.

Στη φασματική περιοχή $2750\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$ παρουσιάζονται δύο ομάδες κορυφών (Σχήμα 10.6). Ο ώμος που παρατηρείται στους 2880 cm^{-1} αποδίδεται στην αντισυμμετρική δόνηση έκτασης της ομάδας CH_3 . Η ομάδα κορυφών με επίκεντρο στους 2945 cm^{-1} οφείλεται σε δόνηση έκτασης του δεσμού C-H των πρωτεϊνών (κρυσταλλινών και λιπιδίων). Συγκεκριμένα, είναι συνδυασμός της αντισυμμετρικής δόνησης έκτασης της ομάδας CH_2 ($\sim 2940\text{ cm}^{-1}$) και της εκτός επιπέδου ασύμμετρης δόνησης έκτασης των μορίων CH_3 ($\sim 2960\text{ cm}^{-1}$). Στην ίδια περιοχή, οι Siew et al. έχουν αναφέρει ότι κοντά στους 3300 cm^{-1} υπάρχει μια κορυφή που οφείλεται σε δονήσεις έκτασης του μορίου N-H των πρωτεϊνών του κερατοειδούς η οποία όμως καλύπτεται από το φάσμα του νερού και μόνο με ξήρανση του δείγματος μπορεί να

αναδειχθεί.⁹ Το ισχυρό σήμα της δόνησης έκτασης του υδροξυλίου (OH) που οφείλεται στο μόριο του νερού, παρουσιάζει τριπλή κορυφή που εκτείνεται από 2800 μέχρι 3800 κυματάρια, όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση του φακού.

Σχήμα 10.6: Φάσμα Raman του κερατοειδή χοιρινών οφθαλμών στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων.

Στον Πίνακα Χ.ΙΙ φαίνονται και αποδίδονται συγκεντρωτικά οι κορυφές του φάσματος του κερατοειδή.

Πίνακας Χ.ΙΙ: Οι κορυφές του φάσματος Raman του κερατοειδή και η απόδοσή τους.

Συχνότητα (cm ⁻¹)	Δονήσεις Μορίων	Συχνότητα (cm ⁻¹)	Δονήσεις Μορίων
761	Τρυπτοφάνη	1363	Τρυπτοφάνη
820	ν (C-C)	1405	COO ⁻
860	Προλίνη	1450	δ(CH ₂)
864	Υδροξυπρολίνη	1497	CH ₂ -CH ₃ κάμψη
923	Προλίνη	1552	Τρυπτοφάνη
941	ν (C-C)	1587	Τυροσίνη- Φαινυλαλανίνη
1008	Φαινυλαλανίνη	1609	Φαινυλαλανίνη
1035	Φαινυλαλανίνη	1640	OH
1094	S-O	1645	Αμίδιο I ³⁰
1130	ν (C-N)	1670	Αμίδιο I
1211	Τυροσίνη	2880	CH ₃
1240	Αμίδιο III	2935	CH ₃
1258	Αμίδιο III	2940	CH ₂
1278	Αμίδιο III	2960	CH ₃
1326	δ(CH)	3069	CH
1342	Τρυπτοφάνη	3090-3800	OH

10.3.3 Υδατοειδές υγρό

Το υδατοειδές υγρό αποτελείται από νερό σε ποσοστό περισσότερο από 98%, κατ' επέκταση τα βιολογικά μόρια κατέχουν ποσοστό μικρότερο από 2%. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση των πρωτεϊνών ανέρχεται περίπου στα 0,05-0,16 mg/mL και είναι πολύ δύσκολο να ανιχνευτούν. Επιπλέον είναι υπεύθυνες για το φαινόμενο του φθορισμού που ενισχύει το θόρυβο. Ο ακριβής μηχανισμός του φθορισμού στο υδατοειδές υγρό δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως. Μερικές ουσίες που «ενοχοποιούνται» γι' αυτό, είναι η χολερυθρίνη, η αιμοσφαιρίνη ή και μόρια πορφυρίνης συνδεδεμένα σε πρωτεΐνες.

Οι Wang et. al. απέδειξαν ότι τα μόρια του υδατοειδούς υγρού σκεδάζουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο και η ενεργότητα της σκέδασης είναι γραμμικώς ανάλογη της συγκέντρωσης, πραγματοποιώντας πειράματα σε μοντέλο υδατοειδούς υγρού και σε δείγματα υδατοειδούς υγρού in-vitro.³¹ Τέσσερα από τα συστατικά του υδατοειδούς υγρού είναι ενεργά στη σκέδαση Raman, η γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ, η ουρία και το ασκορβικό οξύ που οι δομές τους φαίνονται στο σχήμα 10.7.

Σχήμα 10.7: Χημικές δομές α) γλυκόζης, β) γαλακτικού οξέως, γ) ουρίας και δ) ασκορβικού οξέως

Το φάσμα του υδατοειδούς υγρού στην περιοχή $750\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ φαίνεται στο σχήμα 10.8. Επισυνάπτεται σε μεγέθυνση η περιοχή $800\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$. Όπως προαναφέρθηκε δεν παρατηρούνται έντονες κορυφές καθώς η συγκέντρωση των ενεργών ουσιών στο Raman είναι πολύ μικρή. Η έντονη και ευρεία κορυφή στους ~ 1640 κυματάριθμους οφείλεται σε σκέδαση του μορίου του νερού (δόνηση κάμψης του μορίου O-H). Το φάσμα χαμηλών συχνοτήτων χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της δόμησης έκτασης C-N του μορίου της ουρίας (1008 cm^{-1})³² και της δόνησης C-COOH του γαλακτικού οξέος ($\sim 865\text{ cm}^{-1}$)³³. Η μικρή κορυφή που μπορεί να παρατηρηθεί με επίκεντρο περίπου $\sim 1051\text{ cm}^{-1}$ προκύπτει από τη δόνηση rocking της ομάδας NH_2 του μορίου της ουρίας^{25,34}. Τέλος η κορυφή στους 1368 κυματάριθμους αποδίδεται στη δόνηση κάμψης της ομάδας $\text{CH}_2\text{-CH}_3$.

Σχήμα 10.8: Φάσμα Raman υδατοειδούς υγρού χοιρινών οφθαλμών στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων. Επισυνάπτεται η μεγέθυνση του φάσματος στην περιοχή $800\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$.

Στη περιοχή από $2800\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$ φασματοσκοπικά κυριαρχεί η κορυφή του νερού με επίκεντρο τους $\sim 3350\text{ cm}^{-1}$ που οφείλεται σε δονήσεις έκτασης του μορίου του υδροξυλίου OH (Σχήμα 10.9α). Μεγεθύνοντας την περιοχή $2750\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$ επισημαίνεται μια διαφοροποίηση μεταξύ του φάσματος του νερού (στικτή γραμμή) και του φάσματος του υδατοειδούς υγρού (συνεχής γραμμή) (Σχήμα 10.9β). Συγκεκριμένα εμφανίζονται κορυφές που αποδίδονται στη συμμετρική δόνηση των μορίων CH_2 και CH_3 ($\sim 2880\text{ cm}^{-1}$) του γαλακτικού οξέως και της γλυκόζης, την

αντισυμμετρική δόνηση του μορίου CH_3 ($\sim 2960 \text{ cm}^{-1}$) του γαλακτικού οξέος και την αντισυμμετρική δόνηση ($\sim 2940 \text{ cm}^{-1}$) του μορίου CH_2 της γλυκόζης³⁵. Στις κορυφές αυτές μπορούν να συνεισφέρουν δονήσεις αμινοξέων που και αυτά περιέχουν μεθυλένια και μεθυλικές ομάδες.

Σχήμα 10.9: α. Φάσμα Raman του υδατοειδούς υγρού χοιρινών οφθαλμών στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων ($2750\text{-}3750 \text{ cm}^{-1}$). β. Φάσμα Raman του υδατοειδούς υγρού χοιρινών οφθαλμών στην περιοχή $2750\text{-}3050 \text{ cm}^{-1}$.

10.4 Συμπεράσματα-Συζήτηση

Ο χρόνος λήψης των φασμάτων στις χαμηλές και της υψηλές συχνότητες επιλέχθηκε ανάλογα με την ένταση των κορυφών στην κάθε φασματική περιοχή και λαμβάνοντας υπόψη ότι το CCD του συστήματος έχει τη δυνατότητα να μετράει σήματα μέχρι 65000 counts. Επίσης η ένταση του laser επιλέχθηκε στα 25 mW, ένταση η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διάταξη του πειράματος για τις μελλοντικές in-vivo φασματοσκοπικές μετρήσεις χωρίς να ελλοχεύει κίνδυνο για τους οφθαλμικούς ιστούς του κερατοειδούς, του υδατοειδούς υγρού και του φακού σε συγκεκριμένο χρόνο έκθεσης.³⁶

Τα φάσματα Raman του φακού και του κερατοειδή παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα, καθώς και τα δύο αποτελούνται από πρωτεΐνες και νερό. Ωστόσο μπορεί να γίνει ο φασματικός διαχωρισμός τους, είτε από την κορυφή χαμηλών συχνοτήτων του κερατοειδή στους 921 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση έκτασης του δεσμού C-C που βρίσκεται στον ετερόκυκλο της προλίνης στη δομή του κολλαγόνου, είτε από την κορυφή υψηλών συχνοτήτων του φακού στους $\sim 3070 \text{ cm}^{-1}$ που οφείλεται σε δονήσεις έκτασης του δεσμού C-H του βενζοϊκού δακτυλίου των αρωματικών

αμινοξέων, βασικών δομικών μονάδων των κρυσταλλινών. Το νερό όπως προαναφέρθηκε είναι το βασικό συστατικό των οφθαλμικών ιστών και φασματικά χαρακτηρίζεται από τις ευρείες κορυφές του με επίκεντρο τους $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ και τους $\sim 3350\text{ cm}^{-1}$. Υπάρχουν τρεις τρόποι δόνησης του μορίου (H-O-H) του νερού, συμμετρική, αντισυμμετρική και κάμψης. Η κορυφή στα 1640 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση κάμψης,³⁷ η συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση φασματικά αντικατοπτρίζεται στις κορυφές με επίκεντρο τους 3280 cm^{-1} και 3490 cm^{-1} αντίστοιχα.³⁸

Η φασματική μελέτη του φακού, του κερατοειδούς και του υδατοειδούς υγρού, κρίθηκε αναγκαία καθότι οι ιστοί αυτοί είναι δυνατόν να συνεισφέρουν φασματοσκοπικά στα φάσματα που λαμβάνονται μέσα από τον πρόσθιο θάλαμο. Επιπλέον είναι απαραίτητη και για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων στη συνέχεια της εργασίας.

Αναφορές

- 1 Gwynne, P., A new window on medicine with spectroscopy, *Biophotonics*. 1994;1:52-54.
- 2 Frank, C., McCreery, R., Redd, D., Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues. *Anal. Chem.* 1995;67:777-783.
- 3 Mizuno, A., Hayashi, T., Tashibu, K., Maraishi, S., Kawauchi, K., Ozaki, Y., Near Infrared FT-Raman spectra of the rat brain tissues. *Neurosci. Lett.* 1992;141:47-52.
- 4 Clarke, R., Isner, J., Gauthier, T., Nakagawa, K., Cerio, F., Hanlon, E., Gaffney, E., Rouse, E., DeJesus, E., Spectroscopic characterization of cardiovascular tissue. *Laser Surgery & Med.* 1988;8:45-59.
- 5 Pezolet, M., Pigeon-Gosselin, M., Savoie, R., Caille, J., Laser Raman Investigation of intact single muscle fibers. On the state of water in the muscle tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* 1978;544:394-406.
- 6 Jongsma, F., Erckens, R., Wicksted, J., Bauer, N., Hendrikse, F., Motamedi, M., Confocal Raman spectroscopy system for non contact scanning of ocular tissues: an in vitro study. *Opt. Eng.* 1997;36:3193-3199.
- 7 Msters, B., *Non invasive Diagnostic Techniques in ophthalmology*. Springer-Verlag, New York (1990).
- 8 Goheen, S., Lis, L., Kauffman, J., Raman spectroscopy of intact feline corneal collagen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1978;536:197-204.
- 9 Siew, D., Clover, G., Cooney, R., Wiggins, P., MicroRaman spectroscopic study of organ cultured cornea. *J. Raman spectrosc.* 1995;26:3-8.
- 10 Nai-Teng, Y., East, E. Laser Raman Spectroscopic Studies of Ocular Lens and its Isolated Protein Fractions. *J. Biol. Chem.* 1975;250:2196-2202.
- 11 Medina-Gutierrez, C., Frausto-Reyes, C., Quintanar-Stephano, J., Sato-Berru, R. Amino acid contents along the visual and equatorial axes of a pig lens by Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta.* 2004;60:2269-2274.
- 12 Medina-Gutierrez, C., Frausto-Reyes, C., Quintanar-Stephano, J., Sato-Berru, R. Barbosa-Garcia, O., Study of the protein distribution in the pig lens cross section by Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta.* 2004;60: 1573-1577.
- 13 Yu, N., Kuck, J., Askren, C., Laser Raman spectroscopy of the lens in situ, measured in anesthetized rabbit. *Current Eye Res.* 1982;1:615-618.
- 14 Yu, N., Bando, M., Kuck, F., Fluorescence/Raman intensity ratio for monitoring the pathologic stage of human lens. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.* 1985;26:97-101.
- 15 Bot, A., Huizinga, A., de Mul, F., Vrensen F., Greve, J., Raman microspectroscopy of fixed rabbit an human lenses and lens slices: new pontialities. *Exp. Eye Res.* 1989;49:161-169.
- 16 Dai, S., Qi, S., Zhag, L., Bai, C., Ni, T., Deng, X., Laser Raman spectrometry study on experimental galactose-induced cataract. *Yen Ko Hsueh Pao [Eye Science]*. 1995;11:143-146.
- 17 Eppstein, J., Bursell, S., Non invasive detection of diabetes mellitus. In *Proceedings of the Physiological Monitoring and Early Detection Diagnostic Method Symposium*, Proc. SPIE 1992;1641:217-226
- 18 Van Best, J., van Gessel, P., Autofluorescence and light scatter in the human lens as measured by fluorophotometer. *Exp. Eye Res.*, 1989;49:511-513.

- 19 Mizuno, A., Ozaki, Y. Agging and cataractous process of the lens detected by laser Raman spectroscopy. *Lens & Eye Tox. Res.* 1997;8:177-187
- 20 Wicksted, J., Erckens, R., Motamedi, M., March, W. Raman Spectroscopy studies of metabolic concentrations in Aqueous solution and aqueous humor specimens. *Appl. Spec.* 1995;49:987-995.
- 21 Wicksted, J., Erckens, R., Motamedi, M., March, W. Monitoring of Aqueous humor metabolites using Raman spectroscopy, in advances in laser and light spectroscopy to diagnose cancer and other deseases. Alfano R., Editor, *Proc. SPIE* 2135, p.264 (1994)
- 22 Rajkumar, B., Romakrishnan, V. Infrared and laser Raman studies of L-Phenylalanine, L-Phenylalaninium perchlorate and bis DL-phenylalanine sulphate monohydrate. *Spectrochim. Acta A.* 2002;58:1923-1934.
- 23 Tsuboi, M., Ezaki, Y., Aida, M., Suzuki, M., Yimit, A., Ushizawa, K., Veda, T. Raman scattering tensors of Tyrosine. *Biospec.* 1998;4:61-71.
- 24 Ramzute, I., Kuodis, Z., Eicher-Lorka, O., Niaura, G. Surface enchanced Raman spectroscopy of indole ring terminated self-assembled monolayer on silver electrode. *Chemija* 2006;17:25-30.
- 25 Miura, T., Takeuchi, H., Harada, I. Tryptophan Raman bands sensitive to hydrogen bonding and side chain comformation. *J. Raman Spec.* 1989;20:667-671.
- 26 Baranska, H., Labundzinska, A., Terpinski, J. Laser Raman spectroscopy analytical applications. Haisted Press: John Wiley & Bros 1987.
- 27 Froushour B., Koenig J., Raman spectra of collagen, gelatin, and elastin. *Biopolymers* 1971; 14:379-392.
- 28 Rippon, W., Koenig. J/. Walton. A. Raman spectroscopy of proline oligomers and poly-L-proline. *J. Am. Chem. Soc.* 1970;92:7455-9.
- 29 Cabassi, F., Casu, B., Perlin, A., Infrared absorption and Raman scattering of sulfate groups of heparan and related glycosaminoglycans in aqueous solution. *Carbohydrate Res.* 1978; 63: 1-11.
- 30 Frushour, B., Koenig, J. *Biopolymers* 1975;14:379-391.
- 31 Wang, S., Hasty, C., Waston, P., Wicksted, J., Stith, R., March, W. Analysis of metaolites in aqueous solution by using laser Raman spectroscopy. *Appl. Opt.* 1993;49:987-993.
- 32 Steward, J. Infrared absorption spectra of Urea, Thiurea, and some Thiurea-Alkali Halide Complexes. *J. Chem. Phys.* 1957;26:24
- 33 Cassanas, G., Morssli, E., Fabregue, E., Bardet, L. Vibration Spectra of lactic acid and lactates. *J. Raman Spectrosc.* 1991 ;22 :407
- 34 Wen, N., Brooker, M. Urea protonation: Raman and theoretical study. *J. Phys. Chem.* 1993;97:8608
- 35 Vasko, P., Blackwell, J., Koenig, J. Infrared and Raman spectroscopy of carbonhydrates: Part II: Normal coordinates analysis of α-D-glucose. *Carbohydr. Res.* 1972;23;407-416.
- 36 Dannheim, F., Rassow, B. Laser lesions of the anterior segment of the rabbit eye. Studies of cornea, iris, lens and sclera using an argon, ruby and YAG-laser. *Albrecht Von Graefes Arch. Klein. Exp. Ophthalmol.* 1978; 205: 175-205.
- 37 Veyaminov, S., Prendergast, F. Water (H₂O and D₂O) molar absorptivity in the 1000-4000 cm⁻¹ range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solution . *Anal. Biochem.* 1997;248:234-245.
- 38 Eisenberg, D., Kauzmann, W. The structure and properties of water. Oxford University Press, London, 1969.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΡΙΩΝ ΣΤΟ ΥΔΑΤΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ ΧΟΙΡΙΝΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN

11.1 Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν

Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για φαρμακοκινητικές μελέτες σε οφθαλμούς χοίρων είναι δύο αντιβιοτικά και η γλυκόζη. Τα αντιβιοτικά Solvetan® και Fungizone® χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις εσώκλειστες οδηγίες των εμπορικών του συσκευασμάτων· στην εργασία αυτή θα αναφέρονται ως κεφταζιδίμη και αμφοτερισίνη Β αντίστοιχα, χάρη στις ονομασίες των ενεργών ουσιών που περιέχουν. Η γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία τεχνητής παθολογικής κατάστασης διαβήτη. Στο κεφάλαιο αυτό μελετώνται φασματοσκοπικά οι παραπάνω ουσίες στην κρυσταλλική τους μορφή και σε υδατικά διαλύματα. Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση των υδατικών τους διαλυμάτων με τα φάσματα των ενδογενών ιστών του οφθαλμού και τέλος μελετώνται οι ουσίες αυτές στον πρόσθιο θάλαμο χοιρινών οφθαλμών, in-vitro.

11.1.1 Κεφταζιδίμη

Η Κεφταζιδίμη είναι βακτηριοκτόνο αντιβιοτικό (τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνη) που δρα αναστέλλοντας τη σύνθεση των πρωτεϊνών στο κυτταρικό τοίχωμα των μικροβίων. Μεγάλος αριθμός παθογόνων μικροβίων είναι ευαίσθητος στην κεφταζιδίμη, όπως μικροβίων που προκαλούν ενδοφθαλμίτιδα, πνευμονία, μηνιγγίτιδα, και γενικότερα σοβαρές λοιμώξεις του αναπνευστικού, ουροποιητικού και γαστρεντερικού, των οστών και των αρθρώσεων. Τα τελευταία χρόνια συστήνεται από την ερευνητική και ιατρική κοινότητα ως ο κύριος αντικαταστάτης της αμικασίνης για την αντιμετώπιση της βακτηριακής ενδοφθαλμίτιδας λόγω της μειωμένης της

τοξικότητας στον αμφιβληστροειδή. Χορηγείται ενδοφλέβια ή με παρακέντηση απευθείας στον οφθαλμό.

Η κεφατζιδίμη ($C_{23}H_{23}N_5O_7S_2$) έχει μοριακό βάρος 545.584. Η δομή της φαίνεται στο σχήμα 11.1. Είναι λευκή, κρυσταλλική, άοσμη σκόνη με ΡΗ 3-4 (10% υδατικό διάλυμα). Παρουσιάζει σταθερότητα σε συνήθεις συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης ενώ μπορεί να εκλυθούν τοξικοί ατμοί κατά την αποσύνθεσή της υπό θέρμανση. Η εμπορική ονομασία της συσκευασίας που χρησιμοποιήθηκε είναι “Solvetan® 1g Injection” και παρέχεται σε ενέσιμη ξηρή μορφή, την οποία προμηθευτήκαμε από φαρμακείο.

Σχήμα 11.1: Στερεοχημικός τύπος Κεφατζιδίμης.

11.1.2 Αμφοτερισίνη Β

Η αμφοτερισίνη Β είναι το πιο σημαντικό φάρμακο για τη θεραπεία των θανατηφόρων ασθενειών που προκαλούνται από μύκητες, παρόλο που η τοξικότητα της περιορίζει τη χρήση της. Πρωτοεμφανίστηκε στην αγορά το 1950 και παρόλο που τα τελευταία 15 χρόνια μεγάλος αριθμός αντι-μυκητιακών φαρμάκων έχουν αναπτυχθεί, η αμφοτερισίνη παραμένει το πιο ισχυρό για τη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων. Στην οφθαλμολογία χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση μυκητιάσεων, όπως η μυκητιασική ενδοφθαλμίτιδα. Παράγεται από τον μικρο-οργανισμό *Streptomyces nodosus* που βρίσκεται σε βακτήρια του εδάφους ικανά να επικολληθούν στην εργοστερόλη που βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των μυκήτων, αυξάνοντας τη διαπερατότητα της μεμβράνης με αποτέλεσμα την απόπτωση των κυττάρων. Λόγω της υψηλής τοξικότητάς της συνιστάται να χρησιμοποιείται μεγάλη προσοχή.

Η αμφοτερισίνη Β ($C_{47}H_{73}NO_{17}$) έχει μοριακό βάρος 924,09 και η πολυενική δομή της φαίνεται στο σχήμα 11.2. Ονομάστηκε έτσι λόγω των επαμφοτεριζόντων ιδιοτήτων της καρβοξυλικής ομάδας και της αμινομάδας. Αυτές οι δύο ομάδες αυξάνουν την διαλυτότητα των υδατικών διαλυμάτων του φαρμάκου σε όξινο και βασικό περιβάλλον. Παρουσιάζει ευαισθησία στο φως, τη θερμότητα και τον αέρα, γι'

αυτό πρέπει να φυλάσσεται σε μέρος σκιερό και ξηρό στους 25°C. Η εμπορική ονομασία της φαρμακευτική ουσίας που χρησιμοποιήθηκε είναι “Fungizone® 50 mg” και παρέχεται σε ενέσιμη ξηρή μορφή με υποκίτρινο χρώμα, την οποία προμηθευτήκαμε από φαρμακείο.

Σχήμα 11.2: Στερεοχημικός τύπος *Amphotericin B*

11.1.3 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι απλός μονοσακχαρίτης και ένας από τους πιο σημαντικούς υδατάνθρακες που χρησιμοποιείται σαν πηγή ενέργειας σε ζώα, φυτά και άνθρωπο. Στη διαδικασία της αναπνοής των κυττάρων και της φωτοσύνθεσης, μέσω μιας σειράς από αντιδράσεις ενζυμικής κατάλυσης, η γλυκόζη οξειδώνεται παράγοντας διοξείδιο του άνθρακα και νερό και αποδίδοντας ενέργεια κυρίως με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP, adenosine triphosphate). Στους ζωικούς οργανισμούς παράγεται κυρίως στο συκώτι αλλά και στα νεφρά και τους σκελετικούς μύες από την αποσύνθεση του γλυκογόνου (γλυκογενόλυση) αλλά και τη διαδικασία της γλυκονεογένεσης (παραγωγή γλυκόζης από άλλα οργανικά μόρια όπως πυροσταφυλικό οξύ, λακτόζη, γλυκερόλη και αμινοξέα).

Η γλυκόζη $C_6H_{12}O_6$, είναι εξόζη (μονοσακχαρίτης με 6 άνθρακες), χαρακτηρίζεται όμως και ως αλδεϋδη (περιέχει την ομάδα $-CHO$) στην κυκλική της δομή. Το μοριακό της βάρος είναι 180,18. Πέντε από τα άτομα του άνθρακα και το άτομο του οξυγόνου σχηματίζουν δακτύλιο που ονομάζεται “πυρανοζικός δακτύλιος” (Σχήμα 11.3). Αυτή είναι η πιο σταθερή μορφή από τις αλδόζες που περιέχουν έξι άτομα άνθρακα. Σε αυτό το δακτύλιο κάθε άτομο του άνθρακα συνδέεται με υδροξύλιο και άτομα υδρογόνου με εξαίρεση το πέμπτο άτομο που συνδέεται με το έκτο άτομο άνθρακα έξω από τον δακτύλιο, σχηματίζοντας την ομάδα CH_2OH .

Σχήμα 11.3: Στερεοχημικός τύπος του μορίου της γλυκόζης.

Το μόριο της γλυκόζης σχηματίζει δύο εναντιομερή, τη D-γλυκόζη και την L-γλυκόζη, αλλά στους ζώντες οργανισμούς έχει βρεθεί μόνο το D-ισομερές. Αν το καρβοξύλιο του πέμπτου ατόμου άνθρακα βρίσκεται δεξιά προκύπτει το D εναντιομερές, αν είναι από αριστερά σχηματίζεται το L-εναντιομερές. Ο δακτύλιος επίσης μπορεί να σχηματιστεί με δύο διαφορετικούς τρόπους, σχηματίζοντας την α και β γλυκόζη που διαφέρουν στον προσανατολισμό της ομάδας του υδροξυλίου που συνδέεται με το πρώτο άτομο άνθρακα του δακτυλίου. Η α μορφή έχει την ομάδα υδροξυλίου κάτω από το υδρογόνο ενώ η μορφή β έχει το υδροξύλιο πάνω από το άτομο του υδρογόνου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε “D-(+)-glucose 99,5 %” που προμηθευτήκαμε από την εταιρεία Aldrich.

Η γλυκόζη είναι το πιο διαδεδομένο καύσιμο στη βιολογία και αυτό συμβαίνει γιατί μπορεί να σχηματιστεί από φορμαλδεΰδη σε αβιοτικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα την ύπαρξη της και στα αρχέγονα βιολογικά συστήματα. Πολύ σημαντική ιδιότητα της γλυκόζης είναι ότι αντιδρά ελάχιστα με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών (γλυκοσυλίωση) συγκριτικά με τις άλλες εξόζες, μια διαδικασία που περιορίζει ή καταστρέφει τη λειτουργία πολλών ενζύμων. Παρόλα αυτά πολλές αρνητικές επιπτώσεις του διαβήτη (τύφλωση, νεφρική ανεπάρκεια και περιφερειακή ανεπάρκεια) οφείλεται πιθανότατα στη γλυκοσυλίωση των πρωτεϊνών.

Ο διαβήτης είναι η ασθένεια κατά την οποία δεν παράγεται, καθόλου ή επαρκώς, ινσουλίνη στον οργανισμό. Η ινσουλίνη είναι η ορμόνη που μεταβολίζει τη γλυκόζη και τις αμυλούχες τροφές σε ενέργεια. Η διαταραχή αυτή έχει ως αποτέλεσμα να μεταβάλλονται τα φυσιολογικά επίπεδα της γλυκόζης στον οργανισμό. Η αιτία αυτής της ανωμαλίας συνεχίζει να είναι ένα μυστήριο, αν και σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν παράγοντες όπως η παχυσαρκία και η μειωμένη σωματική άσκηση. Από πρόσφατες έρευνες φαίνεται ότι το 6,3% του ποσοστού των ανθρώπων πάσχουν από διαβήτη ενώ υπάρχει και μεγάλος αριθμός ασθενών που δεν το γνωρίζει.

Σημαντικό ενδιαφέρον για τον έλεγχο της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε διαβητικούς ασθενείς έχει παρουσιαστεί διότι ο συνεχής έλεγχος της συγκέντρωσής της στον ορό του αίματος, βοηθάει στη ρύθμιση των δόσεων της ινσουλίνης με αποτέλεσμα να μειώνονται τα μακροχρόνια προβλήματα που προκαλούνται από την ασθένεια αυτή.¹ Ο καθορισμός των επιπέδων γλυκόζης είναι μια επίπονη διαδικασία για τους ασθενείς, που απαιτεί επανειλημμένες παρακεντήσεις ή αφαίμαξη από το δάχτυλο. Η μεγάλη ανάγκη όμως για συνεχή έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στον οργανισμό έστρεψε τις έρευνες προς την ανάπτυξη μη επεμβατικών τεχνικών. Στόχος είναι η ανάπτυξη προσωπικών, φορητών ανιχνευτών γλυκόζης που έρχονται σε επαφή με ανθρώπινα μέρη χωρίς διάτρηση με σύριγγα για αναρρόφηση υγρού δείγματος και χωρίς αφαίρεση κάποιου ζωτικού ιστού με εγχειρητική διαδικασία. Το αποτέλεσμα θα είναι η διαδικασία ελέγχου να είναι ανώδυνη, χωρίς την έκθεση του ασθενούς σε βιοεπικίνδυνα υλικά και αιχμηρά αντικείμενα. Σημαντικά πλεονεκτήματα επίσης των μη επεμβατικών τεχνικών είναι η μείωση του χρόνου των μετρήσεων και η ευχρηστία των συσκευών με αποτέλεσμα πιο συχνές και άμεσες μετρήσεις. Οι αυξημένες ανάγκες των ασθενών καθώς και το εμπορικό ενδιαφέρον οδήγησαν σε πληθώρα ερευνών σε αυτόν τον τομέα.

Ανασκόπηση των επιστημονικών ερευνών και των ευρεσιτεχνιών στην βιβλιογραφία υποδεικνύουν ότι διατάξεις αυτού του είδους δίνουν βάση στην καινοτομία και την ευχρηστία, με λιγότερη έμφαση στην ακρίβεια των αποτελεσμάτων ή στον πειραματικό σχεδιασμό. Γενικά, μεγάλος αριθμός μη επεμβατικών συσκευών για τη μέτρηση των επιπέδων της γλυκόζης στερούνται επιστημονικού/ ερευνητικού υποβάθρου και μερικές μπορεί να βασίζονται σε ελλειπείς ή αναπόδεικτες υποθέσεις. Η κατάσταση αυτή ανέδειξε την ανάγκη του μη επεμβατικού ελέγχου των επιπέδων γλυκόζης που να παρέχουν ακρίβεια στα αποτελέσματα.^{2,3,4,5,6}

Οι σύγχρονες μη επεμβατικές συσκευές βασίζονται κυρίως σε οπτικές τεχνικές (απορρόφηση υπερύθρου, πολารιμετρία και φασματοσκοπία Raman) για την μέτρηση των επιπέδων κάποιας ουσίας στον οργανισμό. Τέτοιες συσκευές επεξεργάζονται οπτικά σήματα που προέρχονται από τη σκέδαση, απορρόφηση ή ανάκλαση της εξωτερικής στοιβάδας του προς εξέταση ιστού, τους υποδόριους ιστούς, τα ενδιάμεσα υγρά, το αίμα (φλεβικό και αρτηριακό). Κάθε ένας από αυτούς τους ιστούς παρουσιάζει διαφορετικές οπτικές ιδιότητες, καθώς και διαφορετικές συγκεντρώσεις της γλυκόζης. Η συγκέντρωση της γλυκόζης ποικίλει ανάλογα με τον ανθρώπινο ιστό από όπου λαμβάνεται η μέτρηση και πρέπει να συσχετιστεί η τιμή αυτή με την ακριβή τιμή της συγκέντρωσης στο πλάσμα.

Η φασματοσκοπία Raman έχει χρησιμοποιηθεί αρχικά για τον προσδιορισμό των δονητικών κέντρων των μορίων ποιοτικά. Η πολυπλοκότητα των συστημάτων και οι

δυσκολίες στην βαθμονόμηση και ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων καθυστέρησαν τις ποσοτικές μετρήσεις.^{7,8} Άλλα προβλήματα όπως το φαινόμενο του φθορισμού λόγω της ανομοιογένειας των βιολογικών ιστών αντιμετωπίζονται με τη χρήση πηγών laser στο υπέρυθρο, δίνοντας τη δυνατότητα ανίχνευσης μικρών σημάτων Raman χαρακτηριστικών της γλυκόζης, που αντιστοιχούν σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις της ουσίας.^{9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21}

Το φάσμα Raman της γλυκόζης δίνει τις θεμελιώδεις δονήσεις του μορίου της. Συγκεκριμένα στο φάσμα υδατικού διαλύματος γλυκόζης παρατηρούνται χαρακτηριστικές κορυφές στους 900-1200 cm^{-1} που οφείλονται σε δονήσεις έκτασης των δεσμών C-O και C-C, καθώς και στους 2900 cm^{-1} που αντιπροσωπεύουν δονήσεις έκτασης του δεσμού C-H.⁹ Τα αποτελέσματα από in-vitro και ex-vivo μελέτες είναι ενθαρρυντικά για μελλοντικές εργασίες στον συγκεκριμένο τομέα. Η συγκέντρωση της γλυκόζης που έχει βρεθεί σε μελέτες με φασματοσκοπία Raman είναι 0,13 mg/mL σε υδατικό διάλειμμα και 1,3 mg/mL σε βιολογικά αντιδραστήρια (έγινε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με PLS ανάλυση) χρησιμοποιώντας τις χαρακτηριστικές κορυφές σκέδασης στα 900-1150 και 2850-3000 cm^{-1} .¹⁰ Η γλυκόζη επίσης έχει ανιχνευτεί σε ορό αίματος στη συγκέντρωση 0,45 mg/mL μελετώντας την anti-Stokes δόνηση Raman στους 1130 cm^{-1} .²⁰ Τα χαμηλά επίπεδα ανίχνευσης της γλυκόζης σε υδατικά διαλύματα που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία και παρουσιάζονται στον Πίνακα XI.I αναδεικνύουν τις προοπτικές αυτής της τεχνικής.²²

Για να εξετασθούν τα επίπεδα γλυκόζης στον ανθρώπινο οργανισμό in vivo, είναι απαραίτητο πρώτα να επιλυθούν σημαντικά προβλήματα. Μερικά από αυτά είναι όπως προαναφέρθηκε ο φθορισμός, οι δερματολογικές επιπτώσεις από την έκθεση σε ακτινοβολία laser και το ασθενές σήμα της ουσίας σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Μερικά από τα παραπάνω προβλήματα αντιμετωπίζονται χρησιμοποιώντας ένα πιο διαυγές μέσο μέτρησης από το πλάσμα ή τους ιστούς. Για το λόγο αυτό έχουν προταθεί μετρήσεις στον οφθαλμό καθώς η διαφάνεια του κερατοειδή δίνει τη δυνατότητα για απευθείας οπτική πρόσβαση στον πρόσθιο θάλαμο, που περιέχει το υδατοειδές υγρό.^{11,12,23,24,25,26} Στις εφαρμογές αυτές, η ένταση του laser πρέπει να είναι περιορισμένη για να αποφεύγονται πιθανές βλάβες των ευπαθών οφθαλμικών ιστών. Αναφέρεται ότι τα επίπεδα της γλυκόζης σε υδατοειδές υγρό οφθαλμού υγιούς ατόμου είναι ~0,6 mg/mL ενώ σε άτομο που πάσχει από διαβήτη μετρήθηκε ~1,4 mg/mL.²⁷ Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υδατοειδές υγρό έχει αναφερθεί ότι συνδέεται άμεσα με τη συγκέντρωση της στο πλάσμα σε πειραματόζωα και στον άνθρωπο.^{28,29,30,31} Έχει επίσης βρεθεί ότι η ισορροπία μεταξύ της συγκέντρωσης της γλυκόζης του ορού και της οφθαλμικής κοιλότητας επέρχεται μέσα σε λίγα λεπτά.^{24,32,33} Για την ποσοτικοποίηση των πειραματικών αποτελεσμάτων πολλοί

ερευνητές επεξεργάζονται τις μετρήσεις της φασματοσκοπίας Raman με μαθηματικά μοντέλα (PLS analysis) για να προβλέψουν τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης και των άλλων συστατικών με ακρίβεια στο υδατοειδές υγρό, το ορό και το αίμα.^{34,35,36,37}

Εξυπακούεται ότι είναι πολύ χρήσιμο να ανιχνευτούν και να ποσοτικοποιηθούν τα επίπεδα φυσιολογικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό, οι μεταβολές των οποίων σηματοδοτούν βιοχημικές διεργασίες στους οφθαλμικούς ιστούς και σχετίζονται άμεσα με ασθένειες.

Πίνακας XI.I: Ελάχιστα όρια ανίχνευσης της γλυκόζης σε υδατικά διαλύματα με φασματοσκοπία Raman.

Διάλυμα γλυκόζης (laserline, nm)	Ελάχιστη συγκέντρωση
Διάλυμα γλυκόζης, γαλακτικού οξέος, ουρίας (514,5 nm) ¹⁴	1,4 mg/mL
Υδατικό διάλυμα (514,5 nm) ¹⁰	0,3 mg/mL
Διάλυμα σε βιολογικό αντιδραστήριο(514,5 nm) ¹⁰	1,3 mg/mL
Διάλυμα βοδινής ορολευκωματίνης (785 nm) ¹⁰	0,3 mg/mL

11.2 Παρασκευή Δειγμάτων

11.2.1 Κρυσταλλική Μορφή

Οι σκόνες των φαρμακευτικών ουσιών και της γλυκόζης συμπίεστηκαν σε πελέτες διαμέτρου 1 mm περίπου, οι οποίες τοποθετήθηκαν μπροστά από τον αντικειμενικό φακό του συστήματος φασματοσκοπίας Raman.

11.2.2 Υδατικά Διαλύματα

Για την παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων των αντιβιοτικών και της γλυκόζης, απεσταγμένο νερό και ποσότητα των προς εξέταση ουσιών προστέθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες διαμέτρου 15 mm· ακολουθεί ανάδευση ώστε να εξασφαλισθεί η ομοιογένεια των διαλυμάτων. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται με κατάλληλη στήριξη στην κοινή εστία του ασφαιρικού φακού και του δεύτερου φακού συλλογής του συστήματος T64000.

11.2.3 Δείγματα χοιρινών οφθαλμών

Οι χοιρινοί οφθαλμοί μετά την σφαγή των ζώων αφαιρούνται, ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό και τοποθετούνται σε δοχείο με κατάλληλη υγρασία όπου συντηρούνταν για 24 ώρες σε θερμοκρασία 4°C, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν τυχόν διαδικασίες υποβάθμισης, όπως η γλυκόλυση. Για τις φαρμακοκινητικές μελέτες, από κάθε οφθαλμό αντλήθηκε με παρακέντηση 0,1 mL υδατοειδούς υγρού και αντικαταστήθηκε με ίσο όγκο υδατικού διαλύματος που περιείχε διάφορες ποσότητες κεφταζιδίμης, αμφοτερισίνης και γλυκόζης σε διαφορετικά πειράματα για

την κάθε ουσία. Για τα διαλύματα των ουσιών χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό. Ο όγκος του υδατοειδούς υγρού είναι ~0,4 mL. Σε κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού πραγματοποιήθηκαν διαφορετικά πειράματα έτσι ώστε να διασφαλιστεί η παρουσία γνωστής συγκέντρωσης τους στον πρόσθιο θάλαμο. Ακολούθως λήφθηκε σειρά φασμάτων Raman για διαφορετικές συγκεντρώσεις των ουσιών στο υδατοειδές υγρό των χοιρινών οφθαλμών. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις για τη κεφαζιδίμη ήταν 65-0,9 mg/mL, για την αμφοτερισίνη B 5 mg/mL- 9 µg/mL και για τη γλυκόζη 600-2 mg/mL. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικό υποδοχέα (που κατασκευάστηκε σε συνεργασία με το μηχανουργείο του ΙΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ) και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη προσοφθάλμια διάταξη και τη γεωμετρία που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 9.

11.3 Πειραματικές Διατάξεις

11.3.1 Φάσματα Κρυσταλλικής μορφής

Η φασματοσκοπική μελέτη του μορίου της κεφαζιδίμης και της γλυκόζης σε κρυσταλλική μορφή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της ευέλικτης οργανολογίας Raman που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 7. Χρησιμοποιήθηκε αντικειμενικός φακός (Olympus 50x) εστιακής απόστασης 10 mm. Η ισχύς του laser ήταν ~15 mW στο δοκίμιο και ο χρόνος έκθεσης 1 δευτερόλεπτο.

Η σκόνη της αμφοτερισίνης λόγω του υποκίτρινου χρώματος της, παρουσιάζει φαινόμενα φθορισμού όταν ακτινοβολείται στο πράσινο, κάτι που αποτελεί τροχοπέδη στη λήψη φασμάτων με το σύστημα T-64000 (514,5 nm) και με την ευέλικτη οργανολογία Raman (532 nm). Για το λόγο αυτό το φάσμα του συγκεκριμένου φαρμάκου ελήφθη με το σύστημα FT-Raman που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 7. Η ένταση του laser υπολογίζεται περίπου 250 mW και το φάσμα λήφθηκε με 100 scans.

11.3.2 Φάσματα Υδατικών Διαλυμάτων

Τα φάσματα των υδατικών διαλυμάτων των συγκεκριμένων ουσιών ελήφθησαν στο εργαστηριακό σύστημα Raman T-64000 σε γεωμετρία σκέδασης 90°. Χρησιμοποιήθηκε δέσμη laser με ένταση 25 mW. Ο χρόνος συλλογής επιλέχθηκε έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο θόρυβος των φασμάτων και να μην υπάρχουν προβλήματα κορεσμού του ανιχνευτή. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιέχουν τα διαλείμματα τοποθετούνταν με κατάλληλη στήριξη στις εστιακές αποστάσεις του ασφαιρικού φακού και του φακού συλλογής.

11.3.3 Φάσματα σε Πρόσθιο Θάλαμο Χοιρινών Οφθαλμών, in-vitro

Για τη μελέτη της φαρμακοκινητικής των συγκεκριμένων αντιβιοτικών και την ανίχνευση της γλυκόζης στο υδατοειδές υγρό χοιρινών οφθαλμών in-vitro, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στη διάταξη των 90° του συστήματος T-64000.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ισχύ laser στο δείγμα 25-mW, χρόνο έκθεσης 1s, ενώ η ελάχιστη διάμετρος της συγκλίνουσας δέσμης μέσα στο υδατοειδές υγρό, στο επίπεδο του οπτικού άξονα, ήταν $\sim 1\text{mm}^2$.

Στις μετρήσεις των αντιβιοτικών επιλέχθηκε βαθμός σύζευξης "binning" 4, ενώ στα πειράματα της γλυκόζης 6.

Τέλος όλα τα φάσματα, τόσο των αντιβιοτικών όσο και της γλυκόζης, εξομαλύνθηκαν κατά ένα παράγοντα 3 εφαρμόζοντας τη μέθοδο FFT (Fast Fourier Transform).

11.4 Φασματοσκοπική μελέτη της κρυσταλλικής μορφής των ουσιών Κεφταζιδίμη, Αμφοτερισίνη Β και Γλυκόζη.**11.4.1 Κεφταζιδίμη**

Αντιπροσωπευτικό φάσμα του μορίου της κεφταζιδίμης σε κρυσταλλική μορφή, με τη χρήση της ευέλικτης οργανολογίας Raman, φαίνεται στο σχήμα 11.4. Παρατηρείται μια έντονη τριπλή κορυφή με επίκεντρο τους 1590 cm^{-1} και μια δευτερεύουσα στους 1035 cm^{-1} που αποδίδονται σε δονήσεις τάσεις των ετεροκυκλικών συζυγών μονάδων της.

Σχήμα 11.4: Φάσμα Raman του αντιβιοτικού Κεφταζιδίμης σε κρυσταλλική μορφή.

11.4.2 Αμφοτερισίνη Β

Αντιπροσωπευτικό φάσμα κρυσταλλικής μορφής της ουσίας, στην περιοχή 1000-4000 cm^{-1} , φαίνεται στο σχήμα 11.5. Οι πιο έντονες χαρακτηριστικές κορυφές δόνησης εμφανίζονται στους 1150 cm^{-1} και 1554 cm^{-1} . Η ισχυρότερη κορυφή στους 1554 cm^{-1} οφείλεται στη συμμετρική δόνηση της συζυγίας των δεσμών C=C του επταενικού τμήματος της ένωσης. Ενώ η κορυφή στους 1153 cm^{-1} οφείλεται πιθανώς σε δόνηση έκτασης του δεσμού C-C, σε in plane δόνηση κάμψης του δεσμού C-C-H και σε δόνηση κάμψης της ομάδας C=C-C, ενώ υπάρχει και συνεισφορά από την δόνηση έκτασης των διπλών δεσμών C=C. Η ασθενής κορυφή στους 1635 cm^{-1} πιθανώς προκύπτει από αντισυμμετρική δόνηση των συζευγμένων διπλών δεσμών του μορίου της αμφοτερισίνης. Η πιθανότητα αυτή η κορυφή να έχει συνεισφορά από τον μετασχηματισμό NH_2 αποκλείεται, διότι δεν μετατοπίζεται κατά τη δευτερίωση του δείγματος.³⁸ Στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων 2800-3100 cm^{-1} εμφανίζονται κορυφές που αποδίδονται σε δονήσεις του δεσμού C-H, των τερματικών μεθυλίων, καθώς και των μεθυλενομάδων της.³⁹ Οι παραπάνω κορυφές σκέδασης καθώς και η μοριακή συσχέτιση φαίνονται στον Πίνακα XI.II.

Πίνακας XI.II: Συχνότητες των μεταπτώσεων Raman για την αμφοτερισίνη Β σε σκόνη και οι δονήσεις με τις οποίες σχετίζονται.

Wavenumbers (cm ⁻¹)	Vibration modes
1150	C-C, C-C-H, C=C-C
1554	C=C (συμμετρική)
1635	C=C (αντισυμμετρική)
2800-3000	C-H, CH ₂ , CH ₃

Σχήμα 11.5: Φάσμα Raman του αντιβιοτικού Αμφοτερισίνης σε κρυσταλλική μορφή.

11.4.3 Γλυκόζη

Αντιπροσωπευτικό φάσμα των μορίων της γλυκόζης που λήφθηκε από σκόνη με τη χρήση της ευέλικτης οργανολογίας Raman, φαίνεται στο σχήμα 11.6. Το φάσμα αυτό παρουσιάζει τις χαρακτηριστικές κορυφές δόνησης που φαίνονται στον Πίνακα XI.III. Η κορυφές στους 847 και 919 cm⁻¹ οφείλονται σε δονήσεις των μορίων C-C και C-H.^{40,41} Η χαρακτηριστική κορυφή γύρω στους 1076 cm⁻¹ έχει αποδοθεί σε σκέδαση των μορίων C1-H,⁴² ενώ αντίστοιχη στην περιοχή των 1156 cm⁻¹ οφείλεται πιθανώς σε δονήσεις του γωνιακού δεσμού C-O-C.²² Μελέτες έχουν δείξει ότι η κορυφή στους 1225 cm⁻¹ δημιουργείται από δόνηση έκτασης του μορίου C-O του δακτυλίου της γλυκόζης.⁴³ Επιπλέον, δονήσεις των ομάδων O-C-H και CH₂ δείχνουν να σκεδάζουν σε συχνότητες γύρω στους 1400 και 1463 cm⁻¹, αντίστοιχα.^{42,43} Οι κορυφές στη περιοχή υψηλών συχνοτήτων πάνω από τους 2700 cm⁻¹ αποδίδονται σε δονήσεις των μορίων CH₂, C-H και OH.^{42,43}

Σχήμα 11.6: Φάσμα Raman του μορίου της γλυκόζης σε στερεή κατάσταση που λήφθηκε με την ευέλικτη οργανολογία Raman.

Πίνακας XI.III: Οι πιο έντονες κορυφές που παρατηρούνται στο φάσμα της γλυκόζης σε κρυσταλλική μορφή και η μοριακή συσχέτιση.

Wavenumbers (cm ⁻¹)	bonds
847	C-C, C-H, C-O
919	C-C, C1-H
1076	C1-H, C-O, C-C, C-O-H
1156	C-O-C, C-C, C-O-H
1225	C-O, C-C, C-C-H,
1409	O-C-H, C-C-H
1463	CH ₂ , C-C-H, O-C-H
2896	CH ₂ , CH
2952	CH, CH ₂
3282	O-H
3399	O-H

11.5 Φασματοσκοπική Μελέτη των υδατικών διαλυμάτων των ουσιών κεφταζιδίμη, αμφοτερισίνη B και γλυκόζη.

11.5.1 Κεφταζιδίμη

Φάσμα υδατικού διαλύματος κεφταζιδίμης συγκέντρωσης 25 mg/mL φαίνεται στο σχήμα 11.7, όπου διακρίνονται εύκολα οι πιο έντονες χαρακτηριστικές κορυφές του μορίου της. Συγκεκριμένα στη περιοχή χαμηλών συχνοτήτων ($500\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$) διακρίνεται η τριπλή κορυφή με αιχμές στους 1513 , 1590 και 1640 cm^{-1} , καθώς και η πιο ασθενής κορυφή στους 1035 cm^{-1} . Το μόριο του νερού λόγω της δόνησης του μορίου του υδροξυλίου (OH) συνεισφέρει με ευρεία κορυφή στους $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$, γι' αυτό παρατηρείται και αλλαγή στην σχετική ένταση της συγκεκριμένης κορυφής σε σχέση με αυτήν στους 1590 cm^{-1} σε σύγκριση με το φάσμα κρυσταλλικής κεφταζιδίμης που περιγράφηκε παραπάνω. Πρωτίστως όμως παρατηρείται η έντονη και ευρεία κορυφή του νερού στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων με επίκεντρο περίπου τους 3350 cm^{-1} . Το σχήμα 11.7α παρουσιάζει το φάσμα του υδατικού διαλύματος κεφταζιδίμης σε μεγάλο εύρος συχνοτήτων ενώ στο σχήμα 11.7β παρατίθεται το φάσμα χαμηλών συχνοτήτων. Για την καλύτερη οπτικοποίηση των φασμάτων έγινε προσαρμογή της κλίμακας του άξονα y και στις δύο φασματικές περιοχές.

Σχήμα 11.7: Φάσμα του υδατικού διαλύματος κεφταζιδίμης συγκέντρωσης 25 mg/mL. α) ευρύ φασματικό παράθυρο, β) φασματικό παράθυρο χαμηλών συχνοτήτων.

11.5.2 Αμφοτερισίνη B

Στο φάσμα του υδατικού διαλύματος της ένωσης, συγκέντρωσης 2 mg/mL, διακρίνονται εύκολα οι δύο πιο έντονες, χαρακτηριστικές κορυφές του μορίου της αμφοτερισίνης στους 1150 και 1554 cm^{-1} καθώς και η ευρεία κορυφή στους $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ που όπως και η έντονη κορυφή με επίκεντρο στους $\sim 3350\text{ cm}^{-1}$ οφείλεται στις

δονήσεις του υδροξυλίου (OH) του μορίου του νερού. Οι δύο πρώτες κορυφές όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο οφείλονται στις δονήσεις C-C και C=C αντίστοιχα.^{41,43} Το σχήμα 11.8α παρουσιάζει το φάσμα του υδατικού διαλύματος αμφοτερισίνης Β σε μεγάλο εύρος συχνοτήτων ενώ στο σχήμα 11.8β παρατίθενται τα φάσματα χαμηλών συχνοτήτων. Για την καλύτερη οπτικοποίηση των φασμάτων έγινε προσαρμογή της κλίμακας του άξονα y και στις δύο φασματικές περιοχές.

Σχήμα 11.8: Φάσμα του υδατικού διαλύματος αμφοτερισίνης Β συγκέντρωσης 2 mg/mL. α) ευρύ φασματικό παράθυρο, β) φασματικό παράθυρο χαμηλών συχνοτήτων.

11.5.3 Γλυκόζη

Το φάσμα αναφοράς του υδατικού διαλύματος γλυκόζης (40 mg/mL) που λήφθηκε από οπτική κυψελίδα φαίνεται στο σχήμα 11.9. Πιο συγκεκριμένα στο σχήμα 11.9α παρουσιάζεται το φάσμα του υδατικού διαλύματος γλυκόζης στις χαμηλές συχνότητες, ενώ στο σχήμα 11.9β παρατίθεται το φάσμα υψηλών συχνοτήτων. Η φασματική μελέτη του υδατικού διαλύματος της γλυκόζης παρουσιάζει έντονες κορυφές δόνησης σε δύο κυρίως φασματικές περιοχές 500-1500 και 2700-3600 cm^{-1} . Ομαδοποιώντας τις ισχυρότερες κορυφές Raman του υδατικού διαλύματος της γλυκόζης ανάλογα με τη μοριακή δόνηση που σχετίζονται, διακρίνονται οι εξής φασματικές ομάδες: Οι κορυφές στους 1067, 1027, 918 cm^{-1} αντιπροσωπεύουν δόνηση της ομάδας μορίων C-O-H.^{44,45} Οι κορυφές που παρατηρούνται στους 1459 και 1265 cm^{-1} πιθανώς να σχετίζονται με δονήσεις κάμψης των δεσμών των μορίων CH_2 .^{46,47,22} Επιπλέον, η δόνηση του δεσμού του μορίου C-H φαίνεται να σκεδάζει στις εξής φασματικές περιοχές 1369, 1265, 1067, 918 και 853 cm^{-1} .^{46,47} Η διπλή κορυφή με μέγιστα στους 2907 και 2950 cm^{-1} οφείλεται στη συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση έκτασης των δεσμών CH_2 με συνεισφορά της δόνησης τάσης του μεθυνίου, CH .²² Τέλος, οι ευρείες κορυφές που παρατηρούνται με επίκεντρο τους 1640 και 3350 cm^{-1} είναι χαρακτηριστικές κορυφές του μορίου του νερού που οφείλεται σε

δόνηση κάμψης και έκτασης του μορίου H-O-H,⁴⁷ αντίστοιχα. Στον Πίνακα XI.IV παρατίθενται οι πιο έντονες κορυφές που παρατηρούνται στο φάσμα υδατικού διαλύματος γλυκόζης και οι δονήσεις των μορίων με τις οποίες σχετίζονται.

Πίνακας XI.IV: Οι πιο έντονες κορυφές που παρατηρούνται στο φάσμα υδατικού διαλύματος γλυκόζης και οι δονήσεις των μορίων με τις οποίες σχετίζονται.

Wavenumbers (cm ⁻¹)	Bonds
588	C-6-C-5-O-5(bending mode)
637	H ₂ O
702	O-5-C-1-O-1 (bending mode)
766	O-5-C-1-O-1 (bending mode)
853	C-1-H (stretching mode)
918	C-O-H, C-1-H (bending mode)
1027	C-O-H
1067	C-O-H, C-1-H, C-O (stretching mode)
1125	C-O-H (bending mode), C-H
1265	C-H, CH ₂ (twisting)
1369	C-H, CH ₂ (wagging)
1459	CH ₂
1630	HOH (bending)
2907	CH ₂ , C-H,
2947	CH ₂ , C-H,
3300	O-H (stretching)

Σχήμα 11.9: Φάσμα του υδατικού διαλύματος της γλυκόζης συγκέντρωσης 40 mg/mL α) φασματικό παράθυρο μικρών συχνοτήτων, β) φασματικό παράθυρο μεγάλων συχνοτήτων.

11.6 Σύγκριση των Φασμάτων των Αντιβιοτικών και της γλυκόζης με τα Φάσματα των Ενδογενών Ιστών του Οφθαλμού.

Στο σχήμα 11.10 παρατίθενται και συγκρίνονται τα φάσματα των ενδογενών ιστών του οφθαλμού, που λήφθηκαν όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 9, με τα φάσματα των υδατικών διαλυμάτων των προς εξέταση αντιβιοτικών στη φασματική περιοχή χαμηλών συχνοτήτων. Οι σχετικές εντάσεις των κορυφών μεταξύ των φασμάτων δεν

είναι οι πραγματικές, τα φάσματα έχουν υποστεί επεξεργασία (πολλαπλασιασμό και εξομάλυνση) έτσι ώστε να μπορούν να συγκριθούν όσον αφορά στη φασματική επικάλυψη. Οι εντάσεις το κορυφών του φακού, του κερατοειδή και του υδατοειδούς υγρού είναι πολύ μικρότερες από αυτές των αντιβιοτικών στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων. Παρατηρείται ότι τα φάσματα Raman και των δύο αντιβιοτικών δεν παρουσιάζουν αλληλοεπικάλυψη κορυφών με τα αντίστοιχα των οφθαλμικών ιστών (φακού, κερατοειδή και υδατοειδούς υγρού) που δυνητικά θα ήταν δυνατό να συνυπάρξουν στο ίδιο δονητικό φάσμα του πρόσθιου θαλάμου του οφθαλμού. Βέβαια, η κορυφή της κεφαζιδίμης στους 1640 cm^{-1} αλληλεπικαλύπτεται με την κορυφή του νερού στην ίδια περιοχή, αλλά το γεγονός αυτό δεν δυσκολεύει την ανίχνευση του φαρμάκου διότι οι μελέτες πραγματοποιούνται με βάση την κορυφή στους 1590 cm^{-1} . Αντίθετα, το φάσμα της γλυκόζης παρουσιάζει κοινές κορυφές με το φάσμα του κερατοειδούς και του φακού, στην περιοχή των $2800\text{-}2980\text{ cm}^{-1}$ κάτι που δυσκολεύει το έργο της ανίχνευσής της, καθώς δεν είναι εύκολο να αποφευχθεί εντελώς η φασματική συνεισφορά, ειδικά του κερατοειδούς (Σχήμα 11.11).

Σχήμα 11.10: Σύγκριση των φασμάτων φακού, κερατοειδή, υδατοειδούς υγρού, κεφαζιδίμης, αμφοτερισίνης και γλυκόζης στις χαμηλές συχνότητες.

Σχήμα 11.11: Σύγκριση των φασμάτων φακού, κερατοειδή, υδατοειδούς υγρού και γλυκόζης στις υψηλές συχνότητες.

11.7 Φασματοσκοπική Μελέτη Μορίων Φαρμάκων και Φυσιολογικών Ουσιών στο Υδατοειδές Υγρό με Φασματοσκοπία Raman.

11.7.1 Κεφταζιδίμη

Στο σχήμα 11.12α παρουσιάζονται τα φάσματα χαμηλών συχνοτήτων από πρόσθιο θάλαμο πριν και μετά την έγχυση ποσότητας κεφταζιδίμης, που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 mg/mL. Το φάσμα του αντιβιοτικού αυτού στην προαναφερθείσα συγκέντρωση διακρίνεται εύκολα από το πρωτότυπο φάσμα του πρόσθιου θαλάμου πριν την έγχυση του φαρμάκου, που αναφέρεται ως reference. Συγκεκριμένα, η ουσία μπορεί να ταυτοποιηθεί από την χαρακτηριστική τριπλή κορυφή της που εμφανίζεται με επίκεντρο τους 1590 cm^{-1} , που όπως προαναφέρθηκε, πιθανότατα οφείλεται σε δονήσεις τάσης ετεροκυκλικών συζυγών ομάδων του μορίου της και όχι καρβονυλικών ομάδων όπως λανθασμένα αλλού αναφέρεται.³⁸

Με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, εγχύθηκαν στο οφθαλμό διάφορες συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Ελήφθησαν στη συνέχεια τα φάσματα Raman για διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας (50-0,9 mg/mL) στον πρόσθιο θάλαμο. Σε κάθε συγκέντρωση του αντιβιοτικού πραγματοποιήθηκαν διαφορετικά πειράματα έτσι ώστε να διασφαλιστεί η παρουσία γνωστής ποσότητας του φαρμάκου στο υδατοειδές υγρό. Στο σχήμα 11.12β παρουσιάζονται οι μικρότερες συγκεντρώσεις (2,5-0,9 mg/mL) που ανιχνεύτηκαν με την οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε. Εφαρμόζοντας τις προαναφερθείσες πειραματικές συνθήκες και παράγοντα σύζευξης 4, η μικρότερη συγκέντρωση που διακρίνεται με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι για την κεφταζιδίμη 0,9 mg/mL. Το φάσμα που αναγράφεται ως Reference έχει ληφθεί από τον πρόσθιο θάλαμο χοιρινού οφθαλμού χωρίς την έγχυση κάποιας ποσότητας φαρμάκου.

Σχήμα 11.12α: Φάσματα Raman που ελήφθησαν από τον πρόσθιο θάλαμο πριν και μετά την έγχυση 50mg/mL κεφταζιδίμης.

Σχήμα 11.12β: Φάσματα Raman που ελήφθησαν από τον πρόσθιο θάλαμο πριν και μετά την έγχυση διαφορετικών συγκεντρώσεων κεφταζιδίμης (2,5-0,9) mg/mL

11.7.2 Αμφοτερισίνη Β

Στο σχήμα 11.13α παρουσιάζονται τα φάσματα χαμηλών συχνοτήτων από πρόσθιο θάλαμο πριν και μετά την έγχυση 5 mg/mL αμφοτερισίνης Β. Το φάσμα του αντιβιοτικού στην προαναφερθείσα συγκέντρωση διακρίνεται εύκολα από το φάσμα αναφοράς του πρόσθιου θαλάμου πριν την έγχυση της ουσίας. Όπως και στην περίπτωση της κεφταζιδίμης, οι χαρακτηριστικές κορυφές του μορίου της

αμφοτερισίνης δεν αλληλεπικαλύπτονται από κορυφές των φασμάτων των ενδογενών ιστών του οφθαλμού (φακού, κερατοειδή και υδατοειδούς υγρού) κάτι που προκύπτει από σύγκριση των φασμάτων τους (Σχήμα 11.10). Συγκεκριμένα η ουσία μπορεί να ταυτοποιηθεί από την χαρακτηριστική έντονη κορυφή της στους 1554 cm^{-1} που όπως προαναφέρθηκε οφείλεται σε συμμετρική δόνηση τάσης του συζυγιακού επταενικού τμήματος του μορίου της αμφοτερισίνης.^{1,46,47}

Μετά την έγχυση στον οφθαλμό υδατικού διαλύματος της συγκεκριμένης φαρμακευτικής ουσίας που αντιστοιχεί στο υδατοειδές υγρό σε συγκεντρώσεις από 5 mg/mL μέχρι 9 mg/mL , ελήφθησαν φάσματα Raman από τον πρόσθιο θάλαμο. Στο σχήμα 11.13β παρουσιάζονται τα φάσματα σε συγκεντρώσεις φαρμάκου 700 , 400 , 100 και 9 mg/mL . Σε κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού πραγματοποιήθηκαν διαφορετικά πειράματα έτσι ώστε να διασφαλιστεί η παρουσία γνωστής ποσότητάς του στο υδατοειδές υγρό. Πρέπει να αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη ουσία λόγω του υποκίτρινου χρώματός της φθορίζει στο ορατό, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένα συνεχές υπόστρωμα στα φάσματα, ειδικά στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Το όριο της ελάχιστης συγκέντρωσης που ανιχνεύτηκε στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες ήταν 9 mg/mL .

Σχήμα 11.13α: Φάσματα Raman που ελήφθησαν από τον πρόσθιο θάλαμο πριν και μετά την έγχυση υδατικού διαλύματος αμφοτερισίνης B συγκέντρωσης 5 mg/mL

Σχήμα 11.13β: Φάσματα Raman που ελήφθησαν από τον πρόσθιο θάλαμο πριν και μετά την έγχυση διαφορετικών συγκεντρώσεων υδατικού διαλύματος αμφοτερισίνης (700-9 $\mu\text{g/mL}$).

11.7.3 Γλυκόζη

Στο σχήμα 11.14α παρουσιάζονται τα φάσματα υψηλών συχνοτήτων από πρόσθιο θάλαμο χωρίς (reference) και μετά την προσθήκη γλυκόζης για ονομαστική συγκέντρωσή της 600 mg/mL . Όπως προαναφέρθηκε, συγκρίνοντας το φάσμα του υδατικού διαλύματος της γλυκόζης με τα φάσματα των ενδογενών ιστών του οφθαλμού (κερατοειδή, φακό, υδατοειδές υγρό (Σχήμα 11.10) παρατηρούνται κοινές κορυφές στην περιοχή 2800-2980 cm^{-1} , κάτι που δυσκολεύει το έργο ανίχνευσής της συγκεκριμένης ουσίας. Η παρουσία της γλυκόζης αποδεικνύεται με την αλλαγή του λόγου μεταξύ των κορυφών στους 2950 και 2907 cm^{-1} πριν και μετά την έγχυση γλυκόζης στον πρόσθιο θάλαμο. Ουσιαστικά, δημιουργείται ένας "ώμος" με επίκεντρο στους 2907 cm^{-1} που όπως προαναφέρθηκε οφείλεται κυρίως σε δόνηση της μεθυλενικής ομάδας (CH_2) του μορίου της γλυκόζης.⁴⁸ Τα φάσματα έχουν κανονικοποιηθεί στη κορυφή των 2950 cm^{-1} στην οποία συνεισφέρει ο κερατοειδής αλλά και η γλυκόζη.

Οι συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν στους οφθαλμούς κυμαίνονται από 600 μέχρι 2 mg/mL . Στο σχήμα 11.14β παρατίθενται τα φάσματα που λήφθηκαν από πρόσθιο θάλαμο χοιρινού οφθαλμού μετά την έγχυση ποσότητας γλυκόζης που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 12, 7 και 2 mg/mL . Η ύπαρξη αυξημένων επιπέδων γλυκόζης στον πρόσθιο θάλαμο προσδιορίζεται όπως προαναφέρθηκε από τον δημιουργούμενο ώμο στους 2907 cm^{-1} , σε φάσματα που έχουν κανονικοποιηθεί στην κορυφή 2950

cm^{-1} . Χρησιμοποιώντας τις προαναφερθείσες πειραματικές συνθήκες και παράγοντα σύζευξης 6, η μικρότερη συγκέντρωση της γλυκόζης που ανιχνεύτηκε με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι 2 mg/mL.

Σχήμα 11.14α: Φάσματα Raman που ελήφθησαν από τον πρόσθιο θάλαμο χωρίς (reference) και με συνολική συγκέντρωση γλυκόζης 600 mg/mL.

Σχήμα 11.14β: Φάσματα Raman που ελήφθησαν από τον πρόσθιο θάλαμο πριν και μετά την έγχυση διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης.

11.8 Συμπεράσματα

Στα πειράματα για την ανίχνευση μορίων στους χοιρινούς οφθαλμούς, η ελάχιστη διάμετρος της συγκλίνουσας δέσμης του laser στο δείγμα ήταν 1 mm, ο χρόνος έκθεσης 1 s και η ένταση της δέσμης του laser επιλέχθηκε στα 25 mW. Για απευθείας έκθεση του οφθαλμού σε δέσμη laser (514,5 nm), δηλαδή όταν ο αμφιβληστροειδής (ο πιο ευαίσθητος ιστός του οφθαλμού) εκτίθεται άμεσα στο φως, το ελάχιστο επιτρεπτό όριο της ισχύος της δέσμης (MPE: Maximum Permissible Exposure) δίνεται από τον τύπο $MPE=1,8(t/\sqrt{t}) \text{ mJ/cm}^2$.⁴⁹ Για χρόνο έκθεσης 1 s, $MPE=1,8 \cdot 10^{-2} \text{ mJ/mm}^2$. Χρησιμοποιώντας τη διάταξη που αναπτύχθηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας για την καθοδήγηση της δέσμης του laser στον οφθαλμό, η δέσμη του laser δεν αλληλεπιδρά άμεσα με το φακό και τον αμφιβληστροειδή αλλά διαπερνά την επιφάνεια του κερατοειδή και εισέρχεται στον πρόσθιο θάλαμο όπου περιέχεται το υδατοειδές υγρό. Ο κερατοειδής είναι ευαίσθητος σε φως μήκους κύματος 200-280 nm (UV-C), 280-315nm (UV-B), 1400-3000 nm (IR-B) και 3000-10000nm (IR-C). Πειράματα σε ινδικά χοιρίδια έδειξαν ότι χρησιμοποιώντας laser αργού, η θρόμβωση του κερατοειδούς λαμβάνει χώρα χρησιμοποιώντας 0,05 W, χρόνο έκθεσης 0,1 s και διάμετρο συγκλίνουσας δέσμης 50 microns (2547 mJ/mm^2).⁵⁰ Άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε οφθαλμούς κουνελιών έδειξε ότι το κατώφλι της ισχύος του laser που σηματοδοτεί ιστοχημικές μεταβολές της περιφέρεια του κερατοειδούς είναι 8000 mJ/mm^2 .³⁹ Στη συγκεκριμένη εργασία, η ισχύς του laser ανά μονάδα επιφάνειας και χρόνο έκθεσης 1 s που χρησιμοποιήθηκε υπολογίζεται στα $31,8 \text{ mJ/mm}^2$. Από την τιμή αυτή συμπεραίνεται ότι στα πειράματα αυτής της εργασίας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί είτε μεγαλύτερη ένταση ακτινοβολίας, είτε μεγαλύτερος χρόνος έκθεσης ή συνδυασμός και των δύο. Η τελική επιλογή όμως των συνθηκών έγινε ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα με αποτελέσματα της βιβλιογραφίας που χρησιμοποιούν τεχνική οπισθοσκέδασης.³⁸

Για τη σύγκριση των φασμάτων της αμφοτερισίνης B και της κεφαζιδίμης, αυτά κανονικοποιήθηκαν με το φάσμα αναφοράς σύμφωνα με την ευρεία και έντονη κορυφή του νερού στην περιοχή ($2800\text{-}3800 \text{ cm}^{-1}$) με επίκεντρο τους $\sim 3350 \text{ cm}^{-1}$. Η επιλογή αυτή έγινε διότι η κορυφή του νερού παραμένει αμετάβλητη κατά την μεταβολή των συγκεντρώσεων των φαρμάκων. Επίσης, τα φάρμακα καθώς και τα περιβάλλοντα υλικά της οφθαλμικής κοιλότητας (κερατοειδής και φακός) δε σκεδάζουν στη συγκεκριμένη φασματική περιοχή, γεγονός που αφήνει αναλλοίωτη

την κορυφή που προέρχεται από τη δόνηση του μορίου O-H του νερού (Σχήμα 11.15).

Σχήμα 11.15: Σύγκριση των φασμάτων των αντιβιοτικών και των ιστών που περιβάλλουν το πρόσθιο θάλαμο με το φάσμα του νερού.

Στην περίπτωση της γλυκόζης τα φάσματα κανονικοποιήθηκαν στην κορυφή των 2950 cm⁻¹, η οποία οφείλεται σε δονήσεις μορίων του κερατοειδή και της γλυκόζης, καθώς δεν παρατηρείται συνεισφορά από τον φακό λόγω απουσίας της χαρακτηριστικής του κορυφής στους ~3070 cm⁻¹ (Σχήμα 11.11).

Το νέο σύστημα που αναπτύχθηκε για την επιλεκτική καθοδήγηση της δέσμης laser στον οφθαλμό, σαρώνοντας το πρόσθιο θάλαμο, δίνει τη δυνατότητα να επιτευχθεί η επιθυμητή συλλογή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας Raman σε γεωμετρία 90°. Με αυτόν τον τρόπο ανιχνεύτηκαν στο υδατοειδές υγρό συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών κεφταζιδίμη (0.9 mg/mL) και αμφοτερισίνη (9 μg/mL) κοντά στα επίπεδα της ελάχιστης ανασταλτικής τους πυκνότητας (minimum inhibitory concentration-MIC) που είναι 0,03-0,14 mg/mL⁵¹ και 0,25-2 μg/mL,⁵² αντίστοιχα. Επίσης, το όριο ανίχνευσης της γλυκόζης στο υδατοειδές υγρό που βρέθηκε στην παρούσα εργασία είναι ~2 mg/mL, όταν τα φυσιολογικά επίπεδα είναι 0,6 mg/mL και τα επίπεδα σε διαβητικούς ασθενείς ~1,4 mg/mL.⁵³ Η πραγματική συγκέντρωση της γλυκόζης μπορεί να είναι λίγο υψηλότερη καθώς δεν γνωρίζουμε με ακρίβεια εάν η συγκέντρωση της γλυκόζης που φυσιολογικά προϋπάρχει στον υδατοειδές υγρό

επηρεάζεται/μειώνεται λόγω γλυκολυτικών φαινομένων που λαμβάνουν χώρα μετά το θάνατο έμβιου οργανισμού,^{54,55,56,57} παρόλο που τα δείγματα συντηρούνται σε θερμοκρασία 4°C μετά την εξαγωγή τους.

Προσφάτως, οι Hosseini et al.³⁸ ανίχνευσαν με φασματοσκοπία Raman, στον πρόσθιο θάλαμο οφθαλμού κουνελιού, 0,4 mg κεφαζιδίμης και 30 μg αμφοτερισίνης, σε γεωμετρία οπισθοσκέδασης. Τα αποτελέσματα αυτά αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ~1,3 mg/mL και ~100 μg/mL για την κεφαζιδίμη και την αμφοτερισίνη, αντίστοιχα. Ο όγκος του υδατοειδούς υγρού του κουνελιού, θεωρείται περίπου 0,3 mL.⁵⁸

Βασικό πρόβλημα των πειραμάτων του συγκεκριμένου κεφαλαίου ήταν ότι ο βολβός του ζώου μετά της εξαγωγή και την τοποθέτηση στο υποδοχέα του δείγματος δεν μπορεί να στηριχθεί επαρκώς με αποτέλεσμα να παραμορφώνεται (να αποκλίνει από το σφαιρικό του σχήμα). Έτσι είναι πολύ δύσκολο να βρεθεί το κατάλληλο σημείο πρόσπτωσης της δέσμης του laser στην καμπύλη επιφάνεια του κερατοειδή και να επιτευχθεί η βέλτιστη γεωμετρία σκέδασης. Αυτό φαίνεται και από τα φάσματα που έχουν ληφθεί μέσα από τον πρόσθιο θάλαμο. Στα φάσματα 11.12 και 11.13 ενώ η φασματική συνεισφορά του κερατοειδή θα έπρεπε να είναι μηδαμινή, παρατηρείται η κορυφή του στους 1458 cm⁻¹. Το γεγονός αυτό όμως δεν επηρεάζει τις μετρήσεις διότι όπως προαναφέρθηκε δεν υπάρχει φασματική αλληλοεπικάλυψη των ενδογενών ιστών του οφθαλμού με τα χαρακτηριστικά φάσματα των αντιβιοτικών. Επιπλέον, παρόλο που αυτή η κορυφή υπάρχει και στο φάσμα του φακού, εξασφαλίζεται ότι ο φακός δεν συνεισφέρει φασματοσκοπικά διότι δεν εμφανίζονται κορυφές υψηλής ενεργότητας του τελευταίου στο Raman, όπως αυτή στους 1008 cm⁻¹ ή στους 3069 cm⁻¹. Η συνεισφορά του κερατοειδούς φαίνεται και στα φάσματα υψηλής συχνότητας που λαμβάνονται για τη μελέτη της γλυκόζης (Σχήματα 11.14) από την κορυφή στους 2930 cm⁻¹ κάτι που δυσχεραίνει την ανίχνευση της. Για τους λόγους αυτούς, στο επόμενο κεφάλαιο τα πειράματα επαναλήφθηκαν και συνεχίστηκαν χρησιμοποιώντας μοντέλο πρόσθιου θαλάμου (AAC) με σκοπό την επίτευξη της βέλτιστης γεωμετρίας διοχέτευσης της δέσμης του laser και συλλογής της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας με βάση τους θεωρητικούς υπολογισμούς του κεφαλαίου 9.

Σημείωση.

Στο σχήμα 11.16, παρουσιάζονται τα διαγράμματα της έντασης Raman των φασμάτων που έχουν ληφθεί από οπτικές κυψελίδες που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις κεφαζιδίμης (80-0.5 mg/mL) και αμφοτερισίνης B (5-0,001 mg/mL)-σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση, χρησιμοποιώντας ακτινοβολία στα 514.5 nm. Όλα τα φάσματα κανονικοποιήθηκαν με βάση την ευρεία κορυφή του νερού στην φασματική περιοχή 2800-3800 και στη συνέχεια μετρήθηκε το εμβαδόν της κορυφής της κεφαζιδίμης (1590 cm^{-1}) στην περιοχή $1557\text{-}1624\text{ cm}^{-1}$ και το εμβαδόν της κορυφής της αμφοτερισίνης B (1554 cm^{-1}) στην περιοχή $1506\text{-}1595\text{ cm}^{-1}$. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα φάσματα που έχουν ληφθεί από τον πρόσθιο θάλαμο χοιρινών οφθαλμών μετά την έγχυση αντίστοιχων συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών. Και στις δύο περιπτώσεις υπάρχει καλή προσαρμογή των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις κυψελίδες και τους χοιρινούς οφθαλμούς, κάτι που δείχνει ότι οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που πιστεύεται ότι εγχύθηκαν στον πρόσθιο θάλαμο των 0,4 mL ήταν αληθής.

Σχήμα 11.16: Καμπύλες βαθμονόμησης της συγκέντρωσης των φαρμάκων σε σχέση με τη κανονικοποιημένη ένταση των κορυφών Raman στους 1590 cm^{-1} για τη κεφαζιδίμη και στους 1554 cm^{-1} για τη αμφοτερισίνη B, φασμάτων που έχουν ληφθεί από οπτικές κυψελίδες (τετράγωνα) και χοιρινούς οφθαλμούς (κύκλοι).

Αναφορές

- 1 The Diabetes control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.* 1993;329:977-86.
- 2 Ginsberg, B., An overview of minimally invasive technologies. *Clin. Chem.* 1992;1596-600.
- 3 Klonoff, D., Non-invasive blood glucose monitoring. *Diabetes Care* 1997;20:433-7.
- 4 Heise, H., Non-invasive monitoring of metabolites using near infrared spectroscopy: state of the art. *Horm. Metab. Res.* 1996;28:527-34.
- 5 Cote, G. Non-invasive optical glucose sensing- an overview. *J. Clin. Eng.* 1997;22:253-9.
- 6 Heise, H., Bittner, A. Blood Glucose assays based on infrared spectroscopy: alternatives for medical diagnostics. *SPIE Proc.* 1998;3257:2-12.
- 7 Vickers, T., Mann, C., Quantitative analysis by Raman spectroscopy. In Garassili, J., Bulkin, B., eds. *Analytical Raman spectroscopy*. New York: Wiley, 1991:107-35.
- 8 Lombardi, D., Wang, C., Sun, B., Fountain, A. III, Vickers, J., Mann, C., et al. Quantitative and qualitative analysis of some inorganic compounds by Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 1994;48:875-83.
- 9 Berger, A., Wang, Y., Feld, M. Rapid non-invasive concentration measurements of aqueous biological analytes by near infrared Raman spectroscopy. *Appl. Opt.* 1996;35:209-12.
- 10 Xu, J., Ford, J., Mann, C., Vickers, T., Brackett, J., Cousineau, K., Robey, W. Raman measurements in bioreactor materials. *SPIE Proc.* 1997;2976:10-9.
- 11 Erkens, R., Wicksted, J., Motemedi, M., March, W. Monitoring of glucose, urea and lactate through the animal cornea using laser raman spectroscopy. *Investig. Ophth. Vis. Sci.* 1994;35:2054.
- 12 Wicksted, J., Erckens, R., Motemedi, M., March, W. Raman Spectroscopy studies of metabolic concentration in aqueous solution and in aqueous humor species. *Appl. Spectrosc.* 1995;49:987-93.
- 13 Yang, S., Hasty, C., Watson, P., Wicksted, J., Smith, R., March, W. Analysis of metabolites in aqueous solutions by using laser raman spectroscopy. *Appl. Opt.* 1993;32:925-9.
- 14 Goetz, M., Cote, G., Erkens, R., March, W., Motamedi, M., Application of multivariable technique to Raman spectra for quantification of body chemicals. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1995;42:728-31.
- 15 Bell, A., Barron, L., Hech, L., Vibrational Raman Optical activity study of D-glucose. *Carbohydr. Res.* 1994;257:11-24.
- 16 Dou, X., Yamaguchi, Y., Yamamoto, H., Harumi, H., Ozaki, Y. Biological applications of anti-stokes Raman spectroscopy: quantitative analysis of glucose in plasma and serum by highly sensitive multichannel Raman spectrometer. *Appl. Spectrosc.* 1996;50:1301-6.
- 17 Dou, X., Uenoyama, H., Inventors. Apparatus and method for measuring concentration of components with light scattering. US patent 5,481,113, 1996.
- 18 Tanaka, K., Pacheco, M., Brennan, J. III, Itzkan, I., Berge, A., Dasari, R., Feld, M. Compound parabolic concentrator probe for efficient light collection in spectroscopy of biological tissues. *Appl. Opt.* 1996;35:758-63.
- 19 Berger, A., Brennan, J. III, Dasari, R., Feld, M., Itzkan, I., Tanaka, K., Apparatus and method of Raman spectroscopy for analysis of blood gases and analytes. International Patent W096/29925. International publication published under the Patent Cooperation Treaty (PCT), 1996.

- 20 Tarr, R., Tarr, P., Inventors. Non-invasive blood glucose measurement system and method using simulated Raman spectroscopy. US patent 5,243,983, 1993.
- 21 Kunst, H. Transcutaneous, non-bloody determination of the concentration of substances in the blood. International Patent W095/31928. International application published under the Patent Cooperation Treaty (PCT), 1995.
- 22 Omar, K., Spectroscopic and Clinical Aspects of Noninvasive Glucose Measurements. *Clinical Chem.* 1999;45:165-177.
- 23 Cote, G. Non Invasive Optical Glucose Sensing: An Overview. *J. Clin. Eng.* 1997;22:253.
- 24 McNichols, R., Cote, G. Optical Glucose sensing in biological fluids: an overview. *J. Biomed. Opt.* 2000;5:5.
- 25 Klonoff, D. Non Invasive Blood Glucose Monitoring. *Clin. Diabetes* 1998;16:43.
- 26 Khalil, O. Spectroscopic and Clinical aspects of non invasive glucose measurements. *Clin. Chem.* 1999;45:165
- 27 Davies, P., Duncan, G., Pynset, P. Arber, D., Lucas, V. Aqueous Humor Glucose Concentration in Cataract patients and its effect on the lens. *Exp. Eye Res.* 1984;39:605-609.
- 28 Borchert, M., Storrie-Lombardi, M., Lambert. A non Invasive Glucose Monitor : Preliminary Results in Rabbits. *J. Diabetes Technol. Ther.* 1999 ;1 :145.
- 29 Pohjola, S. The Glucose Content of the Aqueous Humor in Man. *Acta Ophthalmol. Copenh.* 1966;88:11-80.
- 30 Schrader, W., Grajewski, R., Meuer, P., Kiefer, W. The Glucose Content of the aqueous humor compared with capillary blood man. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. Suppl.* 2000;41:S77.
- 31 Laursen A. Concentrations of some metabolites in the aqueous humour of human senile cataractous eyes. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1975;53:369-377.
- 32 Steffes, P. Laser- Based Measurements of glucose in the Ocular Aqueous Humor: An efficacious Portal for Determination of Serum Glucose Levels. *Diabetes Technol. Ther.* 1999;1:129
- 33 Cameron, B., Baba, J., Cote, G. Measurement of the glucose Transport Time Delay Between the Blood and Aqueous Humor of the EYE for the Enential Development of a Non Invasive Glucose Sensor. *Diabetes Technol. Ther.* 2001;3 :201.
- 34 Goetz, M., Cote, G., Erckens, R., March, W., Motamedi, M. Application of Multivariate Technique to Raman Spectra for Quantification of Body Chemicals. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1995;42:728.
- 35 Berger, A., Wang, Y., Feld, M. Rapid, Non-Invasive Concentration Measurements of Aqueous Biological Analytes by Near-Infrared Raman Spectroscopy. *Appl. Opt.* 1996;35:209.
- 36 Berger, J., Koo, T., Itzkan, I., Horowitz, G., Feld, M. Multicomponents Blood Analysis by Near Infrared Raman Spectroscopy. *Appl. Opt.* 1999;38:2916.
- 37 Qu, J., Wilsor, B., Suria, D. Concentration Measurements of Multiples Analytes in Human Sera by Near-Infrared Laser Raman Spectroscopy. *Appl. Opt.* 1999;38:5491.
- 38 Lewis, N., Kalasinsky, V., Levin, I. Quantitative Determination of impurities in Polyene Antibiotics: Fourier Trasform Raman spectra of Nyastine, Amphotericin A, and Amphotericin B. *Anal. Chem.* 1988;60:2306-2309.
- 39 Harrand, M., Peticolas, W., Dupeyrat, R., Polarized Raman Spectroscopy of Oriented Macrodmain of Phospholipids containing Amphotericin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982;104:1120-1126.
- 40 Soderholm, S., Roos, Y., Meinander, N., Hotokka, M. Raman Spectra of Fructose and Glucose in the Amorphous and Crystalline States. *J. Raman Spectrosc.* 1999;30:1009-1018.

- 41 Cael, J., Koenig, J., Blackwell, J. Infrared and Raman Spectroscopy of Carbohydrates, Part IV. Identification of configuration and conformation-sensitive modes for D-glucose by normal coordinate analysis. *Carbohydrate Res.* 1974;32:79-91.
- 42 Vasko, P., Blackwell, J., Koenig, J. Infrared and Raman Spectroscopy of Carbonhydrates. 1. Identification of O-H and C-H-Related Vibrational Modes for D-Glucose, Maltose, Cellobiose, and Dextran by Deuterium- Substitution Methods. *Carbohydr. Res.* 1971;19:297.
- 43 Bunow, M., Levin, I. Vibrational Raman Spectra of Lipid Systems Containing Amphotericin B, *Biochem. Biophys. Acta* 1977;464:202-216.
- 44 Vasko, P., Blackwell, J., Koenig, L. Infrared Raman Spectroscopy of Carbohydrates, Part I: Identification of O-H and C-H related vibrational modes for D-glucose, maltose, cellobiose, and dextran by deuterium-substitution methods. *Carbohydr. Res.*, 1971;19:297-310.
- 45 Mathlouthi, M., Luu, D., Laser Raman Spectra of D-glucose and sucrose in aqueous solution. *Carbohydr. Res.* 1980;81:203-212.
- 46 Bunow, M., Levin, I. Vibrational Raman Spectra of Lipid Systems Containing Amphotericin B, *Biochem. Biophys. Acta* 1977;464:202-216.
- 47 Harrand, M., Peticolas, W., Dupeyrat, R., Polarized Raman Spectroscopy of Oriented Macrodomein of Phospholipids containing Amphotericin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982;104:1120-1126.
- 48 Omar, K., Spectroscopic and Clinical Aspects of Noninvasive Glucose Measurements. *Clinical Chem.* 1999;45:165-177.
- 49 Threshold Limit Values for chemical Substances and physical agents & Biological Exposure Indices. ACGIH® ,2004.
- 50 Kremer, I., Even, A., Sandbank, J., Giler, S., Yassur, Y. Effect of green argon (514nm) laser exposure on rose bengal-stained guinea pig cornea. *Isr. J. Med. Sci.* 1996;32:1243-1248.
- 51 Welsh K, Barlow M, Tenover F, Biddle J, Rasheed J, Clark L, McGowan J. Experimental prediction of the evolution of ceftazidime resistance in the CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Agents Ch* 2005;49:1242-1244.
- 52 Ralph E, Khazindar A, Barber K, Grant C. Comparative in vitro effects of liposomal amphotericin B, amphotericin B-deoxycholate, and free amphotericin B against fungal strains determined by using MIC and minimal lethal concentration susceptibility studies and time-kill curves. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35: 188-191.
- 53 Davies P, Duncan G, Pynsent-Arber D, Lucas V. Aqueous humor glucose concentration in cataract patients and its effect on the lens. *Exp Eye Res* 1984;39:605-609.
- 54 Welge-Lussen L, Stadler G, Cattapoel H. Post-mortem changes of Glycolytic metabolite levels and amino acids in the Aqueous and Vitreous. *Exp Eye Res* 1975;20:178.
- 55 Coe J. Postmortem chemistry update. Emphasis on forensic application. *Am J Forensic Med Pathol* 1993;14:91-117.
- 56 Forrest A. Obtaining samples at postmortem examination for toxicological and biochemical analyses. *J Clin Pathol* 1993;46:292-296.
- 57 Gormnes H, Lund A. The diagnostic value of postmortem blood glucose determination in cases of diabetes mellitus. *Forensic Sci Int* 1985;28:103-107.
- 58 Shoenwald, R. Ocular drug delivery: pharmacokinetic consideration. *Clin. Pharmacokinet.* 1990;18:225-269.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΡΟΣΘΙΟΥ ΘΑΛΑΜΟΥ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN

12.1 Μοντέλο Πρόσθιου Θαλάμου

Πειράματα στα πλαίσια αυτής της εργασίας πραγματοποιήθηκαν πέραν από τους χοιρινούς οφθαλμούς και σε εμπορικό μοντέλο εμπρόσθιου θαλάμου (Artificial Anterior Chamber, AAC) στο οποίο προσαρμόζεται κερατοειδής χιτώνας (Σχήμα 12.1). Το μοντέλο έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να συγκρατεί σταθερά τον κερατοειδή, από το μέρος του σκληρού με διάμετρο (14-18mm). Η πίεση στον πρόσθιο θάλαμο μετρήθηκε με μανόμετρο και βρέθηκε περίπου 18-20 mmHg, τιμή που βρίσκεται στα κανονικά επίπεδα,¹ εξασφαλίζοντας έτσι την φυσιολογική καμπυλότητα του κερατοειδούς κατά την διάρκεια των πειραμάτων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε κερατοειδής χιτώνας χοιρινών.

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε “The Barron Artificial Anterior Chamber” (Katena Products, inc., USA) αποτελείται από τρία μέρη (Σχήμα 1β): Τη βάση στην οποία τοποθετείται ο κερατοειδής ιστός, ένα δακτύλιο που τοποθετείται πάνω από τον ιστό και τον συγκρατεί και τέλος ένα κρίκο ασφαλείας που κλειδώνει την όλη διάταξη.

Η βάση έχει δύο εισόδους που συνδέονται με δύο σωληνάκια σιλικόνης πάνω στα οποία υπάρχουν πλαστικές ασφάλειες (Σχήμα 1α). Από κάθε είσοδο μπορεί να εγχυθεί ή να απομακρυνθεί υγρό ή αέρας.

Σχήμα 12.1: (α) Μοντέλου πρόσθιου θαλάμου (Barron Artificial Anterior Chamber-Katena Products, inc.), (β) Τα τρία βασικά τμήματα του μοντέλου πρόσθιου θαλάμου.

12.2 Οι χημικές ουσίες που μελετήθηκαν

Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για φαρμακοκινητικές μελέτες και εγχύθηκαν στο AAC είναι τέσσερα αντιβιοτικά. Τα αντιβιοτικά Solvetan® και Fungizone® που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο και επιπλέον τα αντιβιοτικά Briklin® (Amikacin sulfate) και Ciproxin® (Ciprofloxacin) που χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις εσώκλειστες οδηγίες των εμπορικών τους συσκευασμάτων. Τα δύο τελευταία αντιβιοτικά θα αναφέρονται κατά τη διάρκεια της εργασίας με τις ονομασίες των ενεργών ουσιών που περιέχουν, την αμικασίνη και την σιπροφλοξασίνη, αντίστοιχα.

Στο κεφάλαιο αυτό αρχικά μελετώνται φασματοσκοπικά η αμικασίνη και η σιπροφλοξασίνη σε υδατικά διαλύματα. Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση των υδατικών διαλυμάτων και των τεσσάρων αντιβιοτικών, με τα φάσματα του κερατοειδούς και του πλαστικού υλικού του AAC (πολυοξυμεθυλένιο), που τα φάσματα τους δυνητικά μπορούν να συνυπάρξουν σε φάσματα που λαμβάνονται από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου. Τέλος μελετώνται φασματοσκοπικά και τα τέσσερα αντιβιοτικά στο μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου, σε ξεχωριστά πειράματα για την κάθε ουσία.

12.2.1 Αμικασίνη

Η θειική αμικασίνη ανήκει σε μια ομάδα αντιβιοτικών, τις αμινογλυκοσίδες, που μαζί με τις φθοροκυνολόνες αποτελούν τις δύο πιο διαδεδομένες ομάδες αντιβιοτικών. Είναι υδροφιλικά και ολιγοκατιονικά μόρια και η χημική δομή της αμικασίνης αποτελείται από ένα αμινογλυκοξυτικό δακτύλιο συνδεδεμένο με αμινοσάκχαρα (Σχήμα 12.2). Παράγεται από δύο τύπους βακτηρίων το *micronospora* και το *streptomyces*. Αντιμετωπίζει τα βακτήρια παρεμβαίνοντας στα αρχικά στάδια της πρωτεϊνικής τους σύνθεσης. Ενδείκνυται για τη βραχυχρόνια θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων, όπως του αναπνευστικού, του δέρματος, του νευρικού συστήματος, των οστών, των αρθρώσεων καθώς και μετεγχειρητικών λοιμώξεων. Στις περισσότερες περιπτώσεις προτιμάται η ενδομυϊκή χορήγηση της αμικασίνης όπου απορροφάται γρήγορα, αλλά σε κρίσιμες καταστάσεις χρησιμοποιείται ενδοφλεβίως και με τοπική χορήγηση. Δυστυχώς όμως η θεραπευτική του χρήση σε μεγάλες δόσεις συσχετίζεται με φαινόμενα νευροτοξικότητας.

Η θειική αμικασίνη έχει μοριακό βάρος 781,75, ενώ ο χημικός τύπος είναι $C_{22}H_{43}N_5O_{13} \cdot 2H_2SO_4$. Είναι σταθερή σε θερμοκρασία δωματίου (15-30 °C). Το διάλυμα της είναι άχρωμο. Η εμπορική ονομασία της φαρμακευτικής ουσίας που χρησιμοποιήθηκε, όπως προαναφέρθηκε, είναι Briklin (amikacin sulphate) και παρέχεται σε διάλυμα 250 mg/mL, το οποίο προμηθευτήκαμε από φαρμακείο.

Σχήμα 12.2: Στερεοχημικός τύπος της θειικής αμικασίνης.

12.2.2 Σιπροφλοξασίνη

Οι φθορικινολόνες είναι η πιο διαδεδομένη ομάδα αντιβιοτικών με ευρύ φάσμα δράσης. Η άλλη ευρέως χρησιμοποιούμενη ομάδα αντιβιοτικών, οι αμινογλυκοσίδες, δεν είναι αποτελεσματικές έναντι στο σταφυλόκοκκο και το στρεπτόκοκκο, μικρόβια που ευθύνονται για το 75% των περιπτώσεων ενδοφθαλμίτιδας. Ωστόσο το μεγαλύτερο πρόβλημα των αμινογλυκοσιδών που περιορίζει τη χρήση τους, είναι η τοξικότητα για τον αμφιβληστροειδή

έστω και σε μικρές δόσεις ενδοϋαλοειδικής χορήγησης. Από την άλλη οι φθοροκυκνολόνες λόγω της μεγάλης τους διαλυτότητας στο νερό που παρουσιάζουν, προσεγγίζουν ευκολότερα τους ιστούς και λόγω της χαμηλής ελάχιστης ανασταλτικής τους πυκνότητας είναι αποτελεσματικά και σε μικρές χορηγούμενες ποσότητες.

Η σιπροφλοξασίνη είναι μία συνθετική αντιβακτηριακή φθοροκινολόνη και χρησιμοποιείται ευρέως ως οφθαλμικό αντιβιοτικό. Είναι μία από τις πιο δραστικές της ομάδας, με ευρύ φάσμα δράσης έναντι βακτηρίων συμπεριλαμβανομένου των *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus* *Neisseria* spp. όπως επίσης και του σταφυλόκοκκου και μερικών άλλων Gram-positive βακτηρίων.

Ο χημικός της τύπος είναι $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ με μοριακό βάρος 331.4 και η δομή της φαίνεται στο σχήμα 12.3. Η εμπορική ονομασία της συσκευασίας που χρησιμοποιήθηκε είναι Ciproxin® 400 και παρέχεται σε διάλυμα 200 mL που περιέχει 400 mg της δραστηκής ουσίας.

Σχήμα 12.3: Η χημική δομή της σιπροφλοξασίνης.

12.3 Παρασκευή Δειγμάτων

12.3.1 Υδατικά Διαλύματα

Η παρασκευή των διαλυμάτων των ουσιών της αμικασίνης και της σιπροφλοξασίνης πραγματοποιήθηκε όπως στην περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων της κεφαζιδίμης και της αμφοτερισίνης, που αναφέρεται στην παράγραφο 11.2.2. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται με κατάλληλη στήριξη στην κοινή εστία του ασφαιρικού φακού και του δεύτερου φακού συλλογής του συστήματος T-64000.

12.3.2 Προετοιμασία Δειγμάτων Στο Μοντέλο Του Πρόσθιου Θαλάμου

Οι μετρήσεις στο μοντέλο πρόσθιου θαλάμου πραγματοποιήθηκαν στις περισσότερες των περιπτώσεων στο 10ωρο μετά την σφαγή των χοιρινών και την εξαγωγή των οφθαλμών. Τα δείγματα συντηρούνται σε ψυγείο 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Η απομάκρυνση του κερατοειδούς έγινε όπως περιγράφηκε στη παράγραφο 10.2. Κατόπιν, τοποθετείται στη βάση του AAC, στερεώνεται με τον δακτύλιο και ασφαρίζεται αεροστεγώς σε αυτή τη θέση από τον κρίκο.

Το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου τοποθετείται έπειτα σε κατάλληλο υποδοχέα, που κατασκευάστηκε σε συνεργασία με το μηχανουργείο του ΙΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ, έμπροσθεν του ασφαιρικού φακού εστίασης της δέσμης, έτσι ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η βέλτιστη γεωμετρία σκέδασης 90° όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 9 (Σχήμα 12.4).

Σχήμα 12.4: Η διάταξη που τοποθετείται το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου, μπροστά από τον ασφαιρικό φακό, έτσι ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη γεωμετρία σκέδασης 90°.

Στις φωτογραφίες του σχήματος 12.5 διακρίνεται ότι η δέσμη διασχίζει τον πρόσθιο θάλαμο κάθετα στον οπτικό άξονα του οφθαλμού από διαφορετικές γωνίες λήψης. Από τις συγκεκριμένες φωτογραφίες φαίνεται ότι είναι δυνατόν να επιτευχθεί η βέλτιστη γεωμετρία σκέδασης.

Σχήμα 12.5: Φωτογραφίες της δέσμης του laser μέσα στον πρόσθιο θάλαμο που αποδεικνύει ότι επιτυγχάνεται η βέλτιστη γεωμετρία σκέδασης.

12.4 Πειραματικές Διατάξεις

Για τη μελέτη των αντιβιοτικών στο μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου που περιγράφηκε παραπάνω, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στη διάταξη σκέδασης 90° του συστήματος T-64000 ομοίως με τα πειράματα σε χοιρινούς οφθαλμούς. Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 9, το σύστημα αυτό μπορεί να βελτιωθεί με τη χρησιμοποίηση φακού συλλογής με μικρότερη εστιακή απόσταση. Για το λόγο αυτό στο παρόν κεφάλαιο, πειράματα για την σιπροφλοξασίνη πραγματοποιήθηκαν και με τον νέο φακό συλλογής εστιακής απόστασης 80 mm, εκτός του προϋπάρχοντος φακού των 160 mm.

Οι πειραματικές συνθήκες και πιο συγκεκριμένα οι παράμετροι διέγερσης, επιλέχθηκαν κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται η ασφάλεια του κερατοειδή αφού είναι ο μοναδικός οφθαλμικός ιστός που αλληλεπιδρά άμεσα με την δέσμη του laser.² σε υποτιθέμενη in-vivo εφαρμογή. Χρησιμοποιήθηκε ισχύς laser 25-mW και χρόνος έκθεσης 1-s, ενώ η ελάχιστη διάμετρος της συγκλίνουσας δέσμης στο πρόσθιο θάλαμο, στο επίπεδο του οπτικού άξονα, ήταν $\sim 1\text{-mm}^2$. Στις μετρήσεις επιλέχθηκε βαθμός σύζευξης "binning" 6 για την αμφοτερισίνη Β και 4 για την κεφταζιδίμη, την αμικασίνη και την σιπροφλοξασίνη. Η επιλογή έγινε με τέτοιον τρόπο ώστε να έχουμε το βέλτιστο αποτέλεσμα για κάθε αντιβιοτικό. Τέλος τα φάσματα κανονικοποιήθηκαν, διορθώθηκε η γραμμή βάσης τους και αφαιρέθηκε το υπόστρωμα που ίσως περιέχει φασματικά χαρακτηριστικά του υλικού του πρόσθιου θαλάμου και του κερατοειδή.

12.5 Φασματοσκοπική Μελέτη των υδατικών διαλυμάτων των ουσιών Αμικασίνη και Σιπροφλοξασίνη.

12.5.1 Αμικασίνη

Το φάσμα αναφοράς του υδατικού διαλύματος αμικασίνης που λήφθηκε από οπτική κυψελίδα φαίνεται στο σχήμα 12.6. Η συγκέντρωση της αμικασίνης ήταν 250 mg/mL. Το μόριο του νερού λόγω της δόνησης του μορίου του υδροξυλίου (OH) συνεισφέρει μια ευρεία κορυφή στους 1640 cm^{-1} περίπου. Στο φάσμα της αμικασίνης η πιο ισχυρή κορυφή παρατηρείται στους 984 cm^{-1} και οφείλεται στη συμμετρική δόνηση έκτασης του SO_4^{2-} . Επίσης στην περιοχή 1010-1200 cm^{-1} εμφανίζονται κορυφές που αποδίδονται σε αντισυμμετρικές δονήσεις της θειικής ομάδας καθώς και σε δονήσεις έκτασης των μορίων κάμψης C-O και C-C. Δονήσεις κάμψης των μορίων O-C-H, C-C-H και C-O-H εμφανίζονται στην περιοχή 1200-1500 cm^{-1} .³

Σχήμα 12.6: Φάσμα υδατικού διαλύματος της αμικασίνης σε οπτική κυψελίδα.

12.5.2 Σιπροφλοξασίνη

Φάσμα υδατικού διαλύματος σιπροφλοξασίνης συγκέντρωσης 2 mg/mL φαίνεται στο σχήμα 12.7, όπου διακρίνεται εύκολα η έντονη χαρακτηριστική κορυφή του μορίου της στους 1393 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση έκτασης του συστήματος των δακτυλίων των κυνολονών. Επιπλέον, η δόνηση έκτασης του διπλού δεσμού $\text{C}=\text{C}$ του αρωματικού δακτυλίου παρατηρείται με κορυφή στους 1637 cm^{-1} . Οι κορυφές στους 1466 και 1492 cm^{-1} αποδίδονται σε δονήσεις κάμψης των CH_2 ομάδων. Το μόριο του νερού λόγω της δόνησης του μορίου του υδροξυλίου (OH) συνεισφέρει με την ευρεία κορυφή στους $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ η οποία αλληλεπικαλύπτεται με την δόνηση του φαρμάκου στους 1637 cm^{-1} .⁴ Σε μεγάλες συγκεντρώσεις του φαρμάκου, η κορυφή αυτή έχει επίκεντρο τους 1637 cm^{-1} διότι επηρεάζεται κυρίως από τη δόνηση του αντιβιοτικού. Στις μικρές συγκεντρώσεις όμως, η κορυφή αυτή μετατοπίζεται λίγο προς τις υψηλές συχνότητες διότι η κύρια δόνηση που συνεισφέρει σε αυτή την περίπτωση είναι αυτή του νερού.

Σχήμα 12.7: Φάσμα υδατικού διαλύματος της σιπροφλοξασίνης σε οπτική κυψελίδα.

12.6 Σύγκριση των Φασμάτων των Αντιβιοτικών με τα Φάσματα του Κερατοειδούς και του πολυοξυμεθυλενίου (POM)

Πριν πραγματοποιηθούν τα πειράματα εγχύοντας υδατικά διαλείμματα των προς εξέταση ουσιών στο μοντέλο του υδατοειδούς υγρού, έπρεπε να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη κορυφών μεταξύ των φασμάτων των φαρμάκων με τα φάσματα του κερατοειδούς και του υλικού από το οποίο είναι κατασκευασμένο το AAC. Στο σχήμα 4 παρουσιάζεται το φάσμα που λήφθηκε από το υλικό του AAC (πολυοξυμεθυλένιο - POM).

Συγκεκριμένα οι πιο έντονες κορυφές του POM ($-\text{CH}_2\text{O}-$) που μπορεί να επηρεάσουν τα φάσματα στον πρόσθιο θάλαμο εμφανίζονται στους 925, 1103, 1345, 1463, 1500 και 1539 cm^{-1} . Η πρώτη στους 925 cm^{-1} , είναι η πιο ισχυρή και αποδίδεται στη συμμετρική δόνηση έκτασης του δεσμού C-O-C και στις δονήσεις κάμψης των δεσμών O-C-C και O-C-O. Η κορυφή στους 1103 cm^{-1} οφείλεται στην αντισυμμετρική δόνηση έκτασης του δεσμού C-O-C και στη δόνηση κάμψης του δεσμού O-C-O. Οι κορυφές στην περιοχή των 1345 με 1500 cm^{-1} οφείλονται σε δονήσεις αιώρησης (twisting, 1345 cm^{-1}) και κάμψης (1463 και 1500 cm^{-1}) των μεθυλενικών ομάδων του μορίου, CH_2 .^{5,6}

Συγκρίνοντας το φάσμα αυτό με τα φάσματα υδατικών διαλυμάτων των αντιβιοτικών στην ίδια φασματική περιοχή παρατηρούμε ότι το φάσμα του πλαστικού υλικού από το οποίο αποτελείται το AAC δεν παρουσιάζει κορυφές στους 1590, 1550 1393 cm^{-1} και 984 cm^{-1} όπου βρίσκονται οι εξεταζόμενες κορυφές των μορίων των αντιβιοτικών (Σχήμα 12.8). Στο ίδιο σχήμα παρατίθεται και το φάσμα του κερατοειδή, που όπως μπορεί να παρατηρηθεί δεν παρουσιάζει αλληλοεπικαλύψεις με το φάσμα των 4 αντιβιοτικών.

Σχήμα 12.8: Φάσματα υδατικών διαλυμάτων της κεφταζιδίμης, της αμφοτερισίνης B, της σιπροφλοξασίνης και της αμικασίνης σε σύγκριση με το φάσμα του πλαστικού υλικού του μοντέλου του πρόσθιου θαλάμου. Δεν παρατηρείται αλληλοεπικάλυψη των προς εξέταση κορυφών.

Επειδή το φάσμα του POM δίνει ισχυρό σήμα Raman και ειδικά η κορυφή του στους 928 cm^{-1} μπορεί δυνητικά να συνυπάρχει στα φάσματα που λαμβάνονται μέσα από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου, θα πρέπει η συνεισφορά του να ελαχιστοποιηθεί. Αυτό επιτυγχάνεται όταν η δέσμη του laser διασχίσει το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου κάθετα στον οπτικό άξονα δηλαδή στη βέλτιστη γεωμετρία σκέδασης στις 90° . Μόνο σε αυτή τη γεωμετρία η δέσμη του Laser δεν προσπίπτει στην επιφάνεια υλικών που περιβάλλουν τη πρόσθια κοιλότητα του οφθαλμού. Στο σχήμα 12.9 φαίνονται τα φάσματα που έχουν ληφθεί από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου που περιέχει 1 mg/mL διαλύματος σιπροφλοξασίνης, εφαρμόζοντας ή όχι τη βέλτιστη γεωμετρία σκέδασης. Παρατηρείται ότι στα τρία πρώτα φάσματα η επίδραση του POM, που φαίνεται από την κορυφή στους 925 cm^{-1} είναι έντονη και φθίνει προς το τελευταίο

φάσμα όπου η συνεισφορά αυτή ελαχιστοποιείται. Από την άλλη, σε όλα τα φάσματα η κορυφή στους 1393 cm^{-1} και 1637 cm^{-1} που οφείλονται στη σιπροφλοξασίνη έχουν σταθερή ένταση.

Σχήμα 12.9: Φάσματα από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου, που περιέχει 1 mg/mL διαλύματος σιπροφλοξασίνης, επιτυγχάνοντας ή όχι τη βέλτιστη γεωμετρία σκέδασης.

12.7 Φασματοσκοπική Μελέτη Μορίων Φαρμάκων σε Μοντέλο Πρόσθιου Θαλάμου.

12.7.1 Κεφαζιδίμη

Στο σχήμα 12.10 παρουσιάζονται τα φάσματα χαμηλών συχνοτήτων από το μοντέλο πρόσθιου θαλάμου πριν και μετά την έγχυση 10 mg/mL υδατικού διαλύματος κεφαζιδίμης. Το φάσμα του αντιβιοτικού αυτού στην προαναφερθείσα συγκέντρωση διακρίνεται εύκολα από το φάσμα του AAC που περιέχει απεσταγμένο νερό (0 mg/mL). Συγκεκριμένα η ουσία μπορεί να ταυτοποιηθεί από την χαρακτηριστική τριπλή κορυφή της που εμφανίζεται με επίκεντρο τους 1590 cm^{-1} .

Σχήμα 12.10: Φάσματα Raman που ελήφθησαν από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου πριν και μετά την έγχυση κεφταζιδίμης για συνολική συγκέντρωση 10mg/mL.

Με την διαδικασία που προαναφέρθηκε εγχύθηκαν στο μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου συγκεντρώσεις του φαρμάκου (10 - 0,5 mg/mL) και ελήφθησαν στη συνέχεια τα φάσματα Raman για τις συγκεντρώσεις αυτές. Σε κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού πραγματοποιήθηκαν διαφορετικά πειράματα έτσι ώστε να διασφαλιστεί η παρουσία γνωστής ποσότητάς του στο AAC. Στο σχήμα 12.11 παρουσιάζονται οι μικρότερες συγκεντρώσεις που μπορούν να ανιχνευτούν με την οργάνολογία που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο. Χρησιμοποιώντας τις προαναφερθείσες πειραματικές συνθήκες και παράγοντα σύζευξης 4, η μικρότερη συγκέντρωση της κεφταζιδίμης που διακρίνεται με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι 0,5 mg/mL.

Σχήμα 12.11: Φάσματα *Raman* που ελήφθησαν από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου πριν και μετά την έγχυση διαφορετικών συγκεντρώσεων κεφταζιδίμης (5-0,5mg/mL).

12.7.2 Αμφοτερισίνη Β

Στο σχήμα 12.12 παρουσιάζονται τα φάσματα χαμηλών συχνοτήτων από πρόσθιο θάλαμο πριν και μετά την έγχυση 0,5 mg/mL αμφοτερισίνης Β. Το φάσμα του αντιβιοτικού αυτού στην προαναφερθείσα συγκέντρωση διακρίνεται εύκολα από το φάσμα που λαμβάνεται από το ACC που περιέχει απιονισμένο νερό, δηλαδή μηδενική συγκέντρωση φαρμάκου. Η ουσία ταυτοποιείται όπως προαναφέρθηκε από την χαρακτηριστική έντονη κορυφή της στους 1554 cm⁻¹.

Μετά την έγχυση στον οφθαλμό υδατικού διαλύματος αμφοτερισίνης Β, συγκεντρώσεων από 500 μέχρι 5mg/mL, ελήφθησαν φάσματα *Raman* από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου οφθαλμού (Σχήμα 12.13). Σε κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού πραγματοποιήθηκαν διαφορετικά πειράματα έτσι ώστε να διασφαλιστεί η παρουσία γνωστής ποσότητας αμφοτερισίνης Β, στον πρόσθιο θάλαμο. Η χαμηλότερη συγκέντρωση που ανιχνεύτηκε στις πειραματικές συνθήκες που προαναφέρθηκαν είναι 5 μg/mL με παράγοντα σύζευξης 6.

Σχήμα 12.12: Φάσματα Raman που ελήφθησαν από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου πριν και μετά την έγχυση υδατικού διαλύματος αμφοτερισίνης B συγκέντρωσης 0,5 mg/mL.

Σχήμα 12.13: Φάσματα Raman που ελήφθησαν από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου πριν και μετά την έγχυση διαφορετικών συγκεντρώσεων αμφοτερισίνης B.

12.7.3 Αμικασίνη

Στο σχήμα 12.14 παρουσιάζονται τα φάσματα χαμηλών συχνοτήτων από το πρόσθιο θάλαμο πριν και μετά την έγχυση ποσότητας αμικασίνης, που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 100 mg/mL. Το φάσμα του αντιβιοτικού αυτού στην προαναφερθείσα συγκέντρωση διακρίνεται εύκολα από το φάσμα που λήφθηκε από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου και περιέχει υδατικό διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης αμικασίνης (0 mg/mL). Συγκεκριμένα, η ουσία μπορεί να ταυτοποιηθεί από την χαρακτηριστική κορυφή που εμφανίζεται με επίκεντρο τους 984 cm^{-1} .

Με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, εγχύθηκαν στο AAC διάφορες συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Ελήφθησαν στη συνέχεια τα φάσματα Raman για συγκεντρώσεις (10-1 mg/mL). Εφαρμόζοντας προαναφερθείσες πειραματικές συνθήκες και παράγοντα ζεύξης 4, η μικρότερη συγκέντρωση που διακρίνεται με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι για την αμικασίνη 1 mg/mL (Σχήμα 12.15).

Σχήμα 12.14: Φάσμα υδατικού διαλύματος της αμικασίνης από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου (100 mg/mL) και πρότυπο φάσμα του AAC που περιέχει απιονισμένο νερό.

Σχήμα 12.15: Φάσματα υδατικών διαλυμάτων της αμικασίνης από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου (10 – 0 mg/mL).

12.7.4 Σιπροφλοξασίνη

Τα πειράματα της σιπροφλοξασίνης πραγματοποιήθηκαν με δύο φακούς συλλογής του συστήματος T-64000, εστιακής απόστασης 160 και 80 mm. Στο σχήμα 12.16 παρουσιάζεται το φάσμα χαμηλών συχνοτήτων από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου πριν και μετά την έγχυση ποσότητας σιπροφλοξασίνης, που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 2 mg/mL. Το φάσμα του αντιβιοτικού αυτού στην προαναφερθείσα συγκέντρωση διακρίνεται εύκολα από το πρωτότυπο φάσμα που λήφθηκε από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου που περιέχει υδατικό διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης σιπροφλοξασίνης. Η ουσία μπορεί να ταυτοποιηθεί από την χαρακτηριστική κορυφή στους 1393 cm⁻¹.

Επιπλέον εγχύθηκαν στον οφθαλμό υδατικά διαλύματα διάφορων συγκεντρώσεων του φαρμάκου. Ελήφθησαν στη συνέχεια τα φάσματα Raman για διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας (200-20 μg/mL) στον πρόσθιο θάλαμο. Στο σχήμα 12.17 τα τέσσερα πρώτα φάσματα (200, 100, 50 και 20 μg/mL) έχουν ληφθεί με τον φακό των 160 mm, ενώ το πέμπτο φάσμα (*20 μg/mL) έχει ληφθεί με το φακό των 80 mm. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί η μικρότερη συγκέντρωση που ανιχνεύθηκε στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες με τον φακό συλλογής μεγάλης εστιακής απόστασης (160 mm) είναι 50 μg/mL, ενώ με το φακό μικρής εστιακής απόστασης (80 mm) το όριο ανίχνευσης ήταν 20 μg/mL.

Σχήμα 12.16: Φάσμα υδατικού διαλύματος της σιπροφλοξασίνης από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου (2mg/mL) και πρότυπο φάσμα του AAC που περιέχει απιονισμένο νερό.

Σχήμα 12.17: Φάσματα υδατικών διαλυμάτων της σιπροφλοξασίνης από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου (200 μg/mL-0 μg/mL).

12.8 Συμπεράσματα

Για τη σύγκριση των φασμάτων και των τεσσάρων αντιβιοτικών τα φάσματα κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με την ευρεία και έντονη κορυφή του νερού ($2800 - 3800 \text{ cm}^{-1}$) με επίκεντρο τους $\sim 3350 \text{ cm}^{-1}$. Η επιλογή αυτή έγινε διότι η κορυφή του νερού παραμένει αμετάβλητη κατά την μεταβολή των συγκεντρώσεων των φαρμάκων στα υδατικά διαλύματα. Επίσης, τα φάρμακα καθώς και τα περιβάλλοντα υλικά του μοντέλου του πρόσθιου θαλάμου (POM και κερατοειδής) δεν σκεδάζουν στη συγκεκριμένη φασματική περιοχή, γεγονός που αφήνει αναλλοίωτη την κορυφή που προέρχεται από τη δόνηση του μορίου O-H του νερού (Σχήμα 12.18). Η σύγκριση των φασμάτων της αμικασίνης και της σιπροφλοξασίνης με το φάσμα του νερού στις υψηλές συχνότητες φαίνεται στο σχήμα 12.18.

Σχήμα 12.18: Σύγκριση των φασμάτων των αντιβιοτικών (αμικασίνης και σιπροφλοξασίνης) και των υλικών που περιβάλλουν το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου με το φάσμα του νερού στις υψηλές συχνότητες.

Το νέο σύστημα που αναπτύχθηκε σε αυτή την εργασία για την επιλεκτική καθοδήγηση της δέσμης laser στον οφθαλμό, δίνει τη δυνατότητα επιλογής της επιθυμητής συλλογής της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας Raman σε γεωμετρία 90° , σαρώνοντας το τεχνητό πρόσθιο θάλαμο κατά τον ίδιο τρόπο που πραγματοποιήθηκε και στα πειράματα στους χοιρινούς οφθαλμούς. Έτσι, ανιχνεύτηκαν συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών της κεφαζιδίμης (0,5 mg/mL), της αμφοτερισίνης (5 μg/mL), συγκεντρώσεις που βρίσκονται κοντά στα επίπεδα της ελάχιστης ανασταλτικής τους πυκνότητας (minimum inhibitory concentration-MIC), που για μεν την κεφαζιδίμη είναι στα 0,03-0,14 mg/mL, ενώ για την αμφοτερισίνη B είναι 0,25-2 μg/mL. Επίσης ανιχνεύτηκε συγκέντρωση του αντιβιοτικού της αμικασίνης 1mg/mL, ενώ η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (minimum inhibitory concentration-MIC) του αντιβιοτικού είναι 2-25 μg/mL.^{7,8} Στην περίπτωση της σιπροφλοξασίνης, με το πλεονέκτημα του φακού μικρότερης εστιακής απόστασης σε σχέση με τα υπόλοιπα αντιβιοτικά, ανιχνεύθηκε συγκέντρωση 20 μg/mL, η οποία βρίσκεται μέσα στα όρια της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (minimum inhibitory concentration-MIC) του αντιβιοτικού (0,016-1024 μg/mL).^{9,10}

Κατά την τοποθέτηση του βολβού χοιρινού οφθαλμού σε βάση για τη λήψη φασμάτων, η στήριξη δεν είναι επαρκής οπότε υπάρχει παραμόρφωση του οφθαλμού, από το ιδανικό του σχήμα, όπως προαναφέρθηκε. Σε υποτιθέμενη in-vivo εφαρμογή, τέτοιου είδους παραμόρφωση δεν υφίσταται. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι με το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου επιτεύχθηκαν καλύτερα αποτελέσματα. Το όριο ανίχνευση των ουσιών βελτιώθηκε, γεγονός που επιβεβαιώνει την σκέψη του προηγούμενου κεφαλαίου ότι το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου δίνει τη δυνατότητα ευκολότερης τοποθέτησής του στο κατάλληλο σημείο για την επίτευξη της ευνοϊκότερης γεωμετρίας σκέδασης. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι ιστοί που περιβάλλουν τον πρόσθιο θάλαμο δεν σκεδάζουν τόσο έντονα όπως το υλικό του μοντέλου του πρόσθιου θαλάμου.

Αναφορές

- 1 Ruiz-Ederra, J., García, M., Hernández, M., Urcola, H., Hernández-Barbáchano, E., Araiz, J., Vecino, E. The pig eye as a novel model of glaucoma. *Exp. Eye Res.* 2005;8:561-569.
- 2 Dannheim F, Rassow B. Laser lesions of the anterior segment of the rabbit eye. Studies of cornea, iris, lens and sclera using argon, ruby and YAG-laser. *Albrecht Von Graefes Arch Klein Exp Ophthalmol* 1978;205:175-205.
- 3 Aszalos, A., Subambient Infrared spectra of several Aminoglycoside Antibiotics. *Appl. Spec.* 1984; 38:278-282
- 4 Neugebauer, U., Szeghalmi, A., Schmitt, M., Kiefer, W., Popp, J., Holzgrabe, U. Vibrational spectroscopic characterization of fluoroquinolones. *Spectrochim. Acta A* 2005;61:1505-1517.
- 5 Matsui, Y., Kubota, T., Yoshihara, T., Raman spectra of Polyethers, *J. Pol. Sci. A.* 1965;3:2275-2288.
- 6 Tadokoro, H., Kobayashi, M., Kawaguchi, Y., Kobayashi, A., Murahashi, S. Normal Vibrations of the polymer molecules of helical configuration. III. Polyoxymethylene and Polyoxymethylene-d2. *J. Chem. Phys.* 1963; 38(3): 703-721.
- 7 Uete, G., Matsuo, K., Uete, T., Clinical laboratory approach to evaluate efficacy of amikacin . Revaluation of in vitro MIC break points in disc susceptibility test. *Jpn. J. Antibiot.* 1992;45:489-501
- 8 Odenholt-Tornqvist, I., Lowdin, E., Cars, O. Postantibiotics Sub-Mic effects of Vancomycin, Roxithromycin, Sparfloxacin, and Amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992;36:1852-1858.
- 9 I. Odenholt, E. Lowdin, O. Cars, "Postadibiotic, Postandibiotic Sub-MIC, and Subinhibitory Effects of PGE-9509924, Ciprofloxacin, and Levofloxacin" *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3352-3356 (2003).
- 10 Jones, M., Boenink, N., Verhoef, J., Kohrer, K., Schmitz, F. Multiple mutation conferring ciprofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* demonstrate long-term stability in an antibiotic-free environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000;45: 353-356.

ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟ ΥΔΑΤΟΕΙΔΕΣ ΥΓΡΟ

Για να προσδιορίσουμε ποσοτικά τη συγκέντρωση των τεσσάρων αντιβιοτικών (όχι ταυτόχρονα) στο υδατοειδές υγρό και να επιστεγαστούν τα αποτελέσματα των προηγούμενων κεφαλαίων με έγκυρο και αντικειμενικό μαθηματικό τρόπο, επεξεργαζόμαστε τα φασματοσκοπικά δεδομένα Raman με τη στατιστική μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS). Η PLS ανάλυση μας επιτρέπει να εξαγάγουμε ποσοτικά αποτελέσματα για τις χαμηλότερες ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις των φαρμάκων ανεξάρτητα από την παρουσία άλλων συστατικών.

Συγκεκριμένα στο κεφάλαιο αυτό για κάθε φάρμακο αναπτύχθηκαν δύο επικυρωμένες μεθοδολογίες PLS. Η πρώτη στηρίζεται αποκλειστικά στα δεδομένα της οπτικής κυψελίδας (OC) με leave-one-out validation, ενώ η δεύτερη στηρίζει την βαθμονόμηση στα δεδομένα της οπτικής κυψελίδας OC χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου (AAC) για εξωτερική επικύρωση και αξιολόγηση.

13.1 Προετοιμασία Δειγμάτων

Για κάθε δραστική ουσία δημιουργούνται δύο ομάδες δεδομένων/φασμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις. Η πρώτη ομάδα αφορά διαλύματα μετρημένα από οπτική κυψελίδα (OC) και η δεύτερη αφορά διαλύματα αντίστοιχης συγκέντρωσης μετρημένα από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου (AAC).

Στην περίπτωση της κεφταζιδίμης έχουν ληφθεί 18 φάσματα Raman από οπτική κυψελίδα διαφορετικών συγκεντρώσεων υδατικών διαλυμάτων της ουσίας (0-2mg/mL) και 18 φάσματα Raman από το AAC για διάφορες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού (0-2 mg/mL).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αμφοτερισίνης Β στο υδατοειδές υγρό, δημιουργήθηκε μια ομάδα φασματικών δεδομένων που αποτελείται από 21 φάσματα που έχουν ληφθεί από οπτικές κυψελίδες με διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου (0-1mg/mL) και μία ομάδα φασμάτων από το AAC που αποτελείται από 21 φάσματα Raman με διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας (0-1 mg/mL)

Όσον αφορά στην αμικασίνη, έχουν ληφθεί 36 φάσματα Raman από οπτική κυψελίδα που περιέχουν υδατικά διαλύματα του φαρμάκου (0-50 mg/mL) και 10 φάσματα Raman από AAC για διάφορες συγκεντρώσεις της ουσίας (0-50 mg/mL).

Τέλος για την σιπροφλοξασίνη τα δεδομένα αποτελούνται από 40 φάσματα Raman από οπτική κυψελίδα με συγκεντρώσεις (0-1 mg/mL) και 27 φάσματα Raman που έχουν ληφθεί από το AAC διαφορετικών συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού (0-1 mg/mL).

Συγκεντρωτικά, οι ομάδες δεδομένων που δημιουργήθηκαν για την ποσοτική μελέτη των φασματοσκοπικών αποτελεσμάτων φαίνονται στον Πίνακα XIII.I.

Τα υδατικά διαλείμματα σε οπτικές κυψελίδες αλλά και στο μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου παρασκευάστηκαν όπως και στα προηγούμενα κεφάλαια 10 και 11, αντίστοιχα.

Πίνακας XIII.I : Ομάδες δεδομένων για την ποσοτική αποτίμηση των αντιβιοτικών στο υδατοειδές υγρό.

Αντιβιοτικό	Αριθμός φασμάτων (OC)	Αριθμός φασμάτων (AAC)	Περιοχή Συγκεντρώσεων
Κεφαζιδίμη	18	18	0-2 mg/mL
Αμφοτερισίνη Β	21	21	0-1 mg/mL
Αμικασίνη	36	10	0-50 mg/mL
Σιπροφλοξασίνη	40	27	0-1 mg/mL

13.2 Πειραματικές Διατάξεις

Όλα τα φάσματα λήφθηκαν με την οργανολογία T-64000 όπως αναφέρεται και στο προηγούμενο κεφάλαιο τόσο από κυψελίδα όσο και από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου.

Τα φάσματα από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου και για τα τέσσερα αντιβιοτικά έχουν ληφθεί με συνθήκες ισχύος laser 25-mW και χρόνο έκθεσης 1-s. Τα φάσματα όμως από τις κυψελίδες έχουν ληφθεί με τις καλύτερες δυνατές συνθήκες ανάλογα με την περίπτωση (πολύ χρόνο, μεγάλη ένταση) λαμβάνοντας υπόψη το σημείο κορεσμού του ανιχνευτή. Ο βαθμός σύζευξης “binning” για τα αντιβιοτικά κεφαζιδίμη, αμικασίνη και σιπροφλοξασίνη ήταν 4 ενώ για την αμφοτερισίνη 6. Πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία

τα φάσματα κανονικοποιούνται ομοίως με τα προηγούμενα κεφάλαια και διορθώνεται η γραμμή βάσης τους.

Η κατάστρωση των χημειομετρικών αλγορίθμων PLS ποσοτικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε επιλέγοντας και χρησιμοποιώντας υπορουτίνες του προγράμματος OPUS Quant-2 Spectroscopic Software της Bruker.

13.3 Πειραματική Διαδικασία

i) Τα φάσματα αρχικά εισέρχονται στο πρόγραμμα και δηλώνονται αυτά που θα χρησιμοποιηθούν είτε για εσωτερική είτε για εξωτερική επικύρωση.

ii) Χωρίς επεξεργασία, αναζητείται η καλύτερη φασματική περιοχή η οποία μας δίνει το χαμηλότερο σφάλμα (RMSE: Root Mean Square Error)

iii) Μόλις βρεθεί η καλύτερη φασματική περιοχή, επιλέγεται η φασματική επεξεργασία η οποία οδηγεί στο χαμηλότερο σφάλμα RMSE (π.χ. πρώτη ή δεύτερη παράγωγος).

iv) Τέλος επιλέγεται το μοντέλο της PLS ανάλυσης που δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα και στις δύο μεθοδολογίες επικύρωσης.

13.4 Αποτελέσματα PLS ανάλυσης

13.4.1 Κεφαζιδίμη

Για την συγκέντρωση της κεφαζιδίμης στο AAC τα καλύτερα αποτελέσματα, τόσο για την εσωτερική όσο και για την εξωτερική μεθοδολογία επικύρωσης, έχουν επιτευχθεί στη φασματική περιοχή από 1545 μέχρι 1628 cm^{-1} , λαμβάνοντας τη 2^η παράγωγο των φασμάτων και εξομαλύνοντάς τα με βαθμό 13. Στο πρώτο Rank η ανάλυση έδωσε (root mean square) $R^2=99,6\%$ και $\text{RMSE}=158 \text{ }\mu\text{g/mL}$ για τα φάσματα της κυψελίδας. Για την εξωτερική διαδικασία επικύρωσης, στο πρώτο Rank η μέθοδος έδωσε $R^2=98,5\%$ και $\text{RMSE}=301 \text{ }\mu\text{g/mL}$. Η προβλεπόμενη συγκέντρωση του αντιβιοτικού σε συνάρτηση με την πραγματική συγκέντρωση του αντιβιοτικού, για τις δύο μεθοδολογίες επικύρωσης φαίνονται στο σχήμα 13.1A και 13.1B αντίστοιχα.

Σχήμα 13.1: Προβλεπόμενη συγκέντρωση του αντιβιοτικού κεφαταζιδίμη σε συνάρτηση με την πραγματική συγκέντρωση για τις δύο μεθοδολογίες επικύρωσης (A) internal validation, (B) external validation.

13.4.2 Αμφοτερισίνη Β

Τα βέλτιστα αποτελέσματα για την αμφοτερισίνη Β επιτεύχθηκαν στη περιοχή 570-2500 cm^{-1} , και για τις δύο μεθοδολογίες επικύρωσης. Οι συγκεντρώσεις που προέβλεψε το μοντέλο σε συνάρτηση με τις πραγματικές συγκεντρώσεις της ουσίας για την εσωτερική και την εξωτερική επικύρωση φαίνονται στο σχήμα 13.2Α και 13.2Β, αντίστοιχα. Με τη χρήση 5 Ranks, οι συγκεντρώσεις στην leave-one-out επικύρωση προβλέφθηκαν με σφάλμα $R^2=99,5\%$ και $\text{RMSE}=36,6 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Ενώ στην εξωτερική επικύρωση, χρησιμοποιώντας τα φάσματα του AAC για αξιολόγηση, η ανάλυση προέβλεψε τις συγκεντρώσεις της αμφοτερισίνης με $R^2=98,4\%$ και μέσο σφάλμα $\text{RMS}=45,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

13.4.3 Αμικασίνη

Στα πειράματα για την συγκέντρωση της αμικασίνης στο AAC τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν στην φασματική περιοχή 800 με 2220 cm^{-1} , λαμβάνοντας τη πρώτη παράγωγο των φασμάτων με βαθμό smoothing 5 και για τις δύο ομάδες δεδομένων. Το μοντέλο που δημιουργήθηκε με βάση τα φάσματα από κυψελίδες μόνο (internal validation) προέβλεψε τις συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού με σφάλμα $R^2=99,2\%$ και $\text{RMSE}=1,2 \text{ mg/mL}$. Το μοντέλο που αναπτύχθηκε με βάση τα φάσματα σε κυψελίδα και AAC για εξωτερική επικύρωση, προέβλεψε συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού με σφάλμα $R^2=98,6\%$ και $\text{RMSE}=3,9 \text{ mg/mL}$. Το διάγραμμα της προβλεπόμενης σε συνάρτηση με την πραγματική συγκέντρωση του φαρμάκου φαίνεται στο σχήμα 13.3Α που προκύπτουν από την εσωτερική επικύρωση και στο σχήμα 13.3Β που προκύπτουν από την εξωτερική επικύρωση.

Σχήμα 13.2: : Προβλεπόμενη συγκέντρωση του αντιβιοτικού αμφοτερισίνη B σε συνάρτηση με την πραγματική συγκέντρωση για τις δύο μεθοδολογίες επικύρωσης (A) internal validation, (B) external validation.

Σχήμα 13.3: Προβλεπόμενη συγκέντρωση του αντιβιοτικού αμικασίνη σε συνάρτηση με την πραγματική συγκέντρωση για τις δύο μεθοδολογίες επικύρωσης (A) *internal validation*, (B) *external validation*.

13.4.4 Σιπροφλοξασίνη

Για την συγκέντρωση της σιπροφλοξασίνης στο AAC το μοντέλο της PLS ανάλυσης δημιουργήθηκε στη φασματική περιοχή από 725 μέχρι 1925 cm^{-1} , ενώ τα φάσματα για να αναλυθούν εξομαλύνθηκαν κατά ένα παράγοντα 13 και λήφθηκε η δεύτερη παράγωγός τους. Το μοντέλο που δημιουργήθηκε με βάση τα φάσματα που λήφθηκαν από κυψελίδα προέκυψε με σφάλμα $R^2=99,6\%$ και $\text{RMSE}=20,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Το μοντέλο που αναπτύχθηκε με βάση τα φάσματα από κυψελίδες και αξιολογήθηκε με τα φάσματα από το AAC επιτρέπει την πρόβλεψη συγκεντρώσεων με $R^2= 98,4\%$ και σφάλμα $\text{RMSE}=41 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Το διάγραμμα της προβλεπόμενης σε συνάρτηση με την πραγματική συγκέντρωση του φαρμάκου φαίνεται στο σχήμα 13.4A για τη leave-one-out επικύρωση των φασμάτων της κυψελίδας και στο σχήμα 13.4B για το μοντέλο της εξωτερικής επικύρωσης που χρησιμοποιεί και τα φάσματα του μοντέλου του πρόσθιου θαλάμου.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της PLS ανάλυσης για τις φαρμακευτικές ουσίες της εργασίας παρουσιάζονται στον πίνακα XIII.II.

Σχήμα 13.4: : Προβλεπόμενη συγκέντρωση του αντιβιοτικού σιπροφλοξασίνη σε συνάρτηση με την πραγματική συγκέντρωση για τις δύο μεθοδολογίες επικύρωσης (A) internal validation, (B) external validation.

Πίνακας XIII.II: Τα αποτελέσματα που προβλέφθηκαν με τη βοήθεια της PLS ανάλυσης για τις συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών σε μοντέλο πρόσθιου θαλάμου.

Αντιβιοτικό	Περιοχή Συγκεντρώσεων (mg/mL)	Φασματική Περιοχή (cm ⁻¹)	Data Preprocessing	OC data Leave-one-out			OC+AAC data External validation			MIC
				Rank	R ² (%)	RMSE (μg/mL)	Rank	R ² (%)	RMSE (μg/mL)	
Κεφαζιδίμη	0-2	1545-1628	2 nd derivative Smoothing: 13	1	99,6	158	1	98,5	301	30-140 μg/mL
Αμφοτερισίνη Β	0-1	570-2500	No data Preprocessing	5	99,5	36,6	3	98,4	45,5	0,25-2 μg/mL
Αμικασίνη	0-50	800-2220	1 st derivative Smoothing: 5	5	99,2	1200	3	98,6	3900	2-25μg/mL
Σπτροφλοξασίνη	0-1	725-1925	2 nd derivative Smoothing: 13	3	99,6	20,5	2	98,4	41	0,016-1024μg/mL

13.5 Συμπεράσματα

Στο παρόν κεφάλαιο, χρησιμοποιήθηκε μαθηματικός αλγόριθμος της PLS ανάλυσης για τη ποσοτικοποίηση των φασματοσκοπικών αποτελεσμάτων. Για τη μαθηματική τεκμηρίωση, για κάθε φάρμακο αναπτύχθηκαν δύο επικυρωμένες μεθοδολογίες PLS. Προφανώς η επικυρωμένη μεθοδολογία leave-one-out στα φάσματα από OC οδηγούν σε μικρότερο σφάλμα για όλα τα αντιβιοτικά. Για πρακτικούς σκοπούς πρέπει να αναφερθεί ότι οι τιμές των σφαλμάτων RMS και για τα τέσσερα αντιβιοτικά είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με την ελάχιστη συγκέντρωση που αναφέρεται ότι ανιχνεύεται φασματοσκοπικά στο προηγούμενο κεφάλαιο. Για την κεφταζιδίμη το μοντέλο αυτό προβλέπει συγκεντρώσεις (RMSE=158 $\mu\text{g/mL}$) που είναι κοντά στις απαιτήσεις των MIC για τη συγκεκριμένη ουσία.¹ Το μεγάλο σφάλμα στο μοντέλο της κεφταζιδίμης οφείλεται στην έλλειψη φασματικών/πειραματικών δεδομένων στην περιοχή συγκεντρώσεων 250-1000 $\mu\text{g/mL}$. Από την άλλη, το μοντέλο δεν μπορεί να προβλέψει συγκεντρώσεις για τα αντιβιοτικά αμφοτερισίνη (RMSE=36,6 $\mu\text{g/mL}$) και αμικασίνη (RMSE=1200 $\mu\text{g/mL}$) στις χαμηλές συγκεντρώσεις που επιβάλλονται από τα MIC των ουσιών.^{2,3,4} Η αμφοτερισίνη παρόλο που φασματοσκοπικά παρουσιάζει υψηλή ενεργότητα στο Raman, η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα της ουσίας είναι πολύ χαμηλή λόγω της υψηλής δραστηριότητάς της. Σε αντίθεση, η αμικασίνη ενώ παρουσιάζει υψηλότερα MIC, τα όρια ανίχνευσής της περιορίζονται διότι δεν σκεδάζει τόσο έντονα. Στην περίπτωση της σιπροφλοξασίνης τέλος, το μοντέλο προβλέπει συγκεντρώσεις της ουσίας στο μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου με RMSE=20,5 $\mu\text{g/mL}$ που κρίνεται επαρκές για τις περισσότερες εφαρμογές της.⁵⁶

Βέβαια το προηγούμενο μοντέλο βασίζεται σε φάσματα που έχουν ληφθεί από κυψελίδα που είναι και η ιδανική περίπτωση. Το μοντέλο γίνεται πιο ρεαλιστικό χρησιμοποιώντας τα φάσματα από το AAC ώστε να επικυρώσουν τη μεθοδολογία εξωτερικά. Εκτός από τις περιπτώσεις που τα βέλτιστα αποτελέσματα επιτυγχάνονται στο πρώτο Rank (κεφταζιδίμη, αμικασίνη) στις άλλες δύο περιπτώσεις (αμφοτερισίνη B, σιπροφλοξασίνη) εφαρμόζοντας την εξωτερική επικύρωση, τα βέλτιστα αποτελέσματα πετυχαίνονται σε μικρότερο Rank (πίνακας XIII.II) απ' ότι στην εσωτερική μεθοδολογία επικύρωσης. Αυτό δηλώνει ότι κάποιες από τις φασματικές πληροφορίες που σχετίζονται με τη συγκέντρωση των αντιβιοτικών «θάβονται» στον θόρυβο ή επικαλύπτονται από κορυφές που προέρχονται από το υλικό του AAC. Κάτι τέτοιο αποδεικνύεται συγκρίνοντας τα φάσματα της εσωτερικής και εξωτερικής επικύρωσης των διαλυμάτων των αντιβιοτικών στις οπτικές κυψελίδες και στο μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου. Για παράδειγμα παρατηρώντας τα φάσματα της 2^{ης} παραγώγου της σιπροφλοξασίνης που

έχουν ληφθεί από κυψελίδα (Σχήμα 13.5A) φαίνονται πολλές κορυφές που αποδίδονται στη σιπροφλοξασίνη (Σχήμα 12.7), ως εκούτου τα φάσματα αυτά είναι πλούσια σε πληροφορία που αφορά στη συγκέντρωση του αντιβιοτικού και η απόδοση του αλγορίθμου της εσωτερικής επικύρωσης είναι υψηλή ($R=99,6\%$). Τα φάσματα της δεύτερης παραγώγου που έχουν ληφθεί από το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου (Σχήμα 13.5B) είναι πιο θορυβώδη και παρατηρείται η δημιουργία νέων κορυφών που δεν σχετίζονται με την ύπαρξη και τη συγκέντρωση του φαρμάκου. Η πιο ισχυρή από αυτές τις κορυφές παρατηρείται στους 925 cm^{-1} περίπου και συνοδεύεται από ισχνότερες κορυφές στους 1345 και 1500 cm^{-1} , που αλληλεπικαλύπτονται με κορυφές του φαρμάκου στην ίδια φασματική περιοχή. Από το σχήμα 12.8 είναι προφανές ότι οι κορυφές αυτές οφείλονται στο φάσμα του πλαστικού υλικού από το οποίο είναι κατασκευασμένο το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου (POM). Επιπλέον, η μη συστηματική παρουσία αυτών των κορυφών μπορεί να δικαιολογηθεί λόγω της αποτυχίας επίτευξης της βέλτιστης γεωμετρίας σκέδασης, όπως αυτή έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 9. Η εξωτερική αξιολόγηση έχει παρόλα αυτά την ικανότητα να εξάγει πληροφορίες σχετικές με τη συγκέντρωση της σιπροφλοξασίνης, αλλά κάποιες από αυτές χάνονται λόγω της μη συστηματικής επικάλυψης με το φάσμα του POM από το οποίο είναι κατασκευασμένο το AAC.

Σχήμα 13.5: 2^η παράγωγος των φασμάτων των υδατικών διαλυμάτων (0-1mg/mL) από (A) κυψελίδες και (B) το μοντέλο του πρόσθιου θαλάμου (AAC). Το φάσμα με την έντονη γραμμή αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 1mg/mL.

Βασιζόμενη στην παραπάνω ανάλυση και στο γεγονός ότι ο κερατοειδής δεν συνεισφέρει φασματοσκοπικά στα φάσματα της 2^{ης} παραγώγου, προσδοκούμε ότι σε υποτιθέμενη *in-vivo* εφαρμογή της χημειομετρίας Raman για τον προσδιορισμό της σιπροφλοξασίνης στον οφθαλμό, θα επιτευχθούν καλύτερα αποτελέσματα που θα προσεγγίζουν τα αποτελέσματα που προβλέπει το μοντέλο της εσωτερικής επικύρωσης που στηρίζεται στα φάσματα μόνο των κυψελίδων, προσδιορίζοντας το κατώφλι ελάχιστης ανιχνεύσιμης συγκέντρωσης στα 25-30 µg/mL. Παρόμοιοι συλλογισμοί ισχύουν και για τα αποτελέσματα των υπόλοιπων τριών φαρμάκων.

Αν και η αξιοπιστία στην εξωτερική μεθοδολογία επικύρωσης χειροτερεύει σε σχέση με αυτή της εσωτερικής επικύρωσης για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, οι τιμές των RMS σφαλμάτων παραμένουν της ίδιας τάξης μεγέθους με τα ελάχιστα όρια ανίχνευσης των προηγούμενων κεφαλαίων. Στην περίπτωση μάλιστα της σιπροφλοξασίνης το μοντέλο κρίνεται ικανοποιητικό για μεγάλο εύρος εφαρμογών.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι τα φάσματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση ελαχίστων τετραγώνων (PLS) και αφορούν τα αντιβιοτικά κεφαζιδίμη, αμφοτερισίνη Β και αμικασίνη, έχουν ληφθεί χρησιμοποιώντας τον φακό συλλογής 160 mm. Μόνο στα φάσματα της σιπροφλοξασίνης χρησιμοποιήθηκε ο φακός συλλογής με εστιακή απόσταση 80 mm. Αυτό σημαίνει ότι τα όρια ανίχνευσης για τα τρία πρώτα αντιβιοτικά μπορούν να βελτιωθούν περαιτέρω.

Στον πίνακα XIII.III παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των τριών τελευταίων κεφαλαίων.

Πίνακας XIII.III: Τα ελάχιστα όρια των ουσιών που ανιχνεύτηκαν σε πρόσθιο θάλαμο χοιρινών οφθαλμών *in-vitro*, σε μοντέλο πρόσθιου θαλάμου καθώς και αυτά που προσδιορίστηκαν μετά από ποσοτική ανάλυση PLS.

Ουσία	Ελάχιστα Όρια Ανίχνευσης				MIC
	Σε χοιρινούς οφθαλμούς in-vitro	Σε μοντέλο πρόσθιου θαλάμου (AAC)		external validation (PLS analysis) RMSE	
		Φακό συλλογής (160mm)	Φακό συλλογής (80mm)		
Ceftazidime	0,9 mg/mL	0,5 mg/mL	-	301 µg/mL	0,03-0,14 mg/mL
Amphotericin B	9 µg/mL	5 µg/mL	-	45,5 µg/mL	0,25-2 µg/mL
Amikacin	-	1 mg/mL	-	3,9 mg/mL	2-25 µg/mL
Ciprofloxacin	-	50 µg/mL	20 µg/mL	41 µg/mL	0,016-1024 µg/mL
Glucose	2 mg/mL	επίπεδα σε διαβητικούς ασθενείς~1.4 mg/mL φυσιολογικά επίπεδα ~0.6 mg/mL			

Αναφορές

- 1 Welsh K, Barlow M, Tenover F, Biddle J, Rasheed J, Clark L, McGowan J. Experimental prediction of the evolution of ceftazidime resistance in the CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Agents Ch* 2005;49:1242-1244.
- 2 Ralph E, Khazindar A, Barber K, Grant C. Comparative in vitro effects of liposomal amphotericin B, amphotericin B-deoxycholate, and free amphotericin B against fungal strains determined by using MIC and minimal lethal concentration susceptibility studies and time-kill curves. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35: 188-191.
- 3 Uete, G., Matsuo, K., Uete, T., Clinical laboratory approach to evaluate efficacy of amikacin . Revaluation of in vitro MIC break points in disc susceptibility test. *Jpn. J. Antibiot.* 1992;45:489-501
- 4 Odenholt-Tornqvist, I., Lowdin, E., Cars, O. Postantibiotics Sub-Mic effects of Vancomycin, Roxithromycin, Sparfloxacin, and Amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992;36:1852-1858.
- 5 I. Odenholt, E. Lowdin, O. Cars, "Postadibiotic, Postandibiotic Sub-MIC, and Subinhibitory Effects of PGE-9509924, Ciprofloxacin, and Levofloxacin" *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3352-3356 (2003).
- 6 Jones, M., Boenink, N., Verhoef, J., Kohrer, K., Schmitz, F. Multiple mutation conferring ciprofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* demonstrate long-term stability in an antibiotic-free environment. *J. Antimicrob. Chemother.*

Συμπεράσματα

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας νέας γεωμετρική οπτική διάταξη που θα εκθέτει με συγκεκριμένο τρόπο τον οφθαλμό, στη δέσμη του laser, για την μη επεμβατική ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης φαρμακευτικών και φυσιολογικών ουσιών στο πρόσθιο θάλαμο του οφθαλμού. Η διάταξη σχεδιάστηκε, αναπτύχθηκε και προσαρμόστηκε σε φασματοσκόπιο Raman με ανιχνευτή CCD δίνοντας τη δυνατότητα επιλεκτικής συλλογής του σκεδαζόμενου φωτός, σαρώνοντας τον εμπρόσθιο θάλαμο, σε γεωμετρία σκέδασης 90° . Επιπλέον μετατροπές στο σύστημα συλλογής της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας πολλαπλασίασαν την συνολική ικανότητα ανίχνευσης της φασματοσκοπικής διάταξης.

Επιτύχαμε να ανιχνεύσουμε στον πρόσθιο θάλαμο χοιρινών οφθαλμών καθώς και σε μοντέλο πρόσθιου θαλάμου συγκεντρώσεις αντιβιοτικών που βρίσκονται κοντά ή στα επίπεδα της ελάχιστης ανασταλτικής τους πυκνότητας, με πειραματικές συνθήκες ασφαλείς για ενδεχόμενη *in-vivo* εφαρμογή· επίσης, η συγκέντρωση της γλυκόζης ανιχνεύτηκε σε συγκεντρώσεις κοντά στα παθολογικά επίπεδα των διαβητικών ασθενών.

Τα υποσχόμενα αποτελέσματα εδραιώθηκαν με έγκυρο και αντικειμενικό μαθηματικό τρόπο, χρησιμοποιώντας τη στατιστική μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) στα φασματοσκοπικά δεδομένα Raman.

Προοπτική

Οι μελλοντικές εργασίες προσανατολίζονται στη χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής για τη μελέτη της φαρμακοκινητικής ουσιών και την έγκαιρη διάγνωση οφθαλμικών ασθενειών in-vivo, ποσοτικοποιώντας τα αποτελέσματα με χρήση στατιστικών μεθόδων ανάλυσης. Επιπλέον, εκτός από τον έλεγχο φαρμακευτικών ουσιών, η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση στο υδατοειδές υγρό ναρκωτικών ουσιών όπως η καναβινόλη και η ηρωίνη καθώς και άλλων απαγορευμένων ουσιών και μη, με την προϋπόθεση ότι περιέχουν χημικές ομάδες που είναι ενεργές στο Raman. Τέλος πολύ σημαντική είναι και η προοπτική της δημιουργίας ενός φακού επαφής που θα τοποθετείται στην επιφάνεια του κερατοειδή ασθενούς πριν από την μέτρηση, ο οποίος θα έχει τη δυνατότητα να αναιρεί τη διάθλαση του φωτός στην επιφάνεια του κερατοειδή με αποτέλεσμα η δέσμη του laser να εισέλθει στον πρόσθιο θάλαμο στην ευθεία με την οποία προσπίπτει. Με τον τρόπο αυτό θα διευκολυνθεί πολύ η επίτευξη της βέλτιστης γεωμετρίας σκέδασης στο πρόσθιο τμήμα του οφθαλμού.