

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
Τμήμα Ηλεκτρολόγων & Ηλεκτρονικών Μηχανικών
www.eee.uniwa.gr

Θηβών 250, Αθήνα-Αιγάλεω 12244
Τηλ. +30 210 538-1225, Fax. +30 210 538-1226



UNIVERSITY of WEST ATTICA
FACULTY OF ENGINEERING
Department of Electrical & Electronics Engineering
www.eee.uniwa.gr

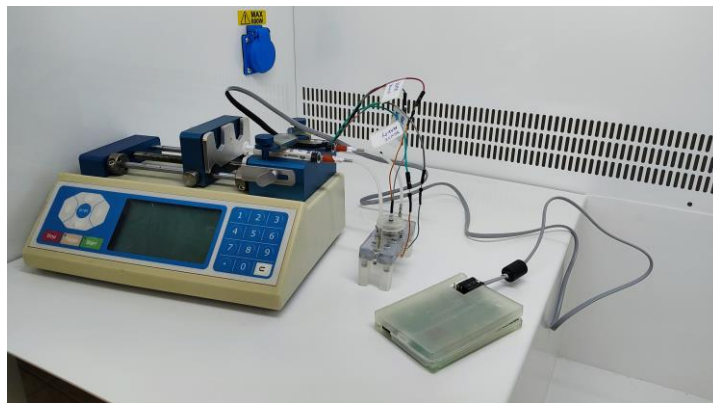
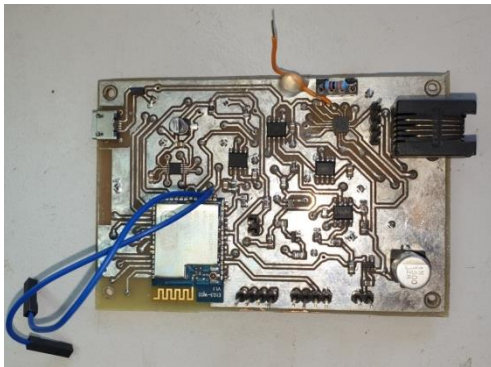
250, Thivon Str., Athens, GR-12244, Greece
Tel:+30 210 538-1225, Fax:+30 210 538-1226

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Ηλεκτρικές & Ηλεκτρονικές Επιστήμες μέσω Έρευνας

Master of Science By Research in
Electrical & Electronics Engineering

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ολοκληρωμένο Σύστημα Φασματοσκοπίας Εμπέδησης για Μελέτη Βιολογικών
Δειγμάτων

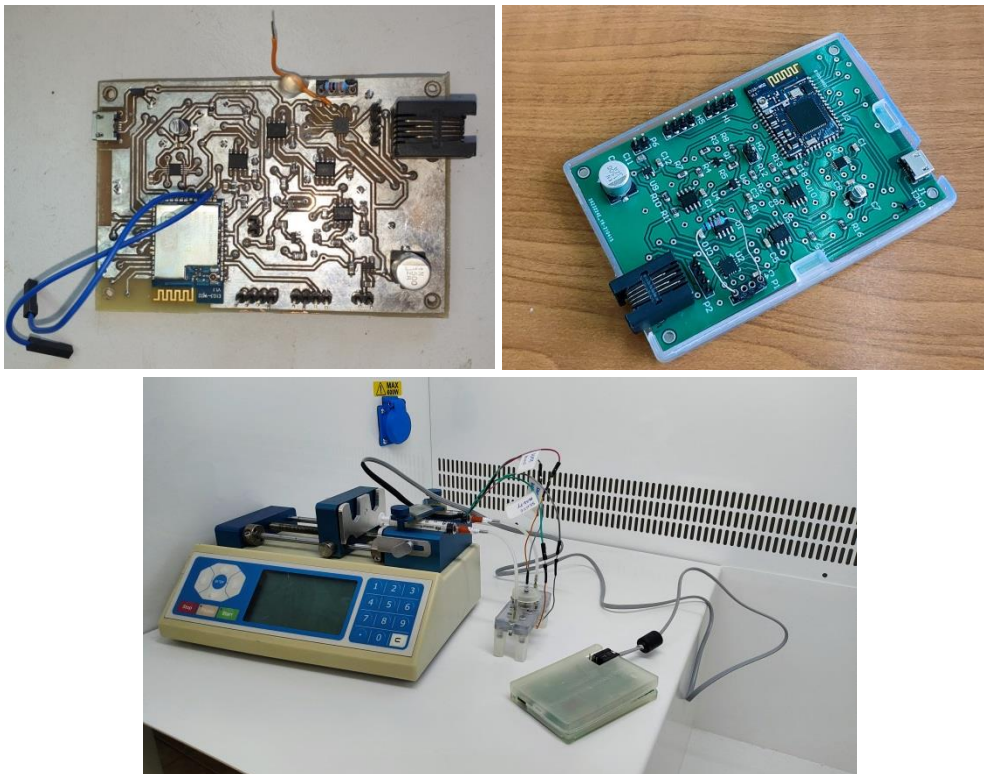


Μεταπτυχιακός Φοιτητής: Καλλέργης Αλέξανδρος-Εμμανουήλ, AM MSCRES-0038
Επιβλέπων: Καλτσάς Γρηγόριος, Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ-ΑΙΓΑΛΕΩ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2024

MSc Thesis

Integrated Impedance Spectroscopy System for the Study of Biological Samples



Student: Kallergis Alexandros-Emmanouil, Registration Number MSCRES-0038

MSc Thesis Supervisor: Kaltsas Grigoris, Professor

ATHENS-EGALEO, OCTOBER 2024

Η Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία έγινε αποδεκτή, εξετάστηκε και βαθμολογήθηκε από την εξής τριμελή εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπων	Μέλος	Μέλος
Γρηγόρης Κατσάς Καθηγητής	Γεώργιος Τσεκούρας Αναπληρωτής Καθηγητής	Κωνσταντίνος Μουτζούρης Καθηγητής

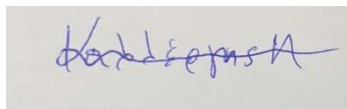
ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Καλλέργης Αλέξανδρος-Εμμανουήλ του Γεωργίου, με αριθμό μητρώου MSCRES-38 φοιτητής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Ηλεκτρικές και Ηλεκτρονικές Επιστήμες μέσω Έρευνας» του Τμήματος Ηλεκτρολόγων και Ηλεκτρονικών Μηχανικών της Σχολής Μηχανικών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας και κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Τέλος, βεβαιώνω ότι η εργασία αυτή δεν έχει κατατεθεί στο πλαίσιο των απαιτήσεων για τη λήψη άλλου τίτλου σπουδών ή επαγγελματικής πιστοποίησης πλην του παρόντος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών



Καλλέργης Αλέξανδρος-Εμμανουήλ

Copyright © Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ και Καλλέργης Αλέξανδρος-Εμμανουήλ,

Οκτώβριος 2024

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον/την συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον/την συγγραφέα του και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις θέσεις του επιβλέποντος μέλους ΔΕΠ, της επιτροπής εξέτασης ή τις επίσημες θέσεις του Τμήματος και του Ιδρύματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία αναπτύσσει ένα σύστημα in-vitro μελέτης μέσω μικρορευστομηχανικής συσκευής που επιτρέπει την προσομοίωση του βλεννογόνου ανθρώπινου επιθηλίου επιτρέποντας συνεχή ροή βακτηρίων και φάγων στις επιθηλιακές επιφάνειες. Η μικροβιακή αστάθεια στην ασθένεια του άσθματος μπορεί να σχετίζεται ή/και να οφείλεται σε υποβόσκουσα αστάθεια μικροοργανισμών γνωστών ως «φάγων». Σε συνεργασία με το εργαστήριο της Β' παιδιατρικής κλινικής του ΕΚΠΑ, στοχεύουμε στη διερεύνηση των τριμερών αλληλεπιδράσεων και τις συμβιωτικές/ανταγωνιστικές σχέσεις μεταξύ βακτηρίων, φάγων και επιθηλιακών κυττάρων με στόχο την καλύτερη κατανόηση της επίδρασης των φάγων στην υγεία του ανθρώπου.

Το μικρορευστομηχανικό μέρος της συσκευής, ανεπτυγμένο σε συνεργασία με τον κ. Κούτση Τζούλιαν, Υ.Δ. του Τμήματος Ηλεκτρολόγων και Ηλεκτρονικών Μηχανικών, περιέχει την καλλιέργεια των επιθηλιακών κυττάρων μαζί με τα θρεπτικά διαλύματα. Η κατασκευή επίσης περιέχει τα απαραίτητα ηλεκτρόδια ώστε να γίνονται οι μετρήσεις βιο-εμπέδησης.

Για το ηλεκτρονικό μέρος της συσκευής κατασκευάστηκε εργαστηριακό πρωτότυπο PCB μικτού-σήματος με μικροελεγκτή TI CC3200 και τα απαραίτητα αναλογικά στοιχεία (AFE) για τη δημιουργία και επεξεργασία κατάλληλων σημάτων στα 10Hz-10kHz, δηλαδή το φάσμα ενδιαφέροντος για τη φασματοσκοπία βιο-εμπέδησης. Οι μετρήσεις είναι γαλβανοστατικές, 4-σημείων και ένα φάσμα μπορεί να λαμβάνεται μέσα σε $\approx 7s$. Το σύστημα είναι ασύρματο (WI-FI) και μπορεί να λειτουργεί με μπαταρίες για να μπορεί να τοποθετηθεί μέσα στον επωαστή και κοντά στην καλλιέργεια. Επιπρόσθετα αναπτύχθηκε και εφαρμογή για συσκευή Android με στόχο τον έλεγχο της συσκευής και επεξεργασία-παρουσίαση των δεδομένων.

Έχει γίνει εκτενής έλεγχος και προσομοίωση της λειτουργίας του συστήματος χρησιμοποιώντας ηλεκτρικά ισοδύναμα κυκλώματα. Παράλληλα έχει διεξαχθεί πειραματικός έλεγχος σε πραγματικές συνθήκες με πολύ αξιόλογα αποτελέσματα.

Στο παράρτημα υπάρχει το εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής στα αγγλικά.

ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ: Φασματοσκοπία εμπέδησης, μικροελεγκτής, επιθηλιακά κύτταρα, μικρορευστομηχανική διάταξη, εφαρμογή Android.

ABSTRACT

This work presents the development of an in-vitro system for studies utilising a microfluidic device that allows for the simulation of human epithelium and allows constant flow of bacteria and phages on the epithelium surfaces. Microbial imbalance in asthma can be correlated with underlying phage imbalance. The present work which was done in cooperation with National & Kapodistrian University of Athens, B' pediatric clinic attempts to investigate tripartite interactions and the symbiotic/competitive relations between bacteria, phage and epithelial cells, aiming to better understand the effects of phages on human health.

The microfluidic part of the device, developed in cooperation with Mr. Koutsis Julian, Phd student of the dept. of Electrical and Electronics Engineering, contains the culture and the nutritional solutions. The part also contains necessary electrodes for BIO-Impedance measurements.

For the electronic part of the device a lab prototype PCB was fabricated featuring a TI CC3200 MCU, with the necessary analog front-end for generation and processing of required signals in the 10Hz-10kHz spectrum of interest for BIO-EIS. Measurements are 4-point galvanostatic and a full spectrum is obtained within $\approx 7s$. The system is wireless (WI-FI) and can operate within an incubator and close to the cell culture using batteries. Additionally, an Android mobile application was developed to facilitate the control of the device and presentation-processing of data.

Extensive testing and verification of the system have been performed using equivalent electrical circuits. Experiments have been carried out under real conditions, with very satisfactory results.

In the appendix we include the user manual of the device in English.

KEYWORDS: Impedance spectroscopy, microcontroller, epithelial cells, microfluidic device, android application.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία χρειάστηκε εξειδικευμένο εξοπλισμό και βοήθεια από αρκετά άτομα για να ολοκληρωθεί. Θέλω να ευχαριστήσω πρωτίστως τον επιβλέποντα κύριο Γρηγόρη Καλτσά για την πολύτιμη καθοδήγησή του και για την παροχή του εξοπλισμού του εργαστηρίου Μικροσυστημάτων, Αισθητήρων, Ενσωματωμένων Διατάξεων και Αυτοματισμού (microSENSES)

Επίσης τον κ. Κούτση Τζούλιαν με τον οποίο συνεργάστηκα για την ολοκλήρωση του συστήματος και ο οποίος διεξάγει τα πειράματα *in vitro* στο εργαστήριο της Β' παιδιατρικής κλινικής του ΕΚΠΑ. Ο κ. Κούτσης ανέπτυξε το μικρορευστομηχανικό σύστημα απαραίτητο για την εργασία.

Καίρια ήταν και η βοήθεια των κ. Μπαρμπάκου Δημητρίου, κ. Φαμέλη Ιωάννη και κ. Αποστολάκη Αποστόλου που συμβούλεψαν ή συνέβαλαν σε διάφορα θέματα κατασκευής και συγγραφής.

Ήταν μια ευχάριστη εμπειρία και ανυπομονώ για περαιτέρω συνεργασία με όλους.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΚΡΟΝΥΜΙΩΝ-ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

AC	Alternating current
ADC	Μετατροπέας αναλογικό-ψηφιακό
AFE	Analog front-end, αναλογικό ηλεκτρονικό κύκλωμα
ALI	AIR-LIQUID INTERFACE, επιφάνεια αέρα-υγρού
CPE	Constant phase element, Στοιχείο σταθερής φάσης
DAC	Μετατροπέας ψηφιακό-αναλογικό
DDS	direct-digital-synthesizer, ψηφιακός συνθέτης κυματομορφών
DL	Double Layer
FFT	Fast fourier transform, γρήγορος μετασχηματισμός fourier
FTEIS	Fourier transform Impedance spectroscopy
HNPECs	ανθρώπινα ρινικά κύρια επιθηλιακά κύτταρα
IC	Integrated circuit, Ολοκληρωμένο κύκλωμα
IS	Impedance spectroscopy
NLLSF	Non-linear Least Squares Fitting
TEEI	Trans-epithelial electrical impedance διεπιθηλιακή εμπέδηση
TEER	Trans-epithelial electrical resistance, διεπιθηλιακή αντίσταση
BIO-ΦΕ	Φασματοσκοπία εμπέδησης σε βιολογικές εφαρμογές
ΗΙΚ	Ηλεκτρικά ισοδύναμα κυκλώματα
ΘΓΣ	Θεωρία γραμμικών συστημάτων
Κ-Κ	Kramers-Kronig
ΦΕ	Φασματοσκοπία εμπέδησης

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Ευχαριστίες	σελ. 8
Πίνακας ακρωνυμίων	σελ. 9
Γενικά	σελ. 12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Θεωρητικό πλαίσιο του θέματος – Ανασκόπηση του πεδίου	σελ. 14
1. Εισαγωγή στη Φασματοσκοπία εμπέδησης (ΦΕ)	σελ. 14
1.1. Θεωρία κυκλωμάτων και μιγαδική αναπαράσταση στη μόνιμη κατάσταση	σελ. 15
1.2. Παρουσίαση δεδομένων	σελ. 18
1.3. Γραμμικότητα των η/χ συστημάτων	σελ. 19
1.4. Συστήματα σταθερής κατάστασης	σελ. 20
1.5. Πεδία χρόνου και συχνότητας, και μετασχηματισμοί	σελ. 21
1.6. Φυσική ηλεκτροχημεία και ισοδύναμα στοιχεία κυκλώματος	σελ. 22
2. Παλιοί και νέοι τρόποι διεκπεραίωσης ΦΕ	σελ. 32
3. Εφαρμογές ΦΕ-Γενικά	σελ. 35
4. Φασματοσκοπία εμπέδησης σε βιολογικές εφαρμογές-ΒΙΟ-ΦΕ	σελ. 36
4.1. Γενικά - Φυσιολογία μονοστρωμάτων – Φραγμοί	σελ. 37
4.2. Ηλεκτρικά ισοδύναμα & καμπύλες απόκρισης	σελ. 41
4.3. TEER / TEEI διατάξεις	σελ. 44
4.4. Σφάλματα στα TEER συστήματα:	σελ. 47
4.5. Διάφορες διατάξεις και παράγοντες	σελ. 48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Σχεδιασμός, Ανάπτυξη και Έλεγχος της Διάταξης.	σελ. 60
1. Η ευρύτερη διάταξη	σελ. 61
2. Προσομοίωση	σελ. 67
2.1. Γεννήτρια κυματομορφών και διαιρέτης τάσης	σελ. 67
2.2. AC σύζευξη	σελ. 68
2.3. Πηγή ρεύματος ακριβείας	σελ. 69
2.4. Ανίχνευση τάσης φορτίου	σελ. 70
2.5. Ψαλιδιστής και χαμηλοπερατό φίλτρο ADC	σελ. 71
3. Ο Μικροελεγκτής TI CC3200	σελ. 72
4. Πρακτική υλοποίηση-DDS	σελ. 73
5. Πρακτική υλοποίηση –Αναλογικό μέρος	σελ. 77
6. Σχεδιασμός ολοκληρωμένης πλακέτας	σελ. 77
6.1. Σχέδια πλακέτας	σελ. 78
7. Η διεπαφή με συσκευή ANDROID	σελ. 80
7.1. Διαδικασία λήψης μετρήσεων χρησιμοποιώντας τη συσκευή Android.	σελ. 83
8. Έλεγχος και εξακρίβωση της διάταξης	σελ. 83
8.1. Σχεδιασμός ψαλιδιστή	σελ. 82
8.2. AC σύζευξη	σελ. 84
8.3. Ανίχνευση των κυματομορφών με ADC	σελ. 85

8.4. Ψηφιακό φίλτρο για τις κυματομορφές εισόδου-εξόδου	σελ. 87
8.5. Αλλαγή MOSFET	σελ. 90
8.6. Αλλαγή R14 με ψηφιακό ροοστάτη	σελ. 91
8.7. Εύρεση ακρίβειας συστήματος και εκτίμηση με NLSF	σελ. 91
8.8. Διάγραμμα ροής μικροελεγκτή	σελ. 94
8.9. Σύγκριση λειτουργίας με μπαταρία/τροφοδοτικό.	σελ. 95
8.10. Έλεγχος επίδρασης θορύβου WIFI στη μέτρηση.	σελ. 96
8.11. Σύγκριση αποκρίσεων ημιτόνου, τετραγώνου & τριγώνου.	σελ. 98
8.12. Απόκριση για πυκνωτή και πηνίο.	σελ. 102
8.13. Απόκριση φάσης.	σελ. 104
8.14. Μακροχρόνια ακρίβεια και επαναληψιμότητα.	σελ. 104
8.15. Σύγκριση με εμπορικό σύστημα AD5933	σελ. 105
8.16. Προκαταρκτικές μετρήσεις με διάλυμα αλατόνερου.	σελ. 107
8.17. Προκαταρκτικές μετρήσεις σε καλλιέργειες κυττάρων	σελ. 109
9. Γενικότερα σχόλια	σελ. 111
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Συμπεράσματα και προτάσεις	σελ. 112
1. Μελλοντικοί στόχοι	σελ. 112
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	σελ. 113
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	σελ. 114
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΟ ΧΡΗΣΤΗ	σελ. 122

Αντικείμενο, ερευνητικά ερωτήματα και διάρθρωση της εργασίας

Ο σκοπός αυτής της εργασίας είναι η ανάπτυξη ενός φορητού και ολοκληρωμένου συστήματος βιο-εμπέδησης, το οποίο να είναι χαμηλού κόστους και υψηλής ακρίβειας.

Η φασματοσκοπία είναι η μελέτη συστημάτων ανάλογα με την απόκρισή τους σε διάφορες συχνότητες. Στη φασματοσκοπία εμπέδησης (ΦΕ), ηλεκτρικά σήματα χρησιμοποιούνται για να βρεθούν τα χαρακτηριστικά ενός δείγματος. Τα δείγματα μπορούν να είναι ηλεκτροχημικά (H/X) στοιχεία, βιολογικά υλικά, ή ακόμα και διατάξεις πολλών στοιχείων που προορίζονται για ποιοτικό έλεγχο. Όταν τα δείγματα προς ανάλυση είναι βιολογικά υλικά αναφερόμαστε σε βιο-εμπέδηση [1]. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε μια συσκευή μέτρησης για τον χαρακτηρισμό βιολογικών υλικών.

Η ΦΕ χρησιμοποιείται σε εφαρμογές βιο-εμπέδησης με σκοπό να βρεθούν τα ηλεκτρικά χαρακτηριστικά δειγμάτων υγρών ή στερεών. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών και της αγοράς λόγω της μη-επεμβατικής φύσης της. Η παρακολούθηση της ανάπτυξης και της ακεραιότητας κυττάρων είναι κρίσιμη για πλήθος βιοϊατρικών εφαρμογών [2] και για τον σκοπό αυτό έχουν διεξαχθεί ποικίλα *in-vitro* πειράματα, τα οποία προσεγγίζουν επιτυχώς τις *in-vivo* συνθήκες [3]. Η έρευνα έχει ως τώρα επικεντρωθεί σε ανάπτυξη *in-vitro* μοντέλων για διάφορες καλλιέργειες κυττάρων, όπως πνευμόνων [4], πεπτικών [5] και εγκεφάλου-αίματος [52]. Η διαφορά που μπορεί να παρατηρηθεί στην εμπέδηση έχει βρεθεί επαρκής για να εξηγήσει εξειδικευμένες βιολογικές παραμέτρους [6].

Οι κύριες διατάξεις όπου γίνονται τα πειράματα αφορούν *transwell* συστήματα και *organs-on-chips*. Η *transwell* διάταξη αποτελεί το «δοχείο» όπου γίνεται η καλλιέργεια κυττάρων. Το *organ-on-chip* είναι ένα σύνολο διατάξεων που μπορεί να εκτελεί περίπλοκες βιολογικές λειτουργίες. Οι λειτουργίες εξαρτώνται από τις ανάγκες του πειράματος. Η διάταξη που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας αποτελεί ένα μέρος ενός συστήματος *organ-on-chip* το οποίο εμπεριέχει την *transwell* δομή. Επιπρόσθετα εμπεριέχει την καλλιέργεια των επιθηλιακών κυττάρων μαζί με το θρεπτικό διάλυμα το οποίο κυκλοφορεί μέσω του μικρορευστομηχανικού συστήματος. Η κατασκευή επίσης ενσωματώνει τα απαραίτητα ηλεκτρόδια, ώστε να γίνονται οι μετρήσεις βιο-εμπέδησης.

Οι συσκευές μέτρησης που χρησιμοποιούνται κατά κόρον είναι είτε TEER (*trans-epithelial electrical resistance*, διεπιθηλιακή αντίσταση), είτε φασματοσκοπίας εμπέδησης (*Impedance spectroscopy*, IS/ TEEI, *trans-epithelial electrical impedance*). Η ΦΕ μπορεί να δώσει παραπάνω πληροφορίες για την κατάσταση του δείγματος, καθώς μετράει ένα ευρύ φάσμα, ενώ η TEER μόνο μια συχνότητα [2].

Εμπορικά διαθέσιμα συστήματα υπάρχουν προς πώληση από εξειδικευμένες εταιρείες του χώρου όπως η Autolab και η Corrtest. Τέτοια συστήματα ξεκινούν από 2.000 € και μπορεί να φτάσουν τα 50.000€.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας και σε συνεργασία με τη Β' παιδιατρική κλινική του ΕΚΠΑ ερευνάται το αναπνευστικό επιθήλιο και οι αντιδράσεις του σε κάποια μικρόβια παρόντα στις αναπνευστικές οδούς, τα οποία ίσως προξενούν μικροβιακή αστάθεια ή δυσβίωση. Ερευνάται επιπρόσθετα ο ρόλος βακτηριακών ιών, γνωστών ως βακτηριοφάγων, στις επιφάνειες του επιθηλίου ανθρωπίνων αεραγωγών και στην κατάσταση των πληθυσμών βακτηρίων.

Στο 1^ο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας γίνεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση με ανάλυση των βασικών αρχών και ευρημάτων από έρευνες σχετικά με το θέμα της φασματοσκοπίας εμπέδησης και μελέτης βιολογικών δειγμάτων.

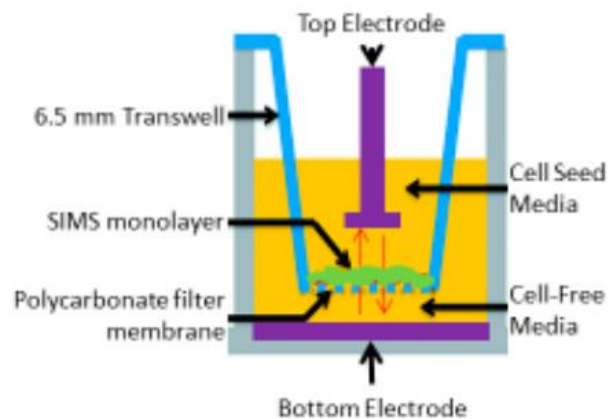
Στο 2^ο κεφάλαιο περιγράφεται η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, ο σχεδιασμός με βάση τις ανάλογες προδιαγραφές, η υλοποίηση και τα αποτελέσματα που προέκυψαν. Ο κύκλος αυτός περιγράφεται αρκετές φορές μέχρι την τελική προσέγγιση που αναλύεται στην τελευταία ενότητα.

Στο 3^ο κεφάλαιο διατυπώνονται τα συμπεράσματα από το όλο εγχείρημα και οι απαντήσεις στα ερευνητικά ερωτήματα που τέθηκαν στην αρχή. Τέλος διατυπώνονται μελλοντικές προοπτικές και σχέδια που απορρέουν από την παρούσα εργασία.

Θεωρητικό πλαίσιο του θέματος – Επισκόπηση του πεδίου.

1. Εισαγωγή στη φασματοσκοπία εμπέδησης

Η φασματοσκοπία εμπέδησης (ΦΕ) (σχ.1) είναι πλέον καλά εδραιωμένη ως ισχυρό εργαλείο για τη μέτρηση διηλεκτρικών παραμέτρων και ιδιοτήτων μεταφοράς σε υλικά, για τη μελέτη των πορωδών ηλεκτροδίων και γενικά για τον έλεγχο επιφανειών [11]. Έχει δείξει εξαιρετικά αποτελέσματα και σε βιολογικές εφαρμογές [6].



Σχ.1. Λειτουργικό σχήμα ΦΕ σε μία transwell διάταξη. Το monolayer είναι το μονοστρώμα κυττάρων. (Schramm et al., 2017)

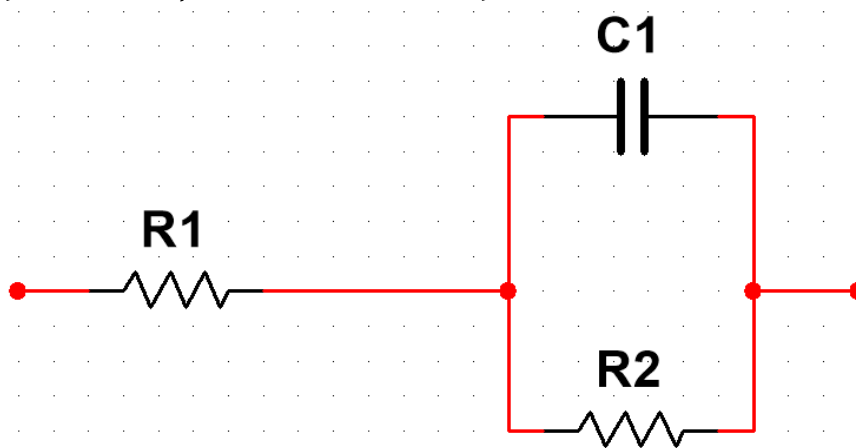
Τα βασικά πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής ΦΕ είναι τα εξής:

- I. Είναι γραμμική τεχνική για επαρκώς μικρά σήματα εισόδου [12]. Επομένως τα αποτελέσματά της είναι εύκολα ερμηνεύσιμα από τη θεωρία γραμμικών συστημάτων (Θ.Γ.Σ.).
- II. Αν μετρηθεί σε ένα αρκετά μεγάλο φάσμα συχνοτήτων, μπορούν να βρεθούν όλες οι πληροφορίες που προβλέπει η ΘΓΣ.
- III. Η εγκυρότητα των δεδομένων είναι άμεσα καθοριζόμενη από τεχνικές μετασχηματισμών (π.χ. Kramers-Kronig, Fourier).
- IV. Μπορεί να είναι μη-επεμβατική (non-invasive) και να μην αφήνει ίχνη (label-free). Μια μη-επεμβατική τεχνική προϋποθέτει να μη γίνεται κάποια ανεπιθύμητη παρέμβαση στο αντικείμενο που μετράται, ενώ label-free νοείται η τεχνική που αν εφαρμοστεί δεν αφήνει κάποια μόνιμη διαμόρφωση στο αντικείμενο.

Κατά την άποψη του Macdonald [11], η δυναμική της ΦΕ μένει ακόμα να φανεί πλήρως, εν μέρει γιατί θεωρείται εξειδικευμένη τεχνική που χρειάζεται ειδικό εξοπλισμό, αλλά κυρίως γιατί η ερμηνεία των δεδομένων σε κάποιους τομείς χρειάζεται σύνθετη επεξεργασία. Αν υπάρχουν αυτές οι προϋποθέσεις, μπορούν να διακριτοποιηθούν πολλοί φαινομενικά συγγενείς μηχανισμοί. Καθώς όμως συνήθως δεν υπάρχει άμεση μαθηματική ανάλυση των αποτελεσμάτων, οι μετρήσεις ΦΕ ερμηνεύονται από

ηλεκτρικά ισοδύναμα κυκλώματα (ΗΙΚ). Η ανάλυση των ΗΙΚ δεν αποτελεί την απόλυτη λύση καθώς οι πληροφορίες που μπορούν να εξαχθούν από μια πλήρη αιτιοκρατική ανάλυση υπερτερούν, εφόσον τα αίτια και τα αποτελέσματα είναι μετρήσιμα στην πράξη.

Τα ΗΙΚ που χρησιμοποιούνται κατά κόρον έχουν προκύψει από την αξιόλογη δουλειά του Heaviside [7], αλλά η προγενέστερη χρήση ανάλογων για την ερμηνεία ηλεκτροχημικών δεδομένων είναι πιθανότατα από τους Dolin-Ershler το 1940 [13] και τον Randles το 1947 [14]. Το ισοδύναμο κύκλωμα του Randles (σχ. 2) παρείχε μια ακριβή εξομοίωση των χαρακτηριστικών εμπέδησης μιας γρήγορης αντίδρασης μεταφοράς φορτίου σε επίπεδο ηλεκτρόδιο και έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα αρκετές δεκαετίες πριν. Το εν λόγω ΗΙΚ αναλύεται στην εν.1.1.6.



Σχ.2. Δικτύωμα γνωστό ως απλό Randles.

1. Θεωρία κυκλωμάτων και μιγαδική αναπαράσταση στη μόνιμη κατάσταση.

Η αρχή της ηλεκτρικής αντίστασης είναι ευρέως γνωστή. Είναι η ιδιότητα ενός ηλεκτρονικού στοιχείου να αντιτίθεται στη ροή ηλεκτρικού ρεύματος. Ο νόμος του Ohm ορίζει την αντίσταση ως το κλάσμα της τάσης V προς το ρεύμα I :

$$R = \frac{V}{I} \quad (\text{εξ.1})$$

Η συγκεκριμένη σχέση, αναφέρεται σε ένα στοιχείο κυκλώματος—τον ιδανικό αντιστάτη. Ένας ιδανικός αντιστάτης έχει συγκεκριμένες ιδιότητες:

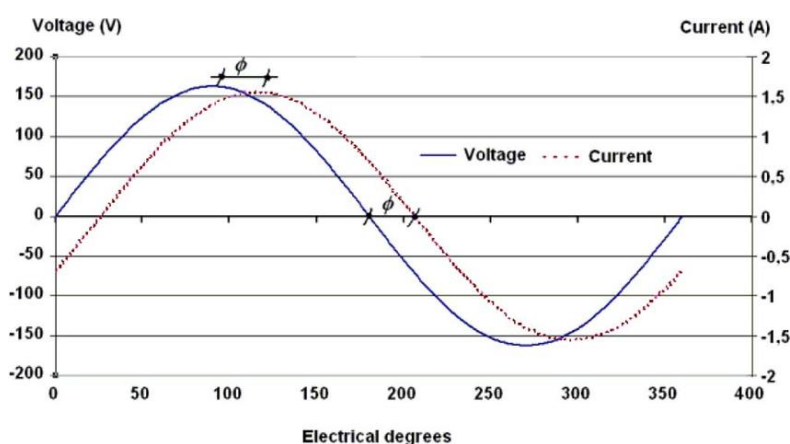
- Η τιμή της αντίστασης του είναι ανεξάρτητη της συχνότητας και αμετάβλητη ως προς το χρόνο.
- Το AC ρεύμα και η τάση που το διαπερνούν είναι σε φάση μεταξύ τους.

Ωστόσο, ο πραγματικός κόσμος περιέχει στοιχεία κυκλώματος που έχουν πολύ πιο περίπλοκη συμπεριφορά. Τα στοιχεία αυτά μας αναγκάζουν να εγκαταλείψουμε την απλή προσέγγιση της αντίστασης, και στη θέση της να χρησιμοποιούμε τη μιγαδική σύνθετη αντίσταση (εμπέδηση), μια πιο γενική παράμετρο. Όπως η αντίσταση έτσι κι η

εμπέδηση είναι το μέτρο της δυνατότητας του στοιχείου να αντιτίθεται στη ροή ηλεκτρικού ρεύματος, όμως η εμπέδηση δεν περιορίζεται στις ιδιότητες που είδαμε παραπάνω.

Η ηλεκτροχημική εμπέδηση μετράται συνήθως εφαρμόζοντας AC σήμα σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο και έπειτα μετρώντας το ρεύμα που το διαρρέει. Ας υποθέσουμε ότι εφαρμόζουμε μία τάση διέγερσης ημιτονοειδούς συνάρτησης. Η αντίδραση σε αυτή τη διέγερση είναι ένα σήμα AC ρεύματος. Αυτό το σήμα μπορεί να αναλυθεί ως ένα άθροισμα ημιτονοειδών συναρτήσεων (αρμονικών Fourier).

Η ηλεκτροχημική εμπέδηση μετράται χρησιμοποιώντας κατά το δυνατόν μικρά σήματα εισόδου, ώστε η αντίδραση του στοιχείου να είναι ψευδο-γραμμική. Σε ένα γραμμικό /ψευδο-γραμμικό σύστημα, η απόκριση ρεύματος σε ημιτονοειδή τάση εισόδου θα είναι ημιτονοειδής στην ίδια συχνότητα και ίσως μετατοπισμένη στη φάση (σχ.3). Η γραμμικότητα περιγράφεται πιο εκτενώς παρακάτω.



Σχ.3. Ημιτονοειδείς είσοδος τάση (V) και έξοδος ρεύμα (A) σε γραμμικό σύστημα. (Da Silva et al.)

Το σήμα διέγερσης, εκφρασμένο ως συνάρτηση του χρόνου, έχει τη μορφή

$$E_t = E_0 \sin(\omega t) \quad (\text{εξ.2})$$

Όπου E_t είναι το ηλεκτρικό πεδίο σε χρόνο t , E_0 είναι το πλάτος του σήματος πεδίου, και ω είναι η κυκλική συχνότητα. Η σχέση μεταξύ κυκλικής συχνότητας ω (εκφρασμένη σε rad/s) και συχνότητας, είναι:

$$\omega = 2\pi f \quad (\text{εξ.3})$$

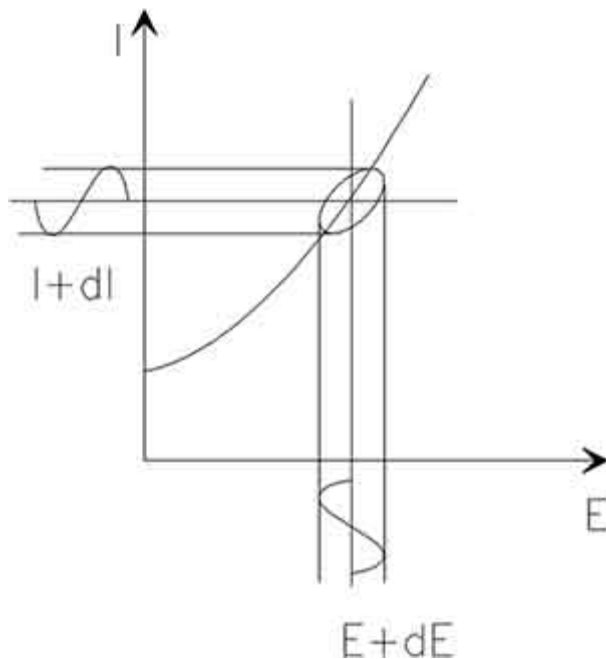
Σε ένα γραμμικό σύστημα, το σήμα απόκρισης, I_t , μετατοπίζεται σε φάση ϕ .

$$I_t = I_0 \sin(\omega t + \phi) \quad (\text{εξ.4})$$

Μια έκφραση ανάλογη του νόμου του Ohm μας επιτρέπει να υπολογίσουμε την εμπέδηση του συστήματος ως:

$$Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \varphi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \varphi)} \quad (\epsilon\xi.5)$$

Η εμπέδηση, επομένως, εκφράζεται με όρους μέτρου, Z_0 , και μετατόπισης φάσης, φ . Αν σχεδιάσουμε την ημιτονοειδή είσοδο μικρού-σήματος, $dE(t)$, στον Χ-άξονα του γραφήματος και την ημιτονοειδή έξοδο μικρού-σήματος, $dI(t)$, στον Υ-άξονα, το αποτέλεσμα αποτυπώνεται στο σχήμα 4. Αυτό το οβάλ σχήμα είναι γνωστό σαν σχήμα Lissajous. Ανάλυση των σχημάτων Lissajous σε οθόνες παλμογράφων ήταν η παλαιά μέθοδος μέτρησης εμπέδησης πριν αναπτυχθούν οι σύγχρονες μέθοδοι οργάνων ΦΕ.



Σχ.4. Σχήμα Lissajous (Gamry instruments).

Με τη σχέση του Euler,

$$e^{j\varphi} = \cos\varphi + j\sin\varphi \quad (\epsilon\xi.6)$$

είναι δυνατόν να εκφράσουμε την εμπέδηση σαν μιγαδική συνάρτηση. Σε περίπτωση γραμμικού συστήματος, η τάση μεγάλου-σήματος περιγράφεται ως:

$$E_t = E_0 e^{j\omega t} \quad (\epsilon\xi.7)$$

και η απόκριση ρεύματος μεγάλου-σήματος ως:

$$I_t = I_0 e^{j\omega t - \varphi} \quad (\epsilon\xi.8)$$

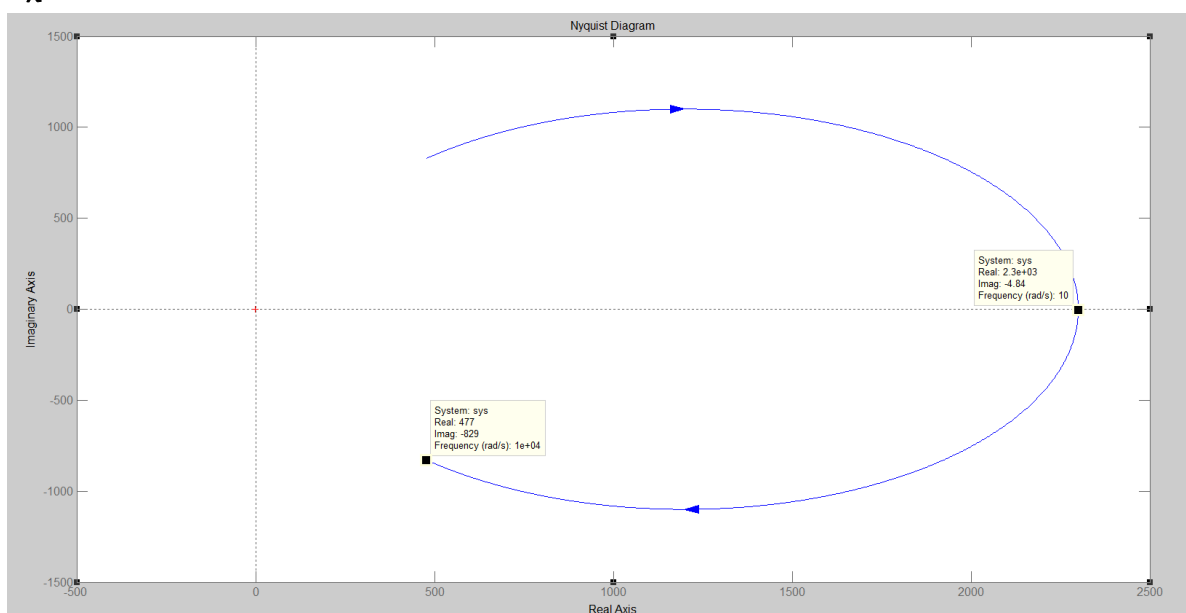
Η εμπέδηση τότε αναπαρίσταται με τον μιγαδικό αριθμό:

$$Z(\omega) = \frac{E}{I} = Z_0 e^{j\varphi} = Z_0 (\cos\varphi + j\sin\varphi) \quad (\text{εξ.9})$$

2. Παρουσίαση δεδομένων

Η έκφραση της $Z(\omega)$ αποτελείται από ένα πραγματικό και ένα φανταστικό μέρος. Αν το πραγματικό μέρος παρασταθεί στον Χ-άξονα και το φανταστικό μέρος στον Υ-άξονα, έχουμε ένα Nyquist διάγραμμα.

Χρησιμοποιώντας λογισμικό Matlab (MathWorks, Inc), παρακάτω παρουσιάζεται ένα παράδειγμα διαγράμματος Nyquist στο οποίο υλοποιήθηκε εφαρμογή για να σχεδιαστεί μια απόκριση για συχνότητες 10Hz – 10kHz και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχ.5.



Σχ.5. Διάγραμμα Nyquist. Συχνότητες 10Hz -10 kHz.

Κάθε σημείο του γεωμετρικού τόπου είναι μία συχνότητα. Σημειώστε ότι το κάτω και το πάνω ημιεπίπεδο είναι συζυγή μιγαδικά, με τις θετικές συχνότητες να είναι στο κάτω ημιεπίπεδο για την κάθε απόκριση. Αν παραλείψουμε το πάνω ημιεπίπεδο και λαμβάνοντας υπόψιν μόνο το κάτω ημιεπίπεδο, δεξιά βρίσκεται σημειωμένη η ελάχιστη συχνότητα που ζητήθηκε να σχεδιαστεί, η 10Hz. (σημ. δεν βρίσκεται ακριβώς πάνω στον άξονα X) Κινούμενοι προς τα αριστερά καταλήγουμε στη μέγιστη συχνότητα, σημειωμένη στα 10kHz. Το φανταστικό μέρος είναι αρνητικό που υποδεικνύει χωρητική συμπεριφορά.

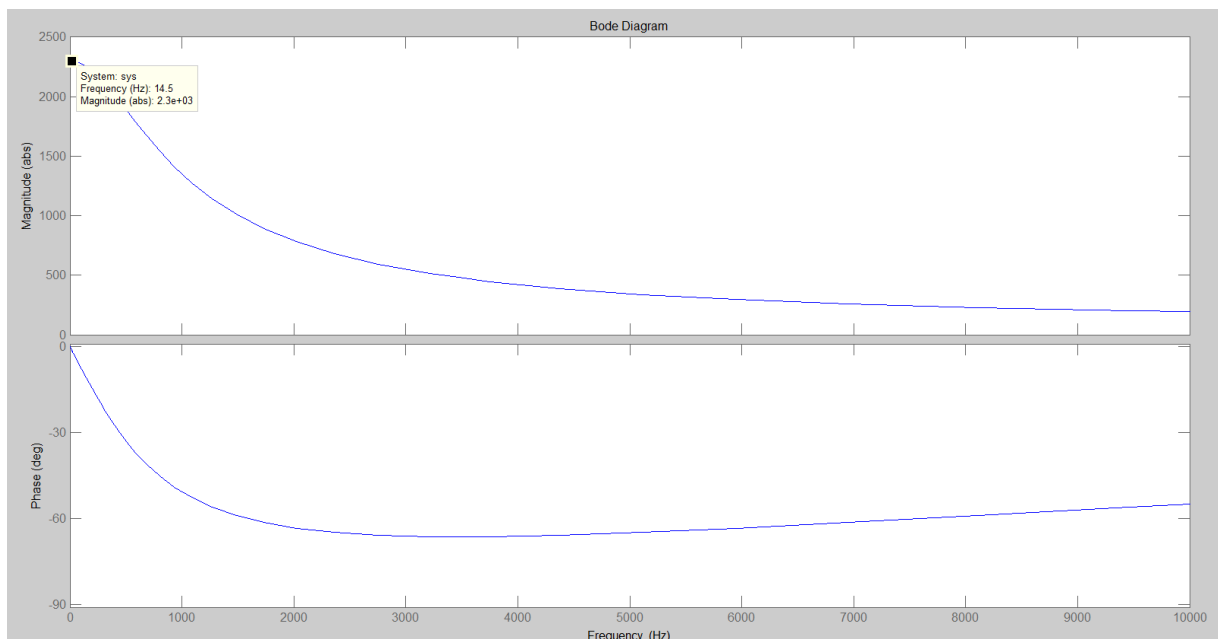
Αν πάρουμε το διάνυσμα κάθε σημείου, βρίσκουμε το μέτρο της εμπέδησης, $|Z|$. Ενώ από την κλίση του διανύσματος βρίσκουμε τη φάση:

$$\varphi = \arg(Z) = \operatorname{atan}\left(\frac{\operatorname{Im}(Z)}{\operatorname{Re}(Z)}\right) \quad (\epsilon\xi.10)$$

Το παραπάνω διάγραμμα προέρχεται από κύκλωμα όπως του **σχ.2**. Το ημικύκλιο είναι χαρακτηριστικό της «σταθεράς χρόνου» του παράλληλου συνδυασμού R2-C1 και απαντάται συχνά στη φασματοσκοπία.

Τα διαγράμματα Nyquist έχουν ένα βασικό μειονέκτημα, καθώς δεν είναι προφανής η συχνότητα σε κάθε σημείο.

Ένα άλλο σύνηθες διάγραμμα αναπαράστασης είναι το διάγραμμα BODE. Στο **σχ.6** είναι το αντίστοιχο διάγραμμα bode του κυκλώματος που παρουσιάζεται στο **σχ.2**. Αντίθετα με το διάγραμμα Nyquist, απεικονίζονται εμφανώς οι πληροφορίες συχνότητας.



Σχ.6. Διάγραμμα bode στο Matlab. Συχνότητες 10Hz -10 kHz. Όλοι οι άξονες είναι σε γραμμική κλίμακα.

Το $|Z|$ παρίσταται (πάνω διάγραμμα), σε γραμμική ή σε λογαριθμική κλίμακα, και η φάση φ (κάτω διάγραμμα), σε μοίρες. Η συχνότητα μπορεί να παρίσταται σε γραμμική ή σε λογαριθμική κλίμακα.

3. Γραμμικότητα των ηλεκτροχημικών συστημάτων

Η θεωρία ηλεκτρικών κυκλωμάτων κάνει διάκριση μεταξύ γραμμικών και μη συστημάτων/κυκλωμάτων. Η ανάλυση εμπέδησης των γραμμικών συστημάτων είναι πολύ πιο εύκολη από των μη-γραμμικών.

Ο παρακάτω ορισμός ενός γραμμικού συστήματος έχει παρθεί από το βιβλίο “Signals and systems” των Oppenheim-Willsky:

Ένα γραμμικό σύστημα διαθέτει τη σημαντική ιδιότητα της υπέρθεσης: Αν η είσοδος αποτελείται από άθροισμα ορισμένων σημάτων, τότε η έξοδος είναι απλά η υπέρθεση,

δηλαδή, το άθροισμα των αποκρίσεων του συστήματος σε καθένα από τα σήματα. Μαθηματικά, έστω $Y1(t)$ η απόκριση ενός συστήματος συνεχούς χρόνου για είσοδο $X1(t)$ και έστω $Y2(t)$ η απόκριση για είσοδο $X2(t)$. Τότε το σύστημα είναι γραμμικό αν:

1) Η απόκριση στο $X1(t)+X2(t)$ είναι $Y1(t)+Y2(t)$.

2) Η απόκριση στο $aX1(t)$ είναι $aY1(t)$...

Για μία ποτενσιοστατική ηλεκτροχημική μέτρηση (δείτε ενότητα 1.2 «ηλεκτρόδια μέτρησης»), η είσοδος είναι η τάση και η έξοδος το ρεύμα. Τα ηλεκτροχημικά στοιχεία δεν είναι γραμμικά. Διπλασιασμός της εισόδου δεν θα οδηγήσει αναγκαστικά σε διπλασιασμό της εξόδου, όπως απαιτείται από τη δεύτερη συνθήκη παραπάνω.

Ωστόσο, το **σχ.4** δείχνει ότι τα ηλεκτροχημικά στοιχεία μπορεί να είναι ψευδο-γραμμικά. Αν κοιτάξουμε σε αρκετά μικρή περιοχή της καμπύλης ρεύματος-τάσης φαίνεται το στοιχείο να είναι γραμμικό.

Η συνήθης μέθοδος στη ΦΕ είναι μικρό AC σήμα εισόδου (<10mV) να εφαρμόζεται στο στοιχείο. Με τόσο μικρό σήμα το στοιχείο είναι ψευδο-γραμμικό. Δεν βλέπουμε τη μη-γραμμική απόκριση στο DC, διότι μετράμε μόνο το ρεύμα του στοιχείου στη δεδομένη συχνότητα εισόδου.

Αν το σύστημα είναι ψευδο-γραμμικό, η απόκριση ρεύματος θα περιέχει αρμονικές της συχνότητας εισόδου. (Η αρμονική είναι συχνότητα ακέραιο πολλαπλάσιο της στοιχειώδους. Για παράδειγμα, η 2^η αρμονική είναι συχνότητα ίση με 2 φορές τη στοιχειώδη.)

Κάποιοι ερευνητές έχουν εκμεταλλευθεί αυτό το φαινόμενο [12]. Τα γραμμικά συστήματα δεν θα έπρεπε να δημιουργούν αρμονικές, οπότε η παρουσία τους επιτρέπει την αξιολόγηση της γραμμικότητας του συστήματος.

Άλλοι ερευνητές έχουν σκόπιμα χρησιμοποιήσει μεγαλύτερα σήματα διέγερσης. Εκμεταλλεύονται την αρμονική απόκριση για να εκτιμήσουν την καμπυλότητα της απόκρισης ρεύματος-τάσης του στοιχείου.

4. Συστήματα σταθερής κατάστασης

Η μέτρηση ενός φάσματος ΦΕ μπορεί να πάρει χρόνο (ακόμα και ώρες ανάλογα την περίπτωση). Το σύστημα που μετράται πρέπει να είναι σε σταθερή κατάσταση κατά την περίοδο που γίνεται η μέτρηση. Μια συνήθης αιτία προβλημάτων κατά τις μετρήσεις ΦΕ είναι η ολίσθηση στο σύστημα που μετράται.

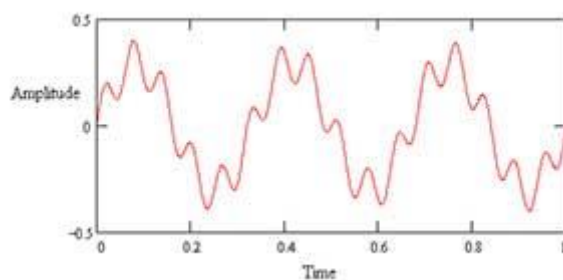
Στην πράξη μια σταθερή κατάσταση μπορεί να είναι δύσκολο να επιτευχθεί. Το στοιχείο μπορεί να αλλάξει μέσω προσρόφησης από το διάλυμα, ανάπτυξης στρώματος οξειδωσης, ανάπτυξης προϊόντων αντίδρασης στο διάλυμα, καταστροφής επιστρώσεων, αλλαγών θερμοκρασίας κ.ά.

Αν δε ληφθεί φροντίδα για τη σταθεροποίηση του συστήματος μπορεί οι μετρήσεις να έχουν μεγάλο σφάλμα.

5. Πεδία χρόνου και συχνότητας, και μετασχηματισμοί.

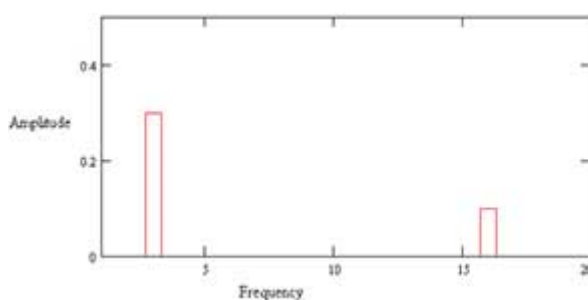
Η θεωρία επεξεργασίας σήματος αναφέρεται σε πεδία αναπαράστασης δεδομένων. Τα ίδια δεδομένα μπορούν να παρασταθούν σε διάφορα πεδία. Στη ΦΕ, χρησιμοποιούνται κατά κόρον δύο απ' αυτά τα πεδία: το πεδίο του χρόνου και το πεδίο της συχνότητας.

Στο πεδίο του χρόνου, τα σήματα αναπαρίστανται σαν το πλάτος του σήματος ως προς το χρόνο. Στο **σχ.7** απεικονίζεται ένα σήμα που αποτελείται από δυο διαφορετικά ημίτονα σε υπέρθεση.



Σχ.7. Υπέρθεση 2 διαφορετικών ημιτόνων. (Gamry instruments)

Το **σχ.8** δείχνει το ίδιο σήμα στο πεδίο της συχνότητας. Το σήμα παρίσταται σαν πλάτος σήματος ως προς τη συχνότητα.



Σχ.8. Το σήμα στο πεδίο της συχνότητας. (Gamry instruments)

Χρησιμοποιούμε μετασχηματισμούς για να μεταφερθούμε μεταξύ των πεδίων. Ο μετασχηματισμός Fourier ($x(t) \leftrightarrow X(\Omega)$) λαμβάνει δεδομένα πεδίου χρόνου και εξάγει τα αντίστοιχα δεδομένα για το πεδίο της συχνότητας. Ο συνήθης όρος, FFT (γρήγορος μετασχηματισμός Fourier), αναφέρεται σε μια γρήγορη, αλγοριθμική υλοποίηση του μετασχηματισμού Fourier ($x(n) \leftrightarrow X(\Omega)$). Ο αντίστροφος μετασχηματισμός Fourier μετατρέπει δεδομένα από το πεδίο της συχνότητας σε δεδομένα στο πεδίο του χρόνου.

Σε κάποιες περιπτώσεις, στα σύγχρονα συστήματα ΦΕ το σύστημα μέτρησης μπορεί να εφαρμόσει μια ημιτονοειδή κυματομορφή εισόδου μέσω ενός DAC (μετατροπέα ψηφιακό-αναλογικό). Η απόκριση μπορεί έπειτα να μετρηθεί χρησιμοποιώντας έναν ADC (μετατροπέας αναλογικού-ψηφιακού). Έπειτα ο FFT μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνει μετατροπή του σήματος ως προς τον χρόνο στο πεδίο της συχνότητας και να εξαχθεί το πλάτος και η φάση. Παρακάτω θα δούμε αναλυτικά τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται.

6. Φυσική ηλεκτροχημεία και ισοδύναμα στοιχεία κυκλώματος

Αντίσταση ηλεκτρολύτη

Η αντίσταση του διαλύματος παίζει συχνά σημαντικό ρόλο στην εμπέδηση ενός η/χ στοιχείου.

Η χρήση της μεθόδου 4-ηλεκτροδίων (εν.1.2), μπορεί να απαλείψει μερικώς την αντίσταση του διαλύματος, ωστόσο και πάλι πρέπει να ληφθεί υπόψιν στο μοντέλο που χρησιμοποιούμε.

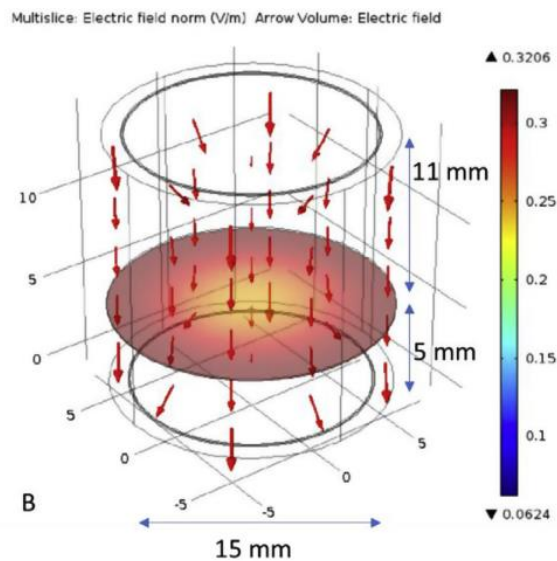
Η αντίσταση ιοντικού διαλύματος εξαρτάται από την ιοντική συγκέντρωση, τον τύπο ιόντων, τη θερμοκρασία και τη γεωμετρία της περιοχής στην οποία κυκλοφορεί το ρεύμα. Όπως θα εξηγηθεί μετέπειτα, οι μελετητές προσπαθούν να τυποποιήσουν αυτές τις παραμέτρους.

Σε όγκο διατομής A και μήκους l , που μεταφέρει ομοιόμορφη πυκνότητα ρεύματος, η αντίσταση ορίζεται ως

$$R = \rho \frac{l}{A} \quad (\text{εξ.11})$$

όπου: ρ είναι η ειδική αντίσταση του διαλύματος σε $\Omega \cdot \text{m}$. Η αντίστροφη παράμετρος της ρ είναι η αγωγιμότητα (κ) του διαλύματος σε Siemens/m.

Δυστυχώς τα περισσότερα ηλεκτροχημικά στοιχεία δεν έχουν ομοιόμορφη πυκνότητα ρεύματος σε όλη την περιοχή της διατομής (σχ.9). Όπως θα δούμε παρακάτω είναι πιο λογικό να χρησιμοποιούμε τις μονάδες $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (που εμφανίζει την εμπέδηση κανονικοποιημένη στη μονάδα της διατομής), αφού για χρήση άλλης διάταξης με διπλάσια διατομή δεν θα έχουμε υποδιπλασιασμό της εμπέδησης. Το μεγάλο πρόβλημα στον υπολογισμό της αντίστασης διαλύματος έγκειται στον καθορισμό της πορείας που θα ακολουθήσει το ρεύμα και στη γεωμετρία του ηλεκτρολυτικού διαλύματος.



Σχ.9. FEM μοντέλο του ηλεκτρικού πεδίου σε διάταξη TEEI. (Τα κόκκινα βέλη αναπαριστούν την κατεύθυνση του πεδίου, ενώ τα χρώματα την έντασή του σε V/m. Πάνω και κάτω είναι τα δισκοειδή επίπεδα ηλεκτρόδια.)

(L. Cacopardo et al., COMSOL Multiphysics 4.3b (Stockholm, Sweden))

Πυκνωτής διπλού στρώματος

Ένα ηλεκτρικό διπλό στρώμα υπάρχει στην επαφή μεταξύ ενός ηλεκτροδίου και του γύρω ηλεκτρολύτη. Αυτό το διπλό στρώμα σχηματίζεται όταν ιόντα από το διάλυμα προσροφώνται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Μεταξύ όμως του φορτισμένου ηλεκτροδίου και των ιόντων βρίσκεται ένας μονωτικός χώρος, συνήθως μήκους μερικών Angstrom. Όπως θα αναφερθεί αναλυτικότερα στη συνέχεια, όταν φορτία χωρίζονται από ένα μονωτή σχηματίζεται πυκνωτής, άρα ένα μέταλλο βυθισμένο σε ηλεκτρολύτη θα έχει και ιδιότητες πυκνωτή. Μπορεί να υπολογιστεί ότι θα υπάρχουν περίπου 20 με 60 μF χωρητικότητας για κάθε cm^2 επιφάνειας ηλεκτροδίου ωστόσο η τιμή της χωρητικότητας διπλού στρώματος εξαρτάται από αρκετές μεταβλητές. Το δυναμικό του ηλεκτροδίου, θερμοκρασία, ιοντικές συγκεντρώσεις, τύποι ιόντων, στρώμα οξειδίου, όλα αποτελούν παράγοντες.

Όπως θα αναφερθεί παρακάτω στην εν.1.4.2, ο πυκνωτής αυτός μπορεί να παραλειφθεί για ικανά υψηλές συχνότητες.

Αντίσταση πόλωσης

Στην περίπτωση που το δυναμικό ενός ηλεκτροδίου απομακρύνεται από την τιμή ανοιχτού κυκλώματος, αυτό «πολώνεται». Όταν το ηλεκτρόδιο πολώνεται, μπορεί να προκαλέσει ροή ρεύματος μέσω ηλεκτροχημικών αντιδράσεων που γίνονται στην επιφάνειά του. Η ποσότητα ρεύματος εξαρτάται από την κινητική των αντιδράσεων και τη διάχυση¹ των αντιδρώντων προς και από την επιφάνεια.

Σε στοιχεία όπου σε ένα ηλεκτρόδιο αναπτύσσεται ομοιόμορφη διάβρωση (/αντίδραση όπως σε μπαταρίες) σε ανοιχτό κύκλωμα, το δυναμικό ανοιχτού κυκλώματος ελέγχεται από την ισορροπία μεταξύ δύο διαφορετικών ηλεκτροχημικών αντιδράσεων. Η μία αντίδραση δημιουργεί καθοδικό ρεύμα και η άλλη ανοδικό ρεύμα. Το δυναμικό ανοιχτού κυκλώματος ισοσταθμίζεται όπου τα ανοδικά και καθοδικά ρεύματα είναι ίσα. Αυτό ονομάζεται «μεικτό δυναμικό». Αν το ηλεκτρόδιο διαβρώνεται (αντιδρά) ενεργά, η τιμή του ίσου ρεύματος για καθεμιά από τις αντιδράσεις είναι γνωστή ως ρεύμα διάβρωσης.

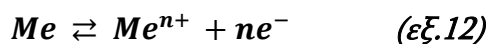
Χωρίς να εμβαθύνουμε περαιτέρω, η αντίσταση πόλωσης R_p δρά περιοριστικά στο ρεύμα διάβρωσης.

Αντίσταση μεταφοράς φορτίου

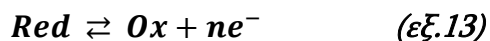
Μια παρόμοια αντίσταση σχηματίζεται από μια απλή κινητικά ελεγχόμενη ηλεκτροχημική αντίδραση. Σε αυτήν την περίπτωση δεν έχουμε «μεικτό δυναμικό», αλλά μια ηλεκτροχημική αντίδραση σε ισορροπία.

Ας θεωρήσουμε ένα μέταλλο σε επαφή με ηλεκτρολύτη. Το μέταλλο μπορεί να διαλυθεί στον ηλεκτρολύτη, σύμφωνα με την

¹ Γενικά, στη Φυσικοχημεία διάχυση, ή παθητική μεταφορά, χαρακτηρίζεται η τάση των μορίων μιας ουσίας να διασπείρονται από περιοχές υψηλότερης συγκέντρωσης προς τις περιοχές μικρότερης συγκέντρωσης [58]. Η τάση αυτή εκδηλώνεται με αντίστοιχη μετακίνηση των μορίων. Αυτό σημαίνει πως η μετακίνηση των μορίων γίνεται και προς τις δύο κατευθύνσεις, με μεγαλύτερο ρυθμό από την περιοχή της υψηλότερης συγκέντρωσης. Κάποια στιγμή οι συγκεντρώσεις εξισώνονται, που όμως δεν εμποδίζει τη μετακίνηση των μορίων που συνεχίζεται, αυτή τη φορά, με σταθερό ρυθμό



Ή γενικά,



Στην προς-τα-δεξιά αντίδραση, ηλεκτρόνια εισέρχονται στο μέταλλο και ιόντα διαχέονται στον ηλεκτρολύτη, οπότε μεταφέρεται φορτίο. Η αντίδραση μεταφοράς φορτίου έχει ορισμένη ταχύτητα. Η ταχύτητα εξαρτάται από το είδος της αντίδρασης, τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση των αντιδρώντων και το δυναμικό. Η αντίσταση μεταφοράς φορτίου δίνεται από τη σχέση

$$R_{ct} = \frac{RT}{nFi_0} \quad (\epsilon\xi.14)$$

Όπου I_0 το ρεύμα της αντίδρασης, n ο αριθμός των ελεύθερων ηλεκτρονίων, R η σταθερά των αερίων, T η θερμοκρασία και F η σταθερά Faraday.

Στοιχείο σταθερής φάσης (CPE)

Το στοιχείο σταθερής φάσης (constant phase element) αναπαριστά έναν πυκνωτή που δε συμπεριφέρεται ιδανικά, αλλά έχει αντίσταση διαρροής (leaky capacitor). Το φαινόμενο είναι πολύ συνηθισμένο στη ΦΕ και περιγράφεται από την εξίσωση:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{(j\omega)^p \cdot T} \quad (\epsilon\xi.15)$$

Όπου p είναι ο εκθέτης του CPE ($0 < p \leq 1$) και T ο συντελεστής του CPE.

Η περίπτωση $p=0$ περιγράφει ιδανικό αντιστάτη, ενώ η $p=1$ ιδανικό πυκνωτή. Η φάση του στοιχείου είναι $-(90 \cdot p)^\circ$.

Τα CPE δεν χρησιμοποιούνται συχνά στην ηλεκτροφυσιολογία για να αναπαραστήσουν τη χωρητικότητα των κυτταρικών μεμβρανών, ωστόσο ίσως χρειαστούν κατά την εύρεση παραμέτρων από μαθηματικό μοντέλο [60].

Εμπέδηση Warburg

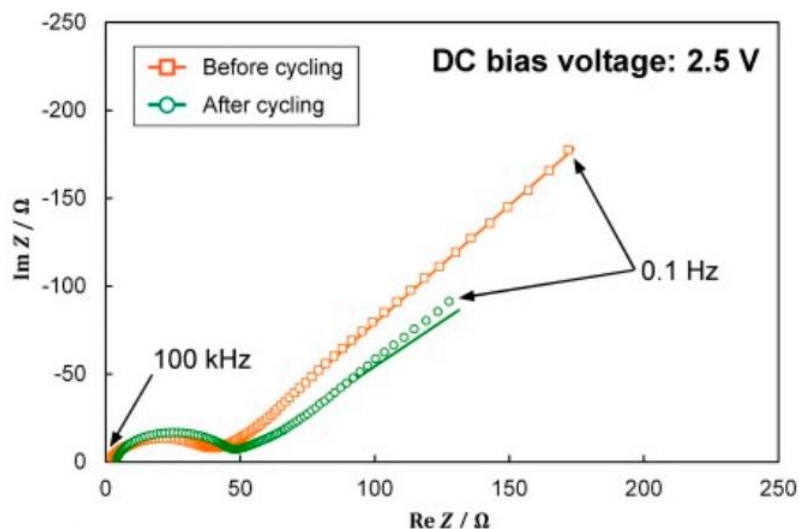
Η διάχυση μπορεί επίσης να δημιουργήσει μια εμπέδηση που λέγεται εμπέδηση Warburg. Αυτή εξαρτάται από τη συχνότητα του σήματος διέγερσης. Σε υψηλές συχνότητες η εμπέδηση Warburg είναι μικρή μιας και τα αντιδρώντα δεν χρειάζεται να μετακινηθούν μακριά. Σε χαμηλές συχνότητες συμβαίνει το αντίθετο.

Η εμπέδηση του στοιχείου είναι

$$W_Z = \frac{(1-j)a}{\sqrt{\omega}} \quad (\epsilon\xi.16)$$

Όπου a μια σταθερά που εξαρτάται από τη διάχυση και ω η συχνότητα σε rad/s.

Σε ένα διάγραμμα Nyquist η εμπέδηση Warburg εμφανίζεται σαν μια γραμμή κλίσης 45° (σχ.10) [59]. Σε ένα διάγραμμα Bode εμφανίζει καθυστέρηση φάσης 45°. Γίνεται εμφανές από την εξίσωση πως η εμπέδηση Warburg δεν είναι παρά ένα CPE με $p=0.5$.



Σχ.10. Διάγραμμα Nyquist για ΦΕ σε μπαταρία λιθίου. Στις χαμηλές συχνότητες το στοιχείο Warburg προκαλεί την κλίση 45°. (Abe, Y et al.)

Χωρητικότητα επίστρωσης

Ένας πυκνωτής σχηματίζεται όταν δύο αγώγιμες πλάκες διαχωρίζονται από μονωτικό στρώμα, δηλαδή διηλεκτρικό. Η τιμή της χωρητικότητας εξαρτάται από το μέγεθος των πλακών, την απόσταση μεταξύ των πλακών και τις ιδιότητες του διηλεκτρικού. Η σχέση είναι,

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{d} \quad (\text{εξ.17})$$

Όπου ϵ_0 η διηλεκτρική διαπερατότητα του κενού, ϵ_r η σχετική διηλεκτρική διαπερατότητα, A η επιφάνεια των πλακών, d η απόσταση μεταξύ τους.

Η ϵ_r εξαρτάται από το υλικό και παρακάτω παρατίθενται μερικές χαρακτηριστικές τιμές.

Υλικό	ϵ_r
Κενό	1
Απεσταγμένο Νερό	80.1(20°C)
Οργανική επίστρωση	4-8

Πίνακας 1. ϵ_r για διάφορα υλικά. (Gamry instruments)

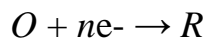
Η διαφορά μεταξύ του νερού και της οργανικής επίστρωσης είναι πολύ μεγάλη. Σε ΦΕ για διάβρωση σε μέταλλα η χωρητικότητα της επίστρωσης αλλάζει όσο απορροφά νερό. Η ΦΕ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μετρηθεί η αλλαγή αυτή.

Αυτεπαγωγή

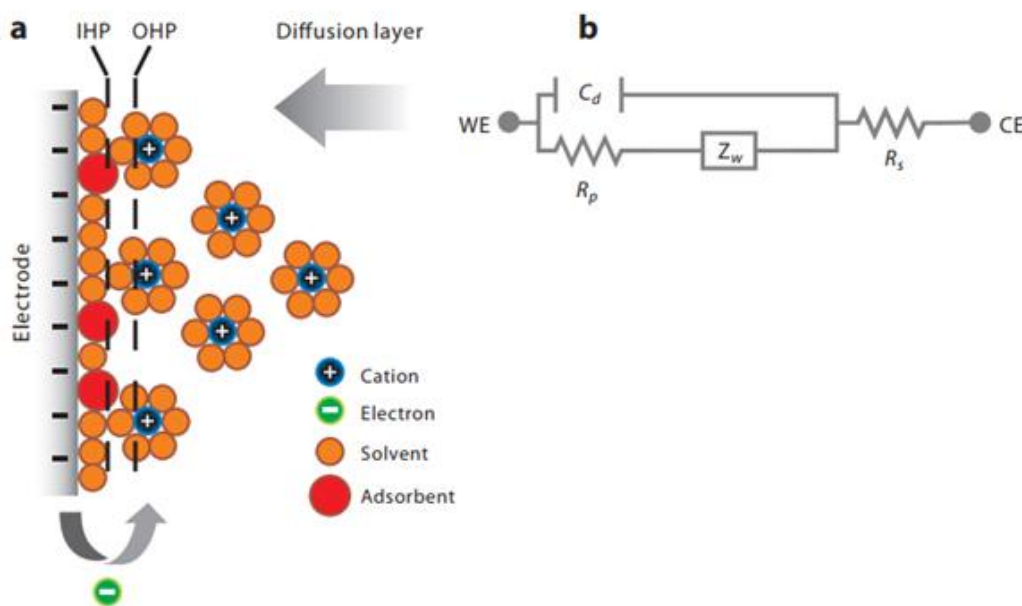
Η εμπέδηση του ηλεκτροχημικού στοιχείου μπορεί κάποιες φορές να περιέχει αυτεπαγωγή. Κάποιοι ερευνητές αποδίδουν την αυτεπαγωγή αυτή σε σχηματισμούς επιφανειακών στρωμάτων. Άλλοι την αποδίδουν σε παρασιτικά φαινόμενα από τον ίδιο τον εξοπλισμό μέτρησης.

Στοιχείο σε λειτουργία και ισοδύναμο Randles

Όπως είδαμε παραπάνω, το ρεύμα που ρέει σε μια συνδεδεμένη ηλεκτρικά επαφή λόγω μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης εκφράζεται από την



Αυτό το ρεύμα πάντα περιέχει μη-φαρνανταϊκές συνιστώσες. Σε αυτήν την εξίσωση, n είναι ο αριθμός των ηλεκτρονίων που μεταφέρθηκαν, O είναι ο οξειδωτής, και R είναι το αναγόμενο προϊόν. Εδώ να σημειωθεί ότι φαρνανταϊκή συνιστώσα νοείται το ρεύμα από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που γίνονται λόγω αλληλεπίδρασης του ηλεκτροδίου με το διάλυμα. Το ισοδύναμο είναι ένα δικτύωμα Randles που μπορεί να περιέχει κάποιες τροποποιήσεις.



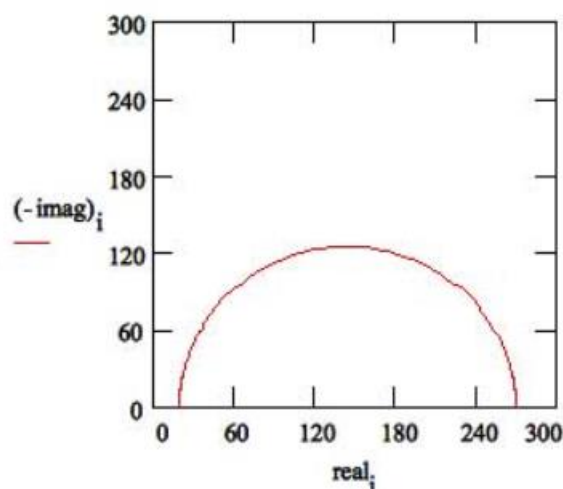
Σχ.11. a) Στο αριστερό σχήμα είναι μια διεπαφή όπου το ηλεκτρόδιο είναι αρνητικά φορτισμένο. Κατιόντα έχουν παραταχθεί κατά μήκος της επιφάνειας.

b) Το ισοδύναμο ΗΙΚ για τη διεπαφή, όπου κάθε μέρος της αντίδρασης αναπαρίσταται από ένα ηλεκτρικό στοιχείο. C_d : πυκνωτής διπλού στρώματος, CE : counterelectrode, IHP : εσωτερικό επίπεδο Helmholtz, OHP : εξωτερικό επίπεδο Helmholtz, R_p : αντίσταση πόλωσης, R_s : αντίσταση διαλύματος, WE : working electrode, Z_W : εμπέδηση Warburg. (Chang et al., 2010)

Το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται μέσω μιας συνδεδεμένης επαφής όπως δείχνεται στο **σχ. 11**. Η μεταφορά φορτίου οδηγεί τόσο σε φαρανταϊκές όσο και σε μη-φαρανταϊκές συνιστώσες. Η φαρανταϊκή συνιστώσα προκύπτει από τη μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω της παραπάνω αντίδρασης διαμέσου της διεπαφής με την υπέρβαση ενός κατάλληλου φραγμού ενεργοποίησης, δηλαδή της αντίστασης πόλωσης (R_p), μαζί με την αντίσταση διαλύματος (R_s). Το μη φαρανταϊκό ρεύμα προκύπτει από τη φόρτιση του πυκνωτή διπλού στρώματος (C_d). Ο πυκνωτής διπλού στρώματος όπως προαναφέρθηκε είναι το ηλεκτρικό αποτέλεσμα του διπλού στρώματος (Double Layer, DL) που δημιουργείται όταν ένα ηλεκτρόδιο είναι σε επαφή με έναν ηλεκτρολύτη. Το διηλεκτρικό αυτού του στοιχειώδους πυκνωτή λέγεται εσωτερικό επίπεδο Helmholtz (Inner Helmholtz plane, IHP). Ο πυκνωτής αυτός μπορεί να έχει μήκος νανομέτρων. Όταν η μεταφορά φορτίου λαμβάνει χώρα στη διεπαφή, οι μαζικές μεταφορές των αντιδρώντων και προϊόντων λαμβάνουν ρόλους στον καθορισμό του ρυθμού μεταφοράς ηλεκτρονίων, ο οποίος εξαρτάται από την κατανάλωση των οξειδωτών και την παραγωγή του αναγωγικού παράγοντα κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Το ΗΙΚ στο **σχ. 13α** δείχνει ότι κάθε στοιχείο κυκλώματος αντιστοιχεί σε κάποια χημική συνιστώσα. Εδώ τα στοιχεία αντιστοιχίζονται με το ισοδύναμο στην ίδια σειρά. Το ΗΙΚ που πρότεινε για πρώτη φορά ο Randles [45], που αρχικά δείχνεται στο **σχ.2** και με μία τροποποίηση στο **σχ.11b**, εμφανίζει τόσο τα στοιχεία που αφορούν μετρήσεις υψηλής συχνότητας (π.χ. R_s), όσο και τα στοιχεία που αφορούν μετρήσεις χαμηλής συχνότητας (π.χ., ZW) από δεξιά προς τα αριστερά.

Το απλό Randles (**σχ.7**) είναι ένα από τα πιο συνήθη μοντέλα στοιχείου. Περιλαμβάνει την αντίσταση διαλύματος R_s , τον πυκνωτή διπλού στρώματος και μια αντίσταση μεταφοράς φορτίου (ή πόλωσης). Η χωρητικότητα διπλού στρώματος είναι παράλληλα με την αντίσταση μεταφοράς φορτίου. Εκτός του ότι είναι χρήσιμο μοντέλο αυτούσιο, το απλοποιημένο Randles είναι το εναρκτήριο σημείο για πιο σύνθετα μοντέλα.

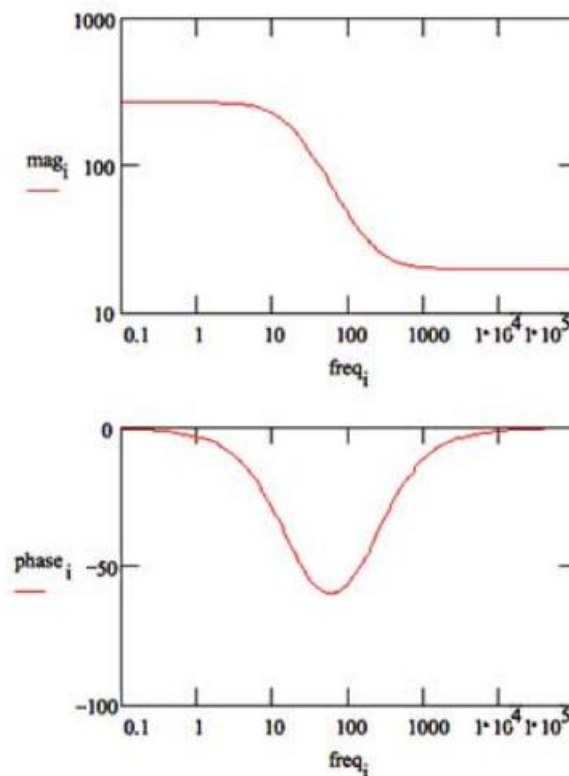
Το **σχ.12** είναι το διάγραμμα Nyquist για το συγκεκριμένο δικτύωμα. Έχει παρθεί μεγαλύτερο εύρος συχνοτήτων απ' ό τι το **σχ.5**. Προέρχεται από πείραμα διάβρωσης μετάλλου σε υγρό. Η R_p είναι 250Ω, η C_d 40μF και η R_s 20Ω.



Σχ.12. Διάγραμμα Nyquist για απλό Randles με $R_p=250\Omega$, $C_d=40\mu F$ και $R_s=20\Omega$. (Gamry instruments)

Ας σημειωθεί εδώ ότι το **σχ.12** έχει τις θετικές συχνότητες και τις αρνητικές τιμές φανταστικής συνιστώσας στο πάνω ημιεπίπεδο, αντίθετα με το **σχ.5**. Το διάγραμμα Nyquist για ένα Randles είναι πάντα ημικύκλιο. Η αντίσταση διαλύματος R_p ευρίσκεται εύκολα διαβάζοντας την τιμή του πραγματικού άξονα στη μέγιστη συχνότητα. Αν η συχνότητα που έχουμε δεν αρκεί για να φτάσουμε στο αριστερό άκρο του ημικυκλίου στο δικό μας πείραμα, θα χρειαστούν μέθοδοι εκτίμησης μεταβλητών όπως παρακάτω. Στην ελάχιστη συχνότητα που απεικονίζεται στη δεξιά μεριά, βρίσκουμε το άθροισμα των R_p και R_s (270Ω). Η διάμετρος του ημικυκλίου είναι ίση με R_p (250Ω).

Το διάγραμμα bode για το ίδιο δικτύωμα δίνεται στο **σχ.13**.



Σχ.13. Διάγραμμα bode για απλό Randles με $R_p=250\Omega$, $C_d=40\mu F$ και $R_s=20\Omega$. (Gamry instruments)

Εξαγωγή παραμέτρων από δεδομένα

Σε περίπτωση που κριθεί σκόπιμη η εξαγωγή των παραμέτρων από ένα σύνολο δεδομένων, αυτό είναι εφικτό με τη μέθοδο της στατιστικής **παλινδρόμησης (regression)**. Ο τύπος των ηλεκτρονικών στοιχείων στο μοντέλο όπως προαναφέρθηκε ελέγχουν το σχήμα της απόκρισης συχνότητας του μοντέλου. Οι παράμετροι όπως η R_p ελέγχουν το μέγεθος κάθε τιμής στο μέρος του φάσματος που επηρεάζουν. Αμφότεροι οι παράγοντες αυτοί (τύπος και τιμή) θα επηρεάσουν το ταίριασμα των μετρούμενων τιμών του εκάστοτε πειράματος σ' ένα μοντέλο.

Σε ένα φυσικό μοντέλο, κάθε στοιχείο υποτίθεται ότι προέρχεται από μια φυσική διεργασία του συστήματος. Όλα τα μοντέλα που είδαμε πριν είναι φυσικά μοντέλα. Η επιλογή ποιου θα χρησιμοποιήσουμε εξαρτάται από τα φυσικά χαρακτηριστικά του συστήματος. Έμπειροι αναλυτές μπορούν να βρουν ποιο μοντέλο είναι το κατάλληλο λαμβάνοντας υπόψιν και την απόκριση συχνότητας του συστήματος.

Τα μοντέλα μπορούν επίσης να είναι μερικώς εμπειρικά. Τα στοιχεία του δικτύωματος σε ένα τέτοιο μοντέλο δεν ανταποκρίνονται αναγκαστικά σε φυσικές διεργασίες του συστήματος. Τέτοιο μοντέλο μπορεί να επιλεγεί επειδή δίνει το καλύτερο δυνατό ταίριασμα μεταξύ του μοντέλου και του πραγματικού συστήματος.

Ένα εμπειρικό μοντέλο μπορεί να φτιαχτεί όταν παραλείπονται εμπεδήσεις συγκεκριμένων ηλεκτρονικών στοιχείων από μια απόκριση συχνότητας οδηγώντας έτσι στην απλοποίηση του αναφερόμενου μοντέλου. Αν η αφαίρεση ενός στοιχείου απλοποιεί την απόκριση (λ.χ. ένας πυκνωτής που απαλείφει τη μετατόπιση φάσης), το στοιχείο προστίθεται στο μοντέλο, και ούτω καθεξής. Η διαδικασία περατώνεται όταν το φάσμα εξαφανιστεί τελείως.

Τα φυσικά μοντέλα γενικά προτιμώνται όπου είναι αυτό δυνατόν.

Μη-γραμμική προσαρμογή ελαχίστων τετραγώνων(NLLSF)

Η σύγχρονη ανάλυση για εξαγωγή παραμέτρων ΦΕ χρησιμοποιεί υπολογιστή για να βρει τις παραμέτρους του μοντέλου που δίνουν την καλύτερη προσαρμογή μεταξύ της απόκρισης συχνότητας του συστήματος και του μοντέλου (curve-fitting).

Ένας αλγόριθμος παλινδρόμησης μη-γραμμικών ελαχίστων τετραγώνων χρησιμοποιείται κατά κόρον, καθώς η συνάρτηση μεταφοράς δεν θα είναι γραμμική για αυτά τα δικτυώματα:

$$\frac{j\omega R_1 C R_2 + R_1 + R_2}{j\omega C R_2 + 1} \quad (\epsilon\xi.18)$$

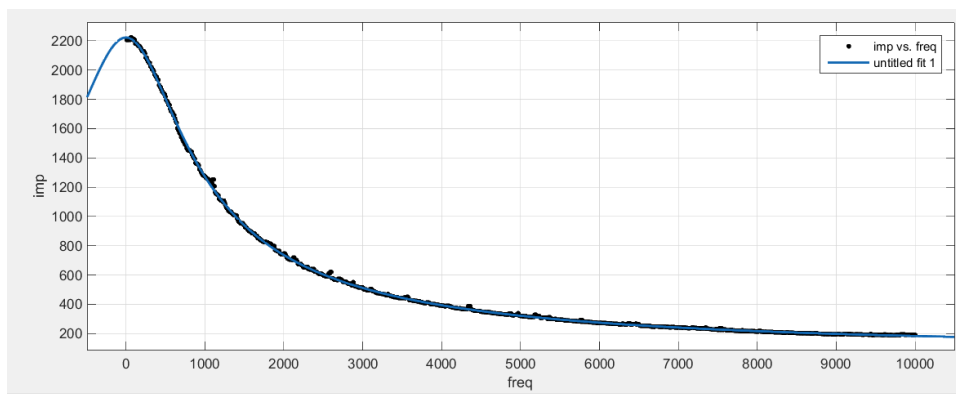
Το NLLSF ξεκινά με αρχικές τιμές για τις παραμέτρους του μοντέλου. Έπειτα ο αλγόριθμος μεταβάλλει μία-μία τις παραμέτρους για να βρει τις σωστές τιμές. Αν μια αλλαγή βελτιώνει το ταίριασμα, γίνεται δεκτή. Αν όχι, συγκρατείται η παλιά παράμετρος. Έπειτα ο αλγόριθμος αλλάζει κάποια άλλη παράμετρο και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Οι δοκιμές συνεχίζονται έως ότου η απόκλιση του μοντέλου φτάσει ένα κατώφλι αποδοχής ή έως ότου το μέγιστο όριο δοκιμών ξεπεραστεί.

Οι αλγόριθμοι NLSS δεν είναι τέλειοι και κάποιες φορές δεν συγκλίνουν. Αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφόρων παραγόντων όπως:

- i) Λάθος επιλογή μοντέλου.
- ii) Άστοχες αρχικές τιμές.
- iii) Θόρυβος ή πολύ λίγες μετρήσεις.
- iv) Ανεπαρκές βήμα μεταβολής των μεταβλητών ή ανίσχυρος υπολογιστής εκτέλεσης του αλγορίθμου.

Επιπροσθέτως η προσαρμογή από έναν αλγόριθμο μπορεί να φανεί λανθασμένη όταν συγκριθεί με την απόκριση συχνότητας. Ίσως φανεί σαν να αγνοεί μέρος του

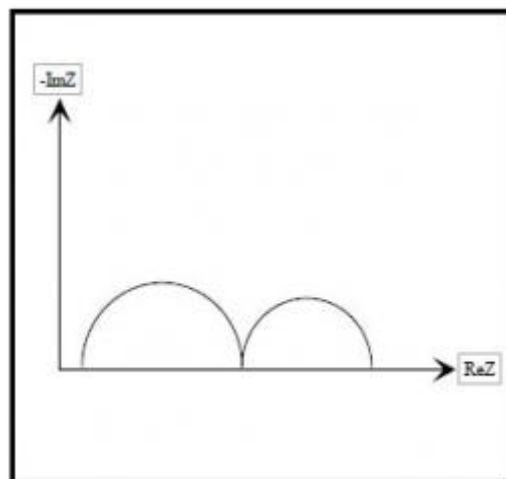
φάσματος. Στην ουσία αυτό συμβαίνει γιατί ο αλγόριθμος βελτιστοποιεί την προσαρμογή για ολόκληρο το φάσμα. Ενδέχεται σε κάποια σημεία να σφάλει, πράγμα που μπορεί να καταδεικνύει αλλαγή του χρησιμοποιούμενου μοντέλου.



Σχ.14. Παράδειγμα χρήσης MATLAB για υλοποίηση NLLSF. Τα μαύρα σημεία είναι τα πειραματικά αποτελέσματα ενώ η μπλε καμπύλη που τα προσεγγίζει είναι η εκτιμώμενη καμπύλη.

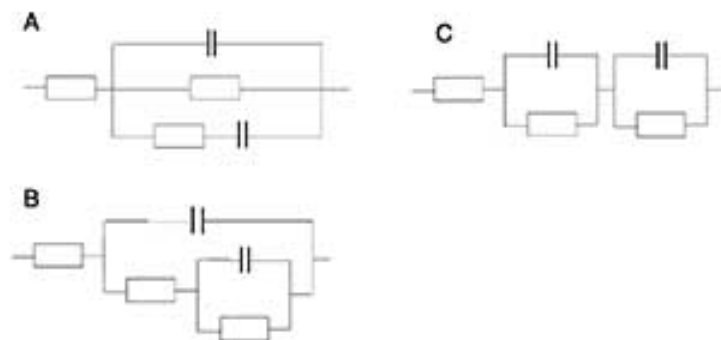
Πολλαπλά μοντέλα

Το φάσμα Nyquist του **σχ.15** δείχνει δύο διαφορετικές σταθερές χρόνου.



Σχ.15. Διάγραμμα Nyquist με 2 σταθερές χρόνου. (Gamry instruments)

Αυτό το φάσμα μπορεί να μοντελοποιηθεί από τα παρακάτω ισοδύναμα δικτυώματα (σχ.16).



Σχ.16. Δικτυώματα που μπορούν να αναπαριστούν το διάγραμμα του σχ.15. (Gamry instruments)

Όπως είναι προφανές, δεν υπάρχει μοναδικό ισοδύναμο που να περιγράφει το φάσμα. Συνεπώς δεν γίνεται να υποθέσουμε ότι ένα ισοδύναμο που παρουσιάζει καλή προσαρμογή δεδομένων αναπαριστά ένα ακριβές φυσικό μοντέλο του συστήματος.

Όποτε είναι δυνατόν, το φυσικό μοντέλο πρέπει να διασταυρώνεται πριν χρησιμοποιηθεί. Ένας τρόπος να γίνει αυτό είναι να αλλάξουμε κάποιο στοιχείο του συστήματος, λ.χ. αύξηση πάχους ενός στρώματος, με στόχο να δούμε τις αναμενόμενες αλλαγές στο φάσμα.

Τα εμπειρικά μοντέλα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με ακόμα περισσότερη προσοχή. Πάντα μπορούμε να πάρουμε μια καλύτερη προσαρμογή προσθέτοντας κι άλλα στοιχεία στο μοντέλο. Δυστυχώς όμως, αυτά τα στοιχεία μπορεί να μην έχουν σχέση με τις διεργασίες του υπό μελέτη συστήματος. Τα εμπειρικά μοντέλα άρα θα πρέπει να χρησιμοποιούν τον ελάχιστο δυνατό αριθμό στοιχείων.

Ανάλυση Kramers-Kronig:

Οι σχέσεις K-K (Kramers-Kronig) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση των δεδομένων. Οι σχέσεις K-K απαιτούν τα αιτιατά δεδομένα του μιγαδικού επιπέδου να δείχνουν σύνδεση μεταξύ πλάτους και φάσης. Το πραγματικό μέρος ενός φάσματος μπορεί να εξαχθεί από την ολοκλήρωση του φανταστικού και αντίστροφα.

Οι σχέσεις K-K ισχύουν πάντα για δεδομένα ΦΕ που είναι γραμμικά, αιτιατά και σε σταθερή κατάσταση. Αν τα μετρούμενα πραγματικά και φανταστικά μέρη δεν συσχετίζονται με τις σχέσεις K-K, τα δεδομένα παραβιάζουν κάποια από τις συνθήκες αυτές.

Δυστυχώς, ο μετασχηματισμός K-K απαιτεί ολοκλήρωση για μεγάλο εύρος συχνοτήτων από το 0 έως το άπειρο. Δεδομένου ότι δεν είναι δυνατό να μετρηθούν δεδομένα σε αυτό το εύρος, η εκτίμηση των μετασχηματισμών K-K πάντα περιέχει υποθέσεις για τη συμπεριφορά του φάσματος πέρα από το μετρούμενο.

Στην πράξη, η ανάλυση K-K γίνεται προσαρμόζοντας ένα μοντέλο σε φασματικές μετρήσεις. Οι Boukamp et al. [61] πρότειναν έναν τρόπο για να γίνεται η ανάλυση μέσω γραμμικών εξισώσεων, αποκλείοντας όποια θέματα μη-σύγκλισης.

2. Παλιοί και νέοι τρόποι υλοποίησης ΦΕ

Όπως περιγράφει ο Macdonald [11], στις αρχές του 20ου αιώνα διεξήχθησαν πειράματα ΦΕ κυρίως για τη μέτρηση της χωρητικότητας ενός ιδανικά πολωμένου ηλεκτροδίου όπως ο υδράργυρος. Οι μετρήσεις του πλήρους φάσματος δεν έγιναν μέχρι τη δεκαετία του 1970, που η χρήση αξιόπιστων ποτενσιοστατών είχε γίνει ευρέως διαδεδομένη. Από τις διάφορες μεθόδους μέτρησης εμπέδησης, ο αναλυτής απόκρισης συχνότητας (FRA) έχει γίνει *de facto* πρότυπο για εφαρμογές σε υλικά. Ο FRA είναι μια μονοφασική μέθοδος στην οποία συνδυάζεται ένα μικρό κύμα AC 5 έως 15 mV μίας δεδομένης συχνότητας με ένα επιθυμητό δυναμικό πόλωσης DC και εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας (Working electrode, WE, όπως αναφέρεται στη συνέχεια, στην ενότητα Ηλεκτρόδια μέτρησης). Αρχικά πραγματοποιείται μια μέτρηση ρεύματος σε κατάσταση AC. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται με σάρωση του φάσματος και υπολογισμός των τιμών της εμπέδησης από τα δεδομένα εναλλασσόμενου ρεύματος σε επιθυμητές συχνότητες και DC ρεύματος ταυτόχρονα, τυπικά από πέντε έως δέκα μετρήσεις για κάθε δεκάδα συχνοτήτων. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη την εν.1.1, αυτή η μέθοδος είναι εφαρμόσιμη μόνο σε ένα σταθερό και αναστρέψιμο σύστημα σε ισορροπία, καθώς πρέπει να διασφαλιστεί η γραμμικότητα, η σταθερότητα και η αιτιότητα του συστήματος [45]. Σημειώνεται πως ένα σύστημα είναι αιτιατό αν οι μεταβολές στην έξοδο (αποτέλεσμα) του συστήματος, ποτέ δεν προηγούνται των μεταβολών που επιτελούνται στην είσοδο του συστήματος (αιτία). Οι πρώτοι ερευνητές αμφισβήτησαν την εγκυρότητα των μετρήσεων της σύνθετης αντίστασης και προσδοκούσαν να πραγματοποιηθούν στιγμιαίες μετρήσεις σύνθετης αντίστασης για μη σταθερά συστήματα. Οι Stoynov & Savona-Stoynov [46] δημοσίευσαν μαθηματικές εκφράσεις για να εξαγάγουν στιγμιαίες τιμές εμπέδησης για μη σταθερά συστήματα. Τα προβλήματα με αυτήν την προσέγγιση προκύπτουν κυρίως από τη σχετικά μεγάλη διάρκεια χρόνου απόκτησης δεδομένων που κάποιες φορές απαιτείται για τη μέθοδο FRA μονού ημιτόνου.

Στις προσπάθειες να μειωθεί ο χρόνος μέτρησης, οι ερευνητές πρότειναν μεθόδους στις οποίες δεν χρησιμοποιείται σάρωση συχνότητας. Οι Smith et al. [15] χρησιμοποίησαν τη μέθοδο γρήγορου μετασχηματισμού Fourier (FFT) μετά την εφαρμογή ενός σήματος θορύβου, το οποίο επιτεύχθηκε με την ανάμιξη τάσεων εναλλασσόμενου ρεύματος διαφόρων συχνοτήτων και εφαρμογή σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο. Οι αντίστροφοι συντελεστές υπολογίστηκαν στη συνέχεια από τις τάσεις και τα ρεύματα. Αυτή ονομάζεται τεχνική πρώτης γενιάς της μεθόδου EIS μετασχηματισμού Fourier (1-FTEIS). Πρόσφατα, οι Popkiron & Schindler [16] απλοποίησαν αυτήν την τεχνική και τη χρησιμοποίησαν σε ένα φασματόμετρο EIS με χρήση σήματος θορύβου που λαμβάνεται με ανάμιξη 42 κατάλληλων συχνοτήτων. Όταν το όριο χαμηλής συχνότητας του ρεύματος είναι αρκετά υψηλό στα 10 Hz, για παράδειγμα, χρειάζεται περίπου 0,1 s για να αποκτηθεί ένα πλήρες φάσμα, αν και ο αριθμός των δεδομένων δειγμάτων είναι περιορισμένος.

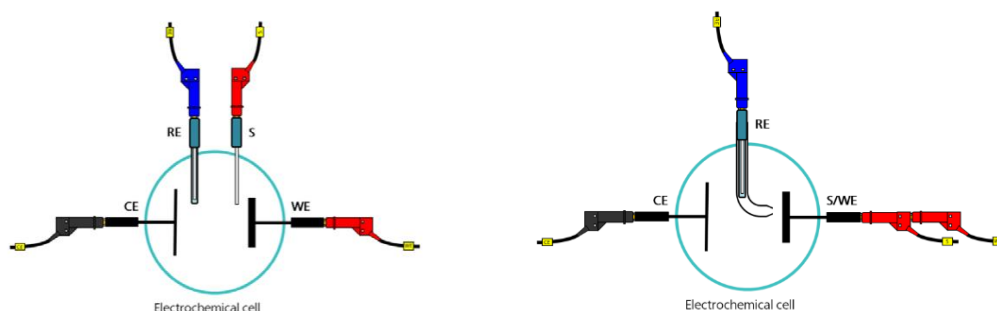
Οι Park et al. [12] ανέπτυξαν μια προσέγγιση που ήταν εντελώς διαφορετική από εκείνη που είχε χρησιμοποιηθεί μέχρι στιγμής. Στα πειράματά τους, ένα μικρό βηματικό σήμα, αντί για μικτά ημιτονοειδή κύματα, εφαρμόστηκε σε ένα ηλεκτρόδιο εργασίας σε μια

δεδομένη τάση πόλωσης DC και καταγράφηκε το προκύπτον ρεύμα. Το σήμα βαθμίδας είναι μια ολοκληρωμένη μορφή της συνάρτησης Dirac, η οποία προκύπτει από το άθροισμα των τάσεων όλων των συχνοτήτων. Σε αυτήν τη διαδικασία, παράγονται σήματα τόσο από το βήμα τάσης, όσο και από τα καταγεγραμμένα σήματα ρεύματος. Επιπρόσθετα αναλύθηκαν οι τάσεις AC, και τα ρεύματα αναλύθηκαν στο πεδίο συχνοτήτων με τη μέθοδο FFT. Η σύνθετη αντίσταση στην επιθυμητή συχνότητα ελήφθη διαιρώντας μια τάση εναλλασσόμενου ρεύματος σε αυτήν τη συχνότητα με το ρεύμα στην ίδια συχνότητα. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε ένα πλήρες φάσμα εμπέδησης επαναλαμβάνοντας τον υπολογισμό σε όλο το εύρος συχνοτήτων. Θεωρούμε αυτήν την τεχνική δεύτερης γενιάς EIS μετασχηματισμού Fourier (2-FTEIS). Ο πραγματικός λευκός θόρυβος (δ) που περιέχει κύματα AC όλων των συχνοτήτων χρησιμοποιείται ως σήμα διέγερσης, όπως και στην υπέρυθη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier ή σε πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Να σημειωθεί ότι όσον αφορά τις δύο τελευταίες μεθόδους, για να ληφθούν πολλά δείγματα και να γίνει επεξεργασία σε σύντομο χρόνο απαιτούνται συστήματα με μεγάλη υπολογιστική ισχύ. Όπως θα δούμε και παρακάτω, συμπαγείς λύσεις γι' αυτές τις προσεγγίσεις είναι δύσκολο και ακριβό να υλοποιηθούν.

Τα πρώτα πειράματα χρησιμοποιούσαν κυρίως εξοπλισμό πάγκου εργαστηρίου. LCR μετρητές με αντίσταση σε σειρά για περιορισμό του ρεύματος στην τιμή $\sim 1\mu\text{A}$ έδειχναν ότι η εμπέδηση των κυττάρων άλλαζε με τη συγκέντρωση. Τα όργανα εργαστηρίου συνδέονταν σε δοχεία που περιείχαν επίπεδα ηλεκτρόδια. Ωστόσο η σμίκρυνση των ηλεκτρονικών και η αύξηση των ταχυτήτων σηματοδοτεί στροφή των ερευνητών σε λύσεις με ολοκληρωμένα κυκλώματα. Η σμίκρυνση μπορεί να επιτευχθεί με βάση τη μηχανική ρευστών και τα ηλεκτρονικά. Όσον αφορά τα CMOS ηλεκτρονικά, πλεονεκτούν στην κατανάλωση ισχύος, στην ικανότητα ελέγχου θερμοκρασίας και το μέγεθος της διάταξης. Χρησιμοποιώντας συστήματα όπως DAC για την παραγωγή σημάτων και ADC για ανάγνωση των σημάτων, μπορεί να μειωθεί η κατανάλωση ισχύος, οι διαστάσεις και να επιτευχθούν μικρότερα σφάλματα εξαρτημάτων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η εκτίμηση των Hedayatipour et al. [33] για τους CMOS ολοκληρωμένους αισθητήρες. Εκτιμούν ότι με την πρόοδο των τεχνικών εκτύπωσης, τέτοιοι αισθητήρες θα καταστούν η επόμενη γενιά από πλατφόρμες lab-on-a-chip και micro-total analysis. Όσον αφορά τα τρισδιάστατα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια, αυτά εκτιμάται ότι θα είναι η λύση για καλλιέργεια κυττάρων και μέτρηση των χαρακτηριστικών τους.

Ηλεκτρόδια μέτρησης

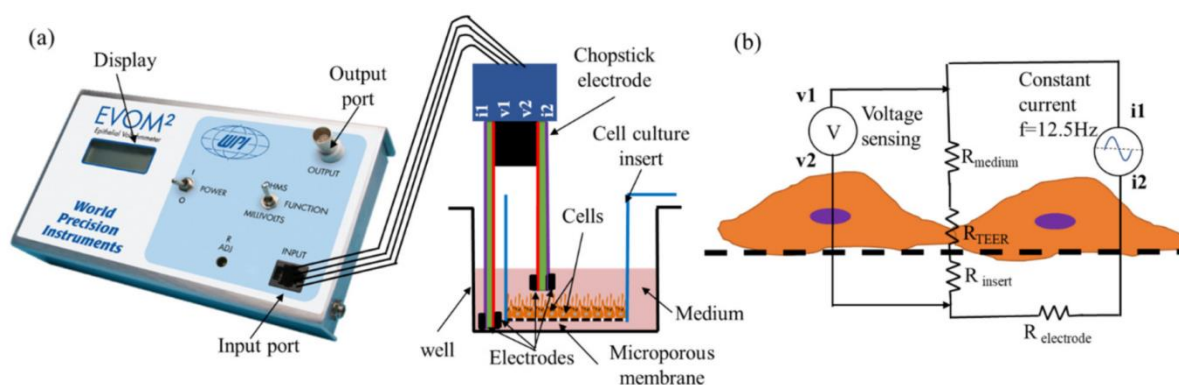
Στη ΦΕ, όσον αφορά τη διάταξη, υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι μέτρησης. Ποτενσιοστατικές και γαλβανοστατικές μετρήσεις [51]. Στην ποτενσιοστατική μέτρηση, το ρεύμα μετράται υπό γνωστή τάση, ενώ στη γαλβανοστατική, η τάση μετράται υπό γνωστό ρεύμα. Σχετικά με τις διατάξεις των ηλεκτροδίων, τυπικές είναι διατάξεις τριών ή τεσσάρων ηλεκτροδίων (σχ.17). Σημειώνεται ότι στην παρούσα εργασία θα χρησιμοποιηθούν 4 ηλεκτρόδια.



Σχ. 17. Μέτρηση με 4 και 3 ηλεκτρόδια. (Autolab Application Note EC08)

Για την περίπτωση του γαλβανοστάτη εφαρμόζεται ρεύμα μεταξύ CE-WE και μετράται τάση μεταξύ RE-S. Για ποτενσιοστάτη εφαρμόζεται τάση μεταξύ CE-WE ώστε η τάση RE-WE να είναι η προκαθορισμένη από τον χρήστη, και μετράται τάση μεταξύ RE-S [51].

Τα συστήματα 2-ηλεκτροδίων χρησιμοποιούνται [62,63], επειδή μπορούν να ενσωματωθούν σε in vitro μοντέλα, όμως έχουν το μειονέκτημα ότι επηρεάζονται από την αντίσταση πόλωσης των ηλεκτροδίων παροχής ρεύματος [64]. Τετραπολικά συστήματα μέτρησης (4-ηλεκτρόδια) ξεπερνούν αυτόν τον περιορισμό. Σε αυτά τα συστήματα, το ρεύμα παρέχεται από ζεύγος ηλεκτροδίων (παροχής) ενώ ένα άλλο ζεύγος (ηλεκτρόδια μέτρησης) μετρά την πτώση τάσης (σχ.17,18). Η μέθοδος αυτή είναι επίσης γνωστή σαν Kelvin.



Σχ.18. TEER γαλβανοστατική μέτρηση χρησιμοποιώντας όργανο EVOM2(World Precision Instruments (WPI), Sarasota, FL, USA) το οποίο λειτουργεί σε συχνότητες $\approx 10\text{Hz}$. a) Μια διάταξη μέτρησης 4-ηλεκτροδίων ενός μονοστρώματος κυττάρων σε

καλλιέργεια transwell. b) Ένα απλοποιημένο ισοδύναμο κύκλωμα που περιγράφει τη μέτρηση. (Raut et al.)

Το όργανο του σχ.18 παρέχει ρεύμα μέσω των ηλεκτροδίων i_1, i_2 και μετρά την τάση μεταξύ των v_1, v_2 για να υπολογίσει την ηλεκτρική αντίσταση που αποτελούν το μονοστρώμα κυττάρων R_{TEER} , το διάλυμα όπου βρίσκονται τα κύτταρα R_{medium} και η μικροπορώδης μεμβράνη R_{insert} , ενώ παραλείπει την εμπέδηση της επαφής του ηλεκτροδίου $R_{electrode}$. Να σημειωθεί ότι σε περίπτωση που η επαφή του ηλεκτροδίου έχει φανταστική συνιστώσα αντίστασης, αυτή φυσικά επηρεάζει τη φάση που μετράται. Για μια διάταξη όπως παραπάνω, η εμπέδηση του διαλύματος και της μεμβράνης υποστήριξης των κυττάρων είναι ανεξάρτητη της συχνότητας [2]. Ωστόσο, η επαφή ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη σχηματίζει μια εμπέδηση πόλωσης η οποία εξαρτάται από τη συχνότητα και επηρεάζει τη μέτρηση του στρώματος κυττάρων. Συμπερασματικά, η εμπέδηση ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη πρέπει να ληφθεί υπόψιν στο μοντέλο του ισοδύναμου κυκλώματος, ή τα ηλεκτρόδια παροχής ρεύματος πρέπει να διαχωριστούν από τα ηλεκτρόδια μέτρησης δυναμικού. Η τελευταία μέθοδος είναι η γαλβανοστατική με 4 ηλεκτρόδια και απαλείφει τη συμβολή της επαφής στη μέτρηση πλάτους[66].

Χρησιμοποιώντας λοιπόν τη γαλβανοστατική με 4 ηλεκτρόδια μέθοδο έχουμε μια διάταξη μέτρησης η οποία είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητη της συχνότητας.

3. Εφαρμογές ΦΕ-Γενικά

Η EIS έχει εφαρμοστεί στη διάβρωση των μετάλλων [17], στην αναστολή της διάβρωσης [18], στην αξιολόγηση των ποσοστών διάβρωσης [19] και στην προστασία από τη διάβρωση στις πολυμερείς επικαλύψεις [20]. Απαιτήσεις υλικών [21] και ο προσδιορισμός ποσοστών διάβρωσης υπό συνθήκες πόλωσης [22] έχουν πρόσφατα μελετηθεί λεπτομερώς. Ένας άλλος τομέας ενδιαφέροντος είναι η μελέτη περίπλοκων ηλεκτροχημικών αντιδράσεων όπως η ηλεκτροχημική σύνθεση αγωγίμων πολυμερών [23] και το προϊόν τους, ο χαρακτηρισμός [24] και η αξιολόγηση διάβρωσης [25].

Σαν μία μη-επεμβατική και χωρίς-ίχνη τεχνική η ΒΙΟ-ΦΕ έχει αναπτυχθεί για μελέτες στη βιολογία και τη βιομηχανία τροφίμων όπως η παρακολούθηση κυττάρων σε πραγματικό χρόνο [67,68] και η αναγνώριση βακτηρίων, με τα πλεονεκτήματα της γρήγορης απόκρισης, χαμηλού κόστους, υψηλής ευαισθησίας, κτλ.

Βασισμένη στις βιοφυσικές διαφορές μεταξύ κανονικών και καρκινικών κυττάρων σε διαφορετικά στάδια παθολογίας [69,70], η ΒΙΟ-ΦΕ εκτιμάται ότι παράγει ενδείξεις για το διαχωρισμό των προβληματικών κυττάρων, και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη χαρακτηριστικών βιο-εμπέδησης, βιολογικών λειτουργιών των κυττάρων και παθολογικών δεδομένων [73].

Η τεχνολογία των μικρορευστομηχανικών συστημάτων (Microfluidics) όπως στο σχ.18 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μελετηθούν στοιχεία κυτταρικής ηλεκτρικής αντίστασης/χωρητικότητας όπως στην παρούσα εργασία [74]. Ωστόσο η απόδοση των διατάξεων εξαρτάται σημαντικά από τη χρήση μικρο-δομών με συγκεκριμένες

γεωμετρικές, προσαρμοσμένες στο μέγεθος των κυττάρων. Οι μικροδομές δεν μπορούν να τροποποιηθούν μετά την παρασκευή τους από συμβατικές τεχνικές μηχανικής. Χάρη στη μη-επεμβατική ιδιότητά τους, τεχνικές που χρησιμοποιούν εναλλασσόμενα ρεύματα και ανομοιόμορφα ηλεκτρικά πεδία δημιουργούνται από μεταλλικά ηλεκτρόδια, όπως η διηλεκτροφόρηση (DEP) [76] και ηλεκτροπεριστροφή [77], είναι πολλά υποσχόμενες [75] και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη μέτρηση ηλεκτρικών παραμέτρων των κυττάρων.

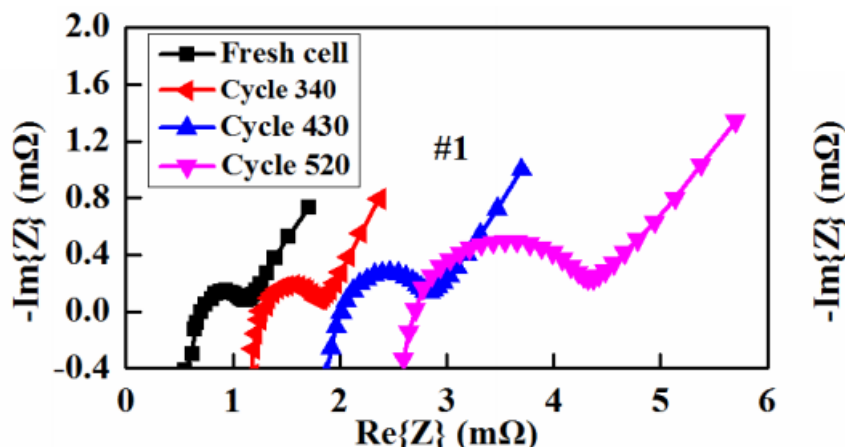
Τα ΗΙΚ που συνήθως λαμβάνονται από τα δεδομένα εμπέδησης μέσω μεθόδων μονού-ημιτόνου ή 1-FTEIS αναπαριστούν στρογγυλοποιημένα αποτελέσματα, πολλές φορές σε αρκετά μεγάλες χρονικές περιόδους [23].

Τα ΗΙΚ που ελήφθησαν σε κάποιες μελέτες με 1-FTEIS βρέθηκαν να είναι σημαντικά διαφορετικά από αυτά που ελήφθησαν με πραγματικές μεθόδους 2-FTEIS [26].

Οι μετρήσεις ΦΕ έχουν επιπροσθέτως διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη φωτοηλεκτροχημεία. Πρόσφατες αναφορές στην περιοχή αυτή αφορούν τη μοντελοποίηση των ΗΙΚ για ηλιακά κύτταρα κατασκευασμένα με βαφές [27], το χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων μεταφοράς ηλεκτρονίων [27], τις ιδιότητες των διασυνδέσεων πολυμερούς και αγωγίων ημιαγωγών [28] και τις συσχετίσεις μεταξύ των επιδόσεων των ηλιακών κυψελών και των αποτελεσμάτων του EIS [29]. Αυτές οι μελέτες EIS έχουν δώσει λύσεις σε δύσκολα προβλήματα όπως (α) η παρεμβολή του Li + σε άνοδο [42] και την κάθοδο [30] των επαναφορτιζόμενων μπαταριών λιθίου και (β) των συμπεριφορών μεταφοράς φορτίου και μάζας του στερεού οξειδίου [31] και μεμβράνης πολυμερούς ηλεκτρολύτη [32] σε κυψέλες καυσίμου.

Η ΦΕ έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για μελέτες σε μπαταρίες λιθίου [80]. Οι μπαταρίες λιθίου παρουσιάζουν αυξανόμενο ενδιαφέρον στον τομέα μεταφορών και ενεργειακών συστημάτων τόσο «πράσινων», όσο και υβριδικών [78,79]. Αυτό οφείλεται τόσο στην υψηλή ενεργειακή πυκνότητα, όσο και τη διάρκεια ζωής τους. Είναι σημαντική η αξιολόγηση της κατάστασης των μπαταριών αυτών, ειδικά της γήρανσης (state of health, SOH), ώστε να αποφευχθούν επικίνδυνες καταστάσεις λειτουργίας και να επεκταθεί η διάρκεια ζωής τους όπως και του συστήματος.

Διαγράμματα Nyquist όπως στο **σχ. 19** δείχνουν την ξεκάθαρη σχέση μεταξύ γήρανσης τέτοιων μπαταριών και της απόκρισης συχνότητάς τους.



Σχ.19. ΦΕ σε μπαταρία λιθίου όπου φαίνεται ξεκάθαρα η αλλαγή της απόκρισης σε διάφορες φάσεις γήρανσης (κύκλους). (Jiuchun et al.)

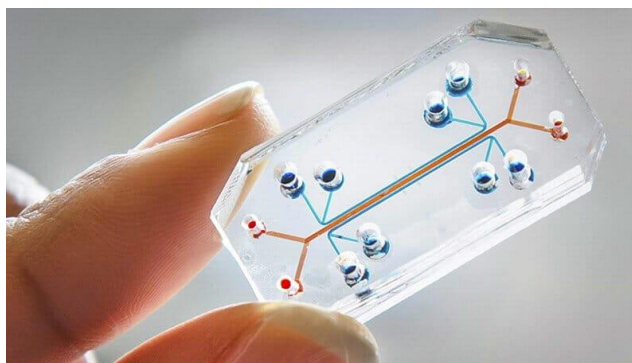
Άλλοι ερευνητές έχουν διαπιστώσει ότι χρησιμοποιώντας μηχανική μάθηση μόλις 1-2 συχνότητες φασματοσκοπίας αρκούν, για να γίνει η ανωτέρω αξιολόγηση [81].

Επιπροσθέτως, ΦΕ μαζί με κυκλική βολταμετρία και άλλες μεθόδους έχουν αποδειχθεί σημαντικές στην αξιολόγηση νέων τεχνολογιών μπαταριών σταθερής κατάστασης [82,83].

4) Φασματοσκοπία εμπέδησης σε βιολογικές εφαρμογές - Βιο-ΦΕ

1. Γενικά - Φυσιολογία μονοστρωμάτων - Φραγμοί

Όλες οι ζωτικές δραστηριότητες, όπως η ανάπτυξη κυττάρων [84], μίτωση [85], μεταφορά [86], απόπτωση [87], η μορφολογία, και οι λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με ενδογενείς πληροφορίες των κυττάρων [89]. Σαν αποτέλεσμα, η καταγραφή τέτοιων πληροφοριών είναι κρίσιμη για τον χαρακτηρισμό της κυτταρικής λειτουργίας αλλά και της κατάστασης ενός ολόκληρου οργανισμού. Γενικά, οι ενδογενείς πληροφορίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για βιοϊατρικές ή εμβιομηχανικές εφαρμογές, όπως η διάγνωση ασθενειών και η φαρμακευτική ανάπτυξη, καρκινική έρευνα, μόλυνση περιβάλλοντος, τεχνολογία τροφίμων, ηλεκτροπώρωση και έρευνα διεπαφής ανθρώπου-μηχανής και μπορούν να καταγραφούν χρησιμοποιώντας βιοχημικές τεχνικές. Η βιο-ΦΕ έχει μεγάλο εύρος εφαρμογών. Τα πειράματα που τη χρησιμοποιούν ποσοτικοποιούν χαρακτηριστικά που μπορούν να επεκταθούν πέρα της κυτταρικής-βιολογικής έρευνας. Οι μετρήσεις ΦΕ μπορούν να αφορούν μόνα κύτταρα, πολλά κύτταρα, κύτταρα σε αιώρηση και κύτταρα προσκολλημένα σε υποστρώματα [37-41].



Σχ. 20. Organ-on-chip. (Wyss Institute at Harvard University)

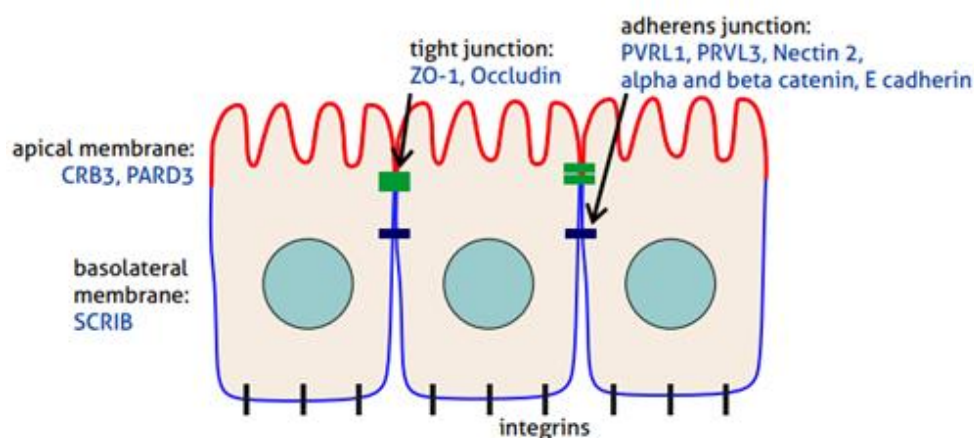
Η ανάπτυξη συστημάτων organ-on-chip² (σχ.18, σχ.20) σε συνδυασμό με μοντέλα κυττάρων in-vitro (π.χ. σχ.18) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη των παραμέτρων που ελέγχουν τη διαπερατότητα και μεταφορά φαρμάκων διαμέσου των φραγμών, που λαμβάνει χώρα κατά τα πρώιμα στάδια της ανακάλυψης φαρμάκων [3]. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον σε συστήματα body-on-chip³ οφείλεται στη δυναμική τους να παρέχουν υψηλής αξίας, χαμηλού κόστους και αξιόπιστη μέθοδο για την πρόβλεψη αλληλεπιδράσεων φαρμάκων στους ανθρώπους, συμπεριλαμβανομένων και φαινομένων μεταφοράς. Τα εν λόγω μοντέλα καλλιέργειας κυττάρων επίσης έχουν το πλεονέκτημα της ελεγχιμότητας σημαντικών παραμέτρων και πειραματικών συνθηκών. Για εκτίμηση διαπερατότητας σε κυτταρικούς φραγμούς, η πολυπλοκότητα των μοντέλων in-vitro σε αυτά τα συστήματα θα πρέπει να αντανακλά τα συστήματα μεταφορών διαμέσου μεμβρανών καθώς και τους μεταβολικούς δρόμους που περιλαμβάνονται, και να περιέχει ένα πολωμένο στρώμα κυττάρων.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρέχουν μια μη-θρομβογενή επιφάνεια μονοστρώματος που καλύπτει την κοιλότητα (lumen) των αιμοφόρων αγγείων και λειτουργεί σαν κυτταρική διεπαφή μεταξύ αίματος και ιστού [96]. Τα επιθηλιακά κύτταρα καλύπτουν και παρέχουν ένα προστατευτικό στρώμα τόσο για το εξωτερικό, όσο και το εσωτερικό κοιλοτήτων στο σώμα [97]. Τα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα συνδέονται μέσω διακυτταρικών συνδέσμων που διαφέρουν ως προς τη μορφολογία, σύνθεση και λειτουργία. Οι στενοσύνδεσμοι είναι η διακυτταρική επαφή που ελέγχει τη διέλευση ουσιών και επιτρέπει σε αμφότερα αυτά τα στρώματα κυττάρων να σχηματίσουν επιλεκτικά διαπερατά φράγματα που διαχωρίζουν βασηοπλευρική και κορυφαία πλευρά, ελέγχοντας τις διεργασίες μεταφοράς για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Η

² Ένα organ-on-chip είναι ένα 3-διαστάσεων μικρορευστομηχανικό chip καλλιέργειας κυττάρων που προσομοιώνει τις δραστηριότητες, μηχανισμούς και φυσιολογική αντίδραση ολόκληρων οργάνων και συστημάτων οργάνων, ένα είδος τεχνητού οργάνου[91]. Αποτελεί αντικείμενο σημαντικής βιοϊατρικής έρευνας. Η σύγκλισή τους με τη βιολογία κυττάρων έχει επιτρέψει τη μελέτη της ανθρώπινης φυσιολογίας εισάγοντας ένα νέο μοντέλο in-vitro για πολυκύτταρους ανθρώπινους οργανισμούς. Κάποια μέρα ίσως εξαφανίσουν την ανάγκη για μελέτες σε ζώα στη φαρμακευτική. Αν και πολλαπλές μελέτες ισχυρίζονται ότι έχουν επιτυχώς προσομοιώσει τις λειτουργίες οργάνων, η μετάβαση προς την πλήρη εφαρμογή έχει ακόμα μέλλον. Τα organ-on-chip διαφέρουν σε προσέγγιση και σχεδιασμό μεταξύ διαφορετικών μελετητών. Σαν αποτέλεσμα, η επικύρωση και βελτιστοποίηση τέτοιων συστημάτων πιθανώς θα είναι μακρά διαδικασία. Όργανα που έχουν προσομοιωθεί περιλαμβάνουν εγκέφαλο, πνεύμονα, καρδιά, συκώτι, αρτηρίες, δέρμα, οστά κ.ά.

³ Οι συσκευές body-on-chip είναι η ενσωμάτωση διαφορετικών organ-on-chip και παρέχουν την ευκαιρία να αναπαρασταθούν περίπλοκες λειτουργίες του ανθρώπινου σώματος[90]. Αυτές οι μικρορευστομηχανικές διατάξεις επιτρέπουν τη μίμηση τρισδιάστατων αρχιτεκτονικών οργάνων και τον έντεχνο έλεγχο ροής ρευστών, θρεπτικών, συγκεντρώσεων CO₂ και O₂, όπως και την απομάκρυνση απορριμμάτων.

ακεραιότητα των φραγμών είναι ζωτική για τις φυσιολογικές δραστηριότητες των ιστών. Για να θεραπευθούν όμως ορισμένες ασθένειες οργάνων τα οποία προστατεύονται από τέτοιους φραγμούς, είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν μέθοδοι που καθιστούν δυνατή τη μεταφορά φαρμάκων μέσα από αυτούς και προς τον στόχο.



Σχ.21. Περιοχές του μονοστρώματος κυττάρων. (Basolateral=βασεοπλευρική περιοχή, apical=κορυφαία περιοχή, tight junction=στενοσύνδεσμος, adherens junction=σύνδεσμος προσκόλλησης, integrins=συνδετάσες). *Η κορυφαία περιοχή κοιτάζει προς το εσωτερικό του κυττάρου, ενώ η βασεοπλευρική προς το εξωτερικό. (Proteintech Group, Inc)

Μεγάλος αριθμός συστημάτων βασισμένων σε κυτταρικούς φραγμούς για την πρόβλεψη διεισδυτικότητας φαρμάκων, έχουν αναφερθεί [92,93]. Οι διατάξεις αυτές σχεδιάζονται ώστε να επιτρέπουν πρόσβαση τόσο στη βασεοπλευρική (basolateral)* , όσο και στην κορυφαία περιοχή (apical) (σχ.21).

Αυτά τα μοντέλα κυρίως περιέχουν κύτταρα που μεγαλώνουν σε μονοστρώμα όταν καλλιεργούνται σε πορώδεις μεμβράνες, και έχουν φυσιολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με τη φυσιολογία και λειτουργία των φραγμών σε πραγματικές συνθήκες [3]. Η επιτυχής χρήση ενός συστήματος για την πρόβλεψη απορρόφησης φαρμάκων εξαρτάται από το πόσο πιστά το in-vitro μοντέλο μπορεί να μιμηθεί τα in-vivo χαρακτηριστικά των φραγμών [3].

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης και ακεραιότητας των κυτταρικών φραγμών κατά την ωρίμανση και την περίοδο των πειραμάτων είναι κρίσιμη για μελέτες σε φραγμούς. Μέθοδοι για την αξιολόγηση της διαπερατότητας φραγμών βασίζονται στη μεταφορά ουσιών ιχνηλάτησης (tracer), όπως φωσφορίζοντες δείκτες, ή μέτρηση της ηλεκτρικής αντίστασης [64].

Η χρήση ουσιών ιχνηλάτησης (marker molecules) μπορεί να επηρεάσει τη διαδικασία μεταφοράς φαρμάκων και επίσης να επηρεάσει την ακεραιότητα του φραγμού. Επίσης, η χρήση χημικών χρωστικών (dyes) καθιστά τα κύτταρα άχρηστα για περαιτέρω πειράματα. Επομένως μη-επεμβατικές τεχνικές είναι οι πιο κατάλληλες για τη συνεχή παρακολούθηση της ακεραιότητας των φραγμών. Η TEER (σχ.18) είναι η μέτρηση της ηλεκτρικής αντίστασης στα άκρα ενός μονοστρώματος κυττάρων και έχει μεγάλη ευαισθησία και αξιοπιστία σαν μέθοδος για την αξιολόγηση της ακεραιότητας και διαπερατότητας του μονοστρώματος. Όπως θα δειχθεί παρακάτω στην εν.1.4.3, στην

TEER γίνεται μέτρηση μόνο σε μια συχνότητα (συνήθως 12.5 Hz). Παρόλο που η μέτρηση TEER και της διεπιθηλιακής μεταφοράς δεικτών (ουσίες ιχνηλάτησης) είναι αμφότερα ενδείξεις της ακεραιότητας των στενοσυνδέσμων και του μονοστρώματος κυττάρων, ερμηνεύουν διαφορετικές πειραματικές παραμέτρους [95]. Η TEER ερμηνεύει την ιοντική αγωγιμότητα του παρα-κυτταρικού δρόμου στο μονοστρώμα, ενώ η ροή μη-ηλεκτρολυτικών ουσιών ιχνηλάτησης ερμηνεύει την παρακυτταρική ροή νερού, όπως και το μέγεθος των πόρων των στενοσυνδέσμων [95].

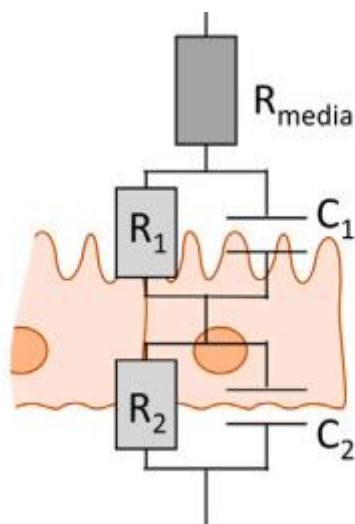
Τα πλεονεκτήματα και η ευρεία χρήση των μεθόδων TEER/TEEI οφείλονται στο ότι είναι μη-επεμβατική και μπορεί να εφαρμοστεί για την επιτήρηση ζωντανών κυττάρων κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξής τους. Επίσης σύμφωνα με μελετητές είναι σχετικά εύκολη μέθοδος στην εφαρμογή, όπως και η πλέον διαδεδομένη [3].

Τα διαθέσιμα συστήματα διακρίνονται σε 3 κατηγορίες:

- i. Γενικού σκοπού όργανα, σχεδιασμένα για έλεγχο υλικών, τα οποία είναι ευμεγέθη και βαριά για το σκοπό μας (π.χ. HP4294, 37 Kg) και επίσης δεν πληρούν ιατρικά πρότυπα.
- ii. Όργανα φτιαγμένα για ιατρική χρήση, όπως το σύστημα CellZScope (NanoAnalytics - Münster, Germany) που παρουσιάζεται στη εν.1.4.3. Είναι ακριβή αλλά μεγάλου κόστους και ευμεγέθη. Επίσης λόγω μεγάλου μήκους καλωδίων που χρειάζονται ή ανάγκης να γίνονται οι μετρήσεις έξω από τον επωαστή κρίνονται ακατάλληλα για επιτόπια μέτρηση που είναι ο στόχος αυτής της εργασίας.
- iii. Πειραματικές συσκευές, όπως η [49], οι οποίες είναι αρκετά εξειδικευμένες. Είναι κυρίως γαλβανοστατικές, μιας και το ρεύμα πρέπει να περιοριστεί.

Ένα μειονέκτημα των TEER/TEEI είναι ότι θερμαίνονται οι ιστοί, που μπορούν να καταστραφούν. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί περιορίζοντας το μέγιστο ρεύμα στα 50 μA [3]. Η BIO-ΦΕ δεν επηρεάζει τα κύτταρα και μπορεί να συμβάλλει στην παρακολούθησή τους σε πραγματικό χρόνο [33].

Σύμφωνα με μελέτες, υψηλή TEER αναπαριστά έναν ισχυρό, άθικτο φραγμό που ελέγχει τη μεταφορά ουσιών [99]. Αν μετρηθούν ισχυρά πολωμένα κύτταρα, η επιφάνεια και συγκέντρωση πρωτεϊνών μπορεί να διαφέρουν μεταξύ κορυφαίας και βασηοπλευρικής περιοχής, με αποτέλεσμα διαφορετικές χωρητικότητες για τη μεμβράνη στην κάθε πλευρά(σχ.22). Οι ηλεκτρικές αυτές παράμετροι μπορούν να εξαχθούν με TEEI και να χρησιμοποιηθούν για να εξαχθούν συμπεράσματα για τις βιολογικές διεργασίες στο φραγμό [2]. Ας σημειωθεί ότι στο σχ.18b η χωρητικότητα των κυττάρων παραλείφθηκε, καθώς δεν έχει σημασία στις συχνότητες όπου λειτουργεί το όργανο EVOM.



Σχ.22. Ηλεκτρικό ισοδύναμο της μεμβράνης σε περίπτωση ισχυρά πολωμένων κυττάρων.

(Linz et al.,2020)

Έρευνες έχουν εφαρμόσει επιτυχώς ΒΙΟ-ΦΕ σε καρκινικά κύτταρα στόματος [75]. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά από τα υγιή όσον αφορά την αναπαραγωγή, την προσκόλληση, τον βαθμό επιβίωσης, την ωρίμανση και τη λειτουργία [33]. Στη βάση διαφορετικών ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων τέτοιων καρκινικών κυττάρων με διάφορα καρκινογενή χαρακτηριστικά, η καρκινογένεση μπορεί να προσδιοριστεί παρακολουθώντας την αλλαγή χωρητικότητας της κυτταρικής μεμβράνης κι έτσι μια διάταξη ΒΙΟ-ΦΕ να παρέχει αξιόπιστη και χωρίς-ίχνη προσέγγιση για το διαχωρισμό και αναγνώριση τέτοιων κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα [105]. Γενικά ΒΙΟ-ΦΕ έχει χρησιμοποιηθεί για να ποσοτικοποιηθούν στάδια των καρκινικών κυττάρων, να ερευνηθούν οι επιδράσεις των τοξινών των κυττάρων και να ερευνηθεί η επούλωση πληγών μεταξύ άλλων.

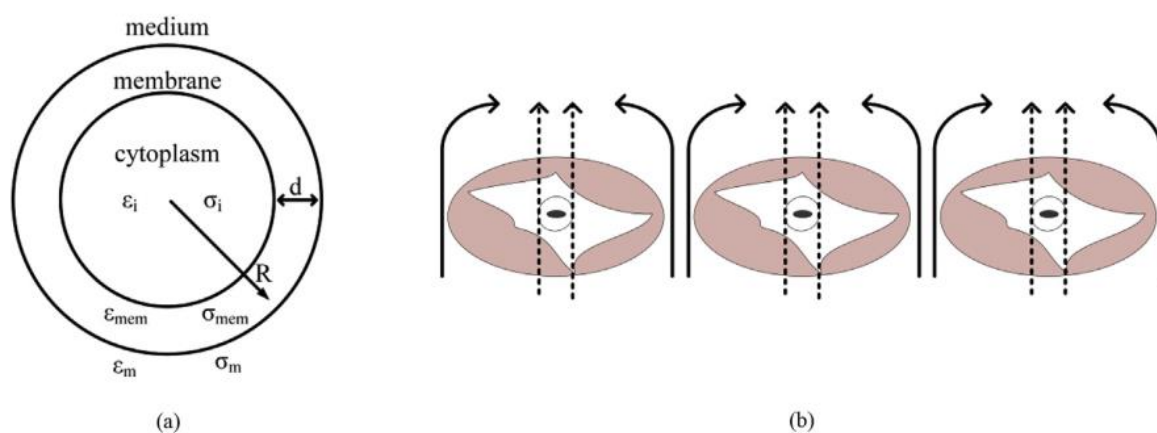
Όταν τα κύτταρα είναι στο όριο της ζωτικότητας, η μεμβράνη στρογγυλεύει δυσκολεύοντας τις επαφές κυττάρου-κυττάρου. Νεκρά κύτταρα μπορεί να αποκολληθούν από την καλλιέργεια, αφήνοντας περισσότερο ρεύμα να περάσει. Αυτό φαίνεται σαν μείωση της εμπέδησης [35]. Οι μετρήσεις εμπέδησης επιτρέπουν ένα βάθος πληροφόρησης πέρα από αυτό που μπορεί να προσφέρουν οι τεχνικές μικροσκοπίας [36].

2. Ηλεκτρικά ισοδύναμα & καμπύλες απόκρισης

Ένας φραγμός από κύτταρα επιδεικνύει ηλεκτρικά χωρητικό και ωμικό χαρακτήρα. Τα χωρητικά φαινόμενα εμφανίζονται χάρη στην αδιαπέραστη, από φορτισμένα ιόντα, φωσφολιπιδική μεμβράνη των κυττάρων. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα της μεμβράνης είναι πολύ μικρότερη του εξωκυτταρικού υγρού [100]. Όταν τα κύτταρα αρχίζουν να συνδέονται με στενοσυνδέσμους, ελέγχουν την ιοντική ροή ενδιάμεσά τους, και σχηματίζουν φραγμό. Η χωρητικότητα της μεμβράνης είναι περίπου $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ [43], όμως

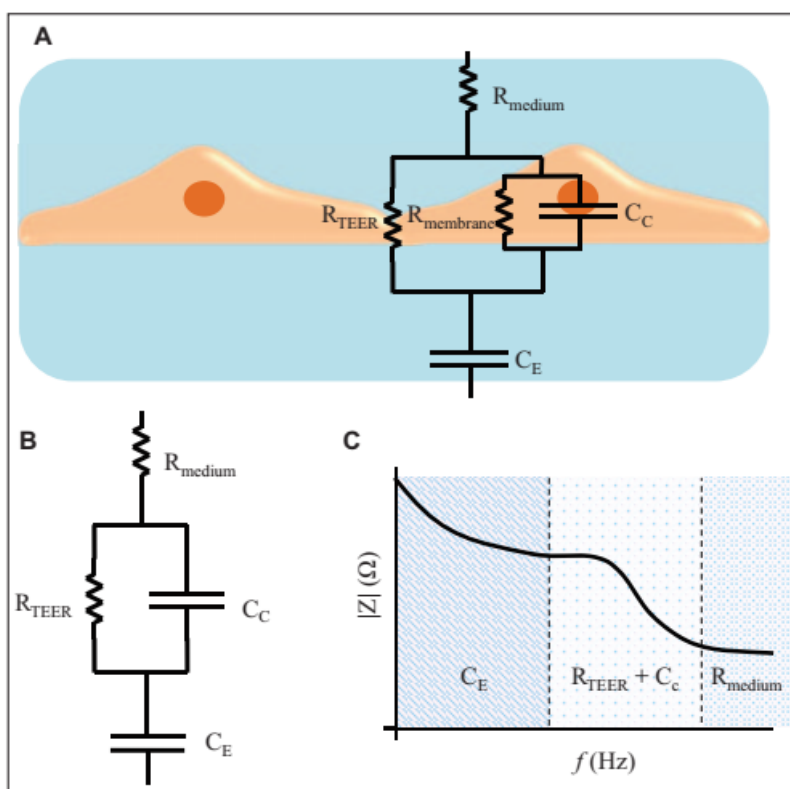
μπορεί να φανεί μεγαλύτερη αν η μεμβράνη έχει αναδιπλωθεί [43]. Επιπροσθέτως, η σύνθεση [34] και το πάχος του μονοστρώματος [103] επηρεάζουν τη χωρητικότητα. Η βιολογική σημασία της χωρητικότητας του μονοστρώματος μπορεί λοιπόν να συσχετιστεί με μορφολογικά χαρακτηριστικά [52].

Μία ανάλυση ισοδύναμου κυκλώματος της μετρούμενης απόκρισης συχνότητας εκτελείται προκειμένου να λάβουμε τις ηλεκτρικές παραμέτρους που μπορούν να εφαρμοστούν για τον χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων των κυτταρικών φραγμών.



Σχ.23 α) Απλοποιημένο κύτταρο, το οποίο δείχνει παραμέτρους σε επιμέρους μέρη που επηρεάζουν την εμπέδηση του κυττάρου. **β)** Οι συνεχείς γραμμές αφορούν τη ροή ρεύματος σε χαμηλές συχνότητες, ενώ οι διακεκομμένες στις υψηλές. (Giaever and Keese, 1986)

Το **σχ.23** δείχνει ένα τυπικό μοντέλο κυττάρου(α) και μονοστρώματος(β) που εφαρμόζεται για την ανάλυση απόκρισης συχνότητας σε συστήματα transwell. Σε αυτό το σύστημα, το ρεύμα μπορεί να διέλθει μεταξύ των κυττάρων (παρακυτταρικός δρόμος, paracellular route) ή μέσα από το κάθε κύτταρο (διακυτταρικός δρόμος, transcellular route) [53]. Οι στενοσύνδεσμοι στον παρακυτταρικό δρόμο συνεισφέρουν στην ωμική αντίσταση TEER του ΗΙΚ. Κάθε στρώμα λιπιδίων στον διακυτταρικό δρόμο συνεισφέρει έναν παράλληλο συνδυασμό όπως δεικνύεται στο **σχ.24Α**, με τον συνδυασμό $R_{MEMBRANE}$, C_C .



Σχ.24. A) Ένα τυπικό ΗΙΚ που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της απόκρισης συχνότητας συστημάτων με καλλιέργειες κυττάρων. B) Απλοποιημένο ΗΙΚ. C) Ένα τυπικό φάσμα με διαχωρισμένες περιοχές συχνότητας. (Benson et al.)

Επιπρόσθετα με αυτά τα στοιχεία, η αντίσταση του ηλεκτρολύτη (θρεπτικό υγρό κυττάρων) και των ηλεκτροδίων (εάν δεν έχουμε γαλβανοστατική μέτρηση με 4 ηλεκτρόδια) πρέπει να ληφθούν υπόψιν.

Οι υψηλές τιμές της $R_{MEMBRANE}$ σε σχέση με την εμπέδηση του C_C κάνουν το ρεύμα να ρέει κυρίως δια του πυκνωτή και επιτρέπουν μια προσέγγιση όπου η $R_{MEMBRANE}$ μπορεί να παραληφθεί (**σχ.24.B**). Σύμφωνα με κάποιες μελέτες σε συχνότητες υψηλότερες των 10kHz η εμπέδηση του μονοστρώματος συνολικά μηδενίζεται [2], λόγω του χωρητικού δρόμου που μπορεί να ακολουθήσει το ρεύμα διαμέσου του μονοστρώματος. Η εμπέδηση σε υψηλές συχνότητες απορρέει μόνο από το διάλυμα και την πορώδη μεμβράνη του transwell, αν αυτή αποδειχθεί αξιοσημείωτη (φαίνεται στο **σχ.18**).

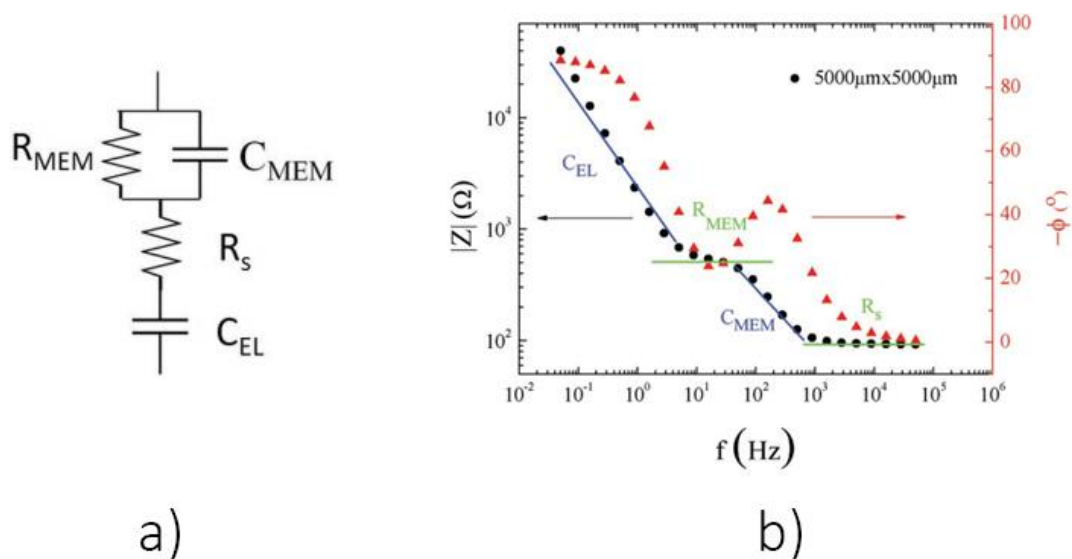
Με βάση την παραπάνω προσέγγιση, το ΗΙΚ μπορεί να έχει μια απόκριση συχνότητας όπως στο **σχ.24.C**. Τυπικά υπάρχουν τρεις ξεχωριστές περιοχές συχνότητας στην απόκριση όπου η εμπέδηση κυριαρχείται από συγκεκριμένα στοιχεία του ΗΙΚ. Στη χαμηλή περιοχή συχνοτήτων, η καμπύλη κυριαρχείται από τη C_E , αφού ο πυκνωτής αυτός είναι ο μεγαλύτερος. Στη μεσαία περιοχή κυριαρχείται από τα στοιχεία σχετικά με τα κύτταρα, δηλ. την C_C και TEER. Στις υψηλές συχνότητες οι C_C και C_E παρέχουν ένα αγωγίμο δρόμο, ώστε η εμπέδηση να κυριαρχείται από την αντίσταση διαλύματος R_{medium} . Αυτές οι παράμετροι ΗΙΚ μπορούν να εκτιμηθούν χρησιμοποιώντας NLLSF, όπως προαναφέρθηκε στην εν.1.1.6, με τα δεδομένα του πειράματος.

Στη βιβλιογραφία βρίσκονται τιμές για αυτές τις περιοχές και την αντίστοιχη εμπέδηση (**σχ.25**). Σύμφωνα με τους Koutsouras et al. [53], η διάταξή τους επιδεικνύει

συμπεριφορά αντιστάτη $R_{medium}(=R_S)$ τιμής $\sim 100 \Omega$ στις υψηλές συχνότητες και μέχρι τα $\sim 10000\text{Hz}$. Εκεί το ρεύμα ακολουθεί τον διακυτταρικό δρόμο.

Έπειτα μειώνοντας τη συχνότητα ξεκινά η επίδραση των $C_C(=C_{mem})$ & TEER(= R_{mem}). Για τη συγκεκριμένη καλλιέργεια κυττάρων CACO-2, η TEER ισούται με 425Ω , που είναι αρκετά κοντά με την TEER που βρέθηκε με ένα συμβατικό σύστημα μονής-συχνότητας. Η καμπύλη αυτή και το σχήμα πλατώ που έχει ήδη δημιουργηθεί από τη συχνότητα των 40Hz μπορεί να αναγνωριστεί και από έναν άνθρωπο σαν ύπαρξη βιολογικού μέρους στο σύστημα. Εκεί πλέον το ρεύμα ακολουθεί τον παρακυτταρικό δρόμο.

Κάτω από τα 10Hz επιστρέφουμε σε χωρητική καμπύλη όπου κυριαρχεί η $C_E(=C_{EL})$.



Σχ.25. a) Απλοποιημένο ΗΙΚ. b) Απόκριση συχνότητας στο πείραμα των Koutsouras et al. Με την R_{mem} εδώ εννοείται η TEER.

Οι τιμές TEER/TEEI θεωρούνται ισχυροί δείκτες της ακεραιότητας των φραγμών πριν αξιολογηθούν για μεταφορά φαρμάκων/χημικών. Η ΦΕ, από μόνη της ή σε συνδυασμό με ανάλυση ΗΙΚ, παρέχει μια πιο ακριβή αναπαράσταση των τιμών TEER /TEEI απ'ότι μπορεί να παρέχει μια τεχνική DC/μονής συχνότητας AC όπως είδαμε πρωτύτερα.

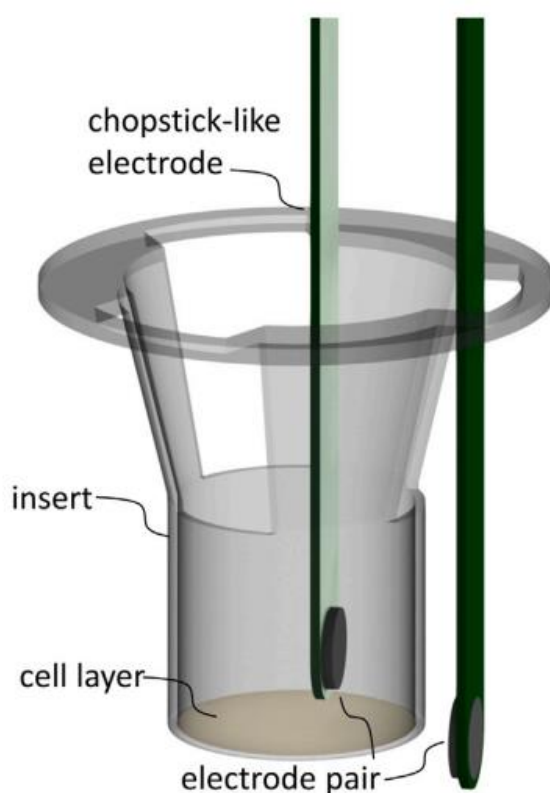
3. TEER / TEEI διατάξεις

Η TEER συχνά μετράται με μια διάταξη ηλεκτροδίων τύπου chopstick (σχ.26) [64]. Η συνήθης μέθοδος για μέτρηση είναι να συνδεθεί το chopstick με ένα όργανο μονής συχνότητας όπως του σχ.18 [2]. Το συγκεκριμένο όργανο εισάγει τετραγωνική κυματομορφή ρεύματος πλάτους $10\mu\text{A}$ με συχνότητα 12.5 Hz , η οποία καταλήγει στα ηλεκτρόδια ρεύματος εξωτερικά του chopstick. Η κυματομορφή είναι εναλλασσόμενη και όχι συνεχής, διότι έτσι αποτρέπεται η πόλωση των ηλεκτροδίων και των κυττάρων [57].

Τα δύο ηλεκτρόδια μέτρησης τάσης βρίσκονται στο εσωτερικό των ράβδων. Το chopstick συνδέεται μέσω ενός βύσματος τύπου RJ-11 με το κεντρικό όργανο. Τα ηλεκτρόδια παροχής είναι φτιαγμένα από άργυρο (Ag), ενώ της μέτρησης από χλωριούχο άργυρο (Ag/AgCl) [104].

Η αντίσταση μετράται μέσω του νόμου του Ohm. Αυτή η μέθοδος τετραγωνικού ρεύματος μετρά σε σειρά την αντίσταση διαλύματος, της πορώδους μεμβράνης, και του μονοστρώματος κυττάρων. Η αντίσταση του μονοστρώματος ευρίσκεται αφαιρώντας την αντίσταση που έχει βρεθεί χωρίς κύτταρα (blank) από την αντίσταση της ίδιας διάταξης με κύτταρα. Το αποτέλεσμα ωστόσο επηρεάζεται από τη θέση των ηλεκτροδίων. Συνεπώς προσεκτική τοποθέτηση των ηλεκτροδίων είναι επιτακτική [3]. Η εξίσωση είναι η

$$R_{tissue} (\Omega) = R_{total} - R_{blank} \quad (\text{εξ.19})$$



Σχ.26. Transwell διάταξη που χρησιμοποιεί ηλεκτρόδια τύπου chopstick. (Linz et al.)

Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το σύστημα EVOM2 που εκτελεί τη συγκεκριμένη λειτουργία κοστίζει περί τα 2500€.

Αλλάζοντας το σήμα εισόδου σε ημιτονοειδές διαφόρων συχνοτήτων, πολλοί περιορισμοί του προαναφερθέντος συστήματος ξεπερνώνται. Η εμπέδηση του φραγμού, που είναι εξαρτώμενη από τη συχνότητα, γίνεται προσβάσιμη. Το CellZScope (NanoAnalytics - Münster, Germany) που παρουσιάζεται στο **σχ.27** είναι μια συσκευή ελεγχόμενη από Η/Υ που μπορεί να κάνει μετρήσεις σε πολλά transwell ταυτόχρονα και αυτόματα εξάγει τις πιο σημαντικές παραμέτρους του HIK Randles για την καλλιέργεια κυττάρων. Το εν λόγω σύστημα εφαρμόζει είσοδο τάσης 45mV και χρησιμοποιεί μέτρηση ρεύματος σε συνδυασμό με τη γνώση του μοντέλου του **σχ.26** για την εξαγωγή

της εμπέδησης. Οι παράμετροι που αφορούν αντίσταση διαλύματος, TEER, και χωρητικότητα C_c είναι προσβάσιμες με το εν λόγω σύστημα.



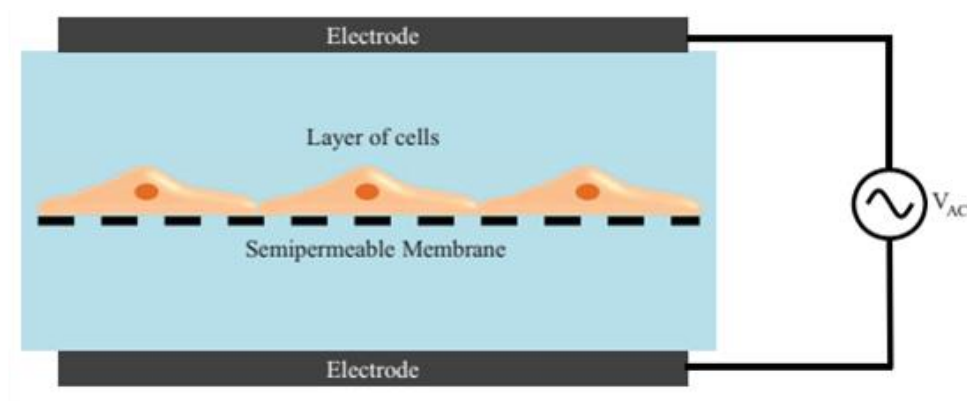
Σχ.27. Σύστημα CellZScope (NanoAnalytics - Münster, Germany)

Το CellZScope χρησιμοποιεί δισκοειδή ηλεκτρόδια και όχι chopstick. Υπάρχει δυνατότητα για μετρήσεις πολλαπλών πηγαδιών “multiwell”. Η διάταξη φαίνεται στο σχ.28. Η συσκευή όπως φαίνεται στο σχ.27 κοστίζει περί τις 13000€, ενώ το multiwell περί τις 3000€.



Σχ.28. Multiwell διάταξη μέτρησης σε καλλιέργειες για το όργανο CellZscope. (NanoAnalytics - Münster, Germany)

Η συμμετρική τοποθέτηση των δισκοειδών ηλεκτροδίων εκατέρωθεν του μονοστρώματος έχει σαν αποτέλεσμα πιο ομοιόμορφη πυκνότητα ρεύματος επί του μονοστρώματος απ' ό τι τα STX2/chopstick τύπου ηλεκτρόδια [3,57]. Επίσης ερευνητές διαπίστωσαν ότι με σταθερής θέσης κυκλικά ηλεκτρόδια τα σφάλματα μειώνονται στα 1-2 Ω συγκριτικά με τα 10-30 Ω που διαπιστώνονται στα STX2/chopstick [106].

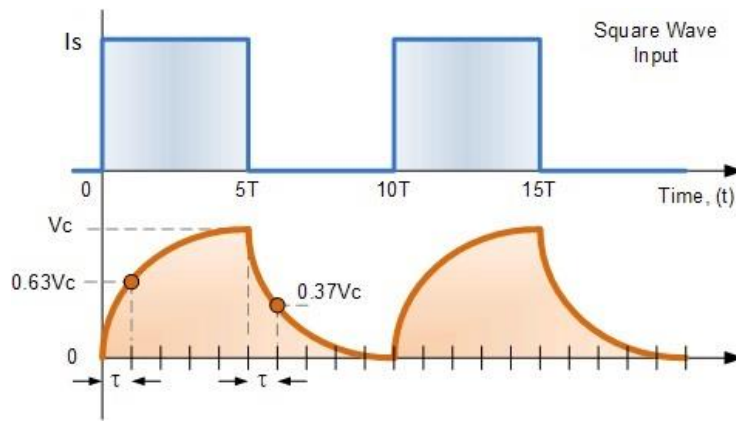


Σχ.29. Διάταξη 2-ηλ/δίων όπως χρησιμοποιείται στο σύστημα CellZscope. (Srinivasan et al.)

Παρά τα όποια μειονεκτήματα, ακόμα και χρησιμοποιώντας STX2/chopstick ηλεκτρόδια μπορούν να γίνουν πειράματα ΦΕ. Η παρακολούθηση φραγμών καλλιεργούμενων σε πορώδεις μεμβράνες είναι εφικτή απλώς συνδέοντας το STX2/chopstick σε έναν ποτενσιοστάτη ή γαλβανοστάτη [2].

4. Σφάλματα στα TEER συστήματα

Τα TEER όργανα που βασίζονται στην τετραγωνικού σήματος είναι δυνατό να παρουσιάσουν συστηματικά σφάλματα κέρδους λόγω εξάρτησης από τις χωρητικότητες C_C και C_{EL} . Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, έστω ότι έχουμε μια κυματομορφή γνωστού I_s ρεύματος εισόδου. Η τάση σε πυκνωτή V_C σε ΗΙΚ Randles απεικονίζεται παρακάτω. Αυτή θα είναι εκθετικής(βλ. σχήμα) μορφής. Η τάση της πηγής έχει μια παρόμοια κυματομορφή. Είτε μετράμε την τάση στην πηγή, είτε στα κύτταρα με τη μέθοδο των 4-ηλεκτροδίων, η τάση που θα διαβάσουμε εξαρτάται από το χρόνο που τη διαβάσαμε. Διαφορετικά τέτοια όργανα εμφανίζουν διαφορετικά αποτελέσματα. Οι κόκκινες κουκίδες αναπαριστούν τις χρονικές στιγμές της σταθεράς χρόνου του συστήματος, RC. Αν μετρήσουμε εκεί, θα βρούμε το 63% της αντίστασης που έχουμε πραγματικά. Τα όργανα που λειτουργούν με ημιτονικές κυματομορφές όπως αυτό που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, εμφανίζουν αυτό το φαινόμενο απλά σαν διαφορά φάσης. Το σχήμα του ημιτόνου στην απόκριση δεν αλλοιώνεται.



Σχ.30. Στα TEER όργανα η τάση που θα μετρήσουμε εξαρτάται από το χρόνο που θα τη μετρήσουμε (www.electronics-tutorials.ws)

5. Διάφορες διατάξεις και παράγοντες.

1) Οι τιμές TEER στη ΒΙΟ-ΦΕ συχνά διατυπώνονται σε μονάδες $\Omega * cm^2$ (κανονικοποίηση) και υπολογίζονται από τον χρήστη αναλόγως την επιφάνεια της μικροπορώδους μεμβράνης του πηγαδιού transwell όπου καλλιεργούνται τα κύτταρα[2]. Ο υπολογισμός είναι :

$$TEER_{reported} = R_{tissue}(\Omega) \cdot M_{area}(cm^2) \quad (\epsilon\xi.20)$$

Το οποίο για σταθερή $TEER_{reported}$ έχει ως ακολούθως:

$$R_{teer} \propto \frac{1}{M_{area}(cm^2)} \quad (\epsilon\xi.21)$$

Κατά την επεξεργασία των δεδομένων, για πηγάδια μεγαλύτερης επιφάνειας(M_{area}) έχει παρατηρηθεί ότι υπερεκτιμάται η αντίσταση($TEER_{reported}$) με αυτό τον τρόπο. Αυτό συμβαίνει λόγω της ανομοιόμορφης πυκνότητας ρεύματος, όπως έχει αναπαρασταθεί στο σχ.9. Η πυκνότητα ρεύματος στο κέντρο είναι μεγαλύτερη απ' ότι στο εξωτερικό της μεμβράνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η R_{tissue} να μη μικραίνει σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση όσο αυξάνει η επιφάνεια.

Ανάλογη είναι και η περίπτωση της χωρητικότητας μεμβράνης C_c . Στη βιβλιογραφία μπορεί κανείς συχνά να τη βρει κανονικοποιημένη σε μονάδες F/cm^2 [2], όμως αυτό χρειάζεται προσοχή κατά τη σύγκριση με άλλα συστήματα transwell γιατί μπορεί να αποτελεί λάθος εκτίμηση.

Οι Henry OYF et al. επίσης καταδεικνύουν ότι οι μετρήσεις TEER καλύτερα να λαμβάνονται σε μονάδες Ω αντί για $\Omega * cm^2$ [60], καθώς δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι η πυκνότητα ρεύματος είναι ίδια για όλη την επιφάνεια του μονοστρώματος. Συμπληρωματικά αναφέρουν, ότι οι μελέτες που χρησιμοποιούν chopstick που τοποθετούνται χειροκίνητα μπορούν να αποφέρουν αμφίβολα αποτελέσματα λόγω θέσης και σταθερότητας της θέσης τους.

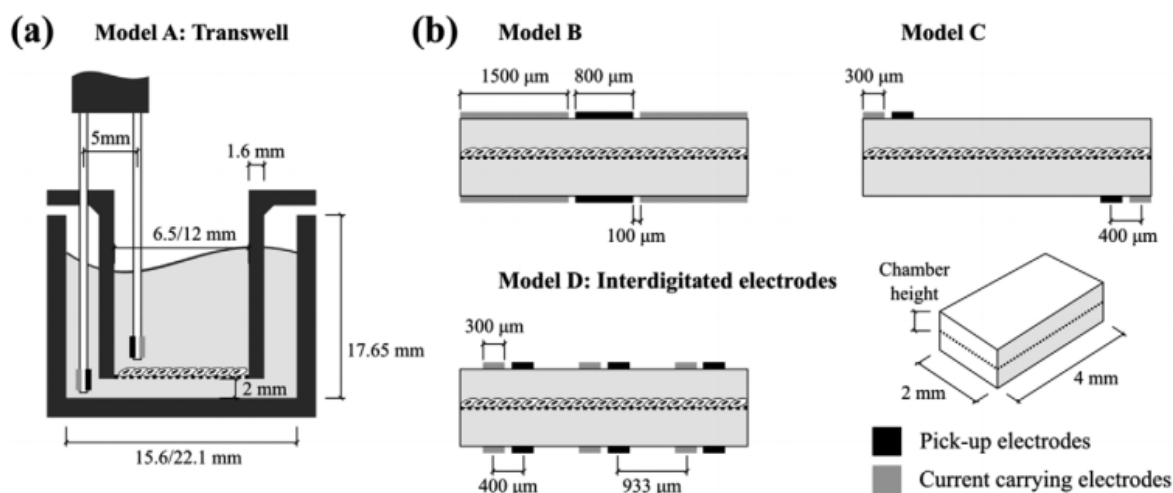
Αμφότερα το σχήμα και το μέγεθος ενός ηλεκτροδίου είναι καθοριστικής σημασίας [112]. Γενικά μιλώντας, κάθε πειραματική διάταξη χρειάζεται ηλεκτρόδια

συγκεκριμένου μεγέθους και σχήματος, με συγκεκριμένα σχέδια να είναι οδηγούμενα από θεωρητικούς υπολογισμούς [113]. Επειδή η εμπέδηση του διπλού στρώματος Helmholtz είναι αντιστρόφως ανάλογη της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, σε περίπτωση μικροηλεκτροδίων αυτό μπορεί να αποφέρει πολύ μεγάλες τιμές εμπέδησης, ειδικά σε χαμηλές συχνότητες [114]. Μία από τις πιθανές λύσεις για να ξεπεραστεί αυτό είναι η πρόσθεση τρισδιάστατων μικροδομών στα ηλεκτρόδια μέτρησης [115]. Συμπερασματικά, για να μειωθεί η επίδραση των επαφών στις μετρήσεις, η επιφάνεια των ηλεκτροδίων θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη.

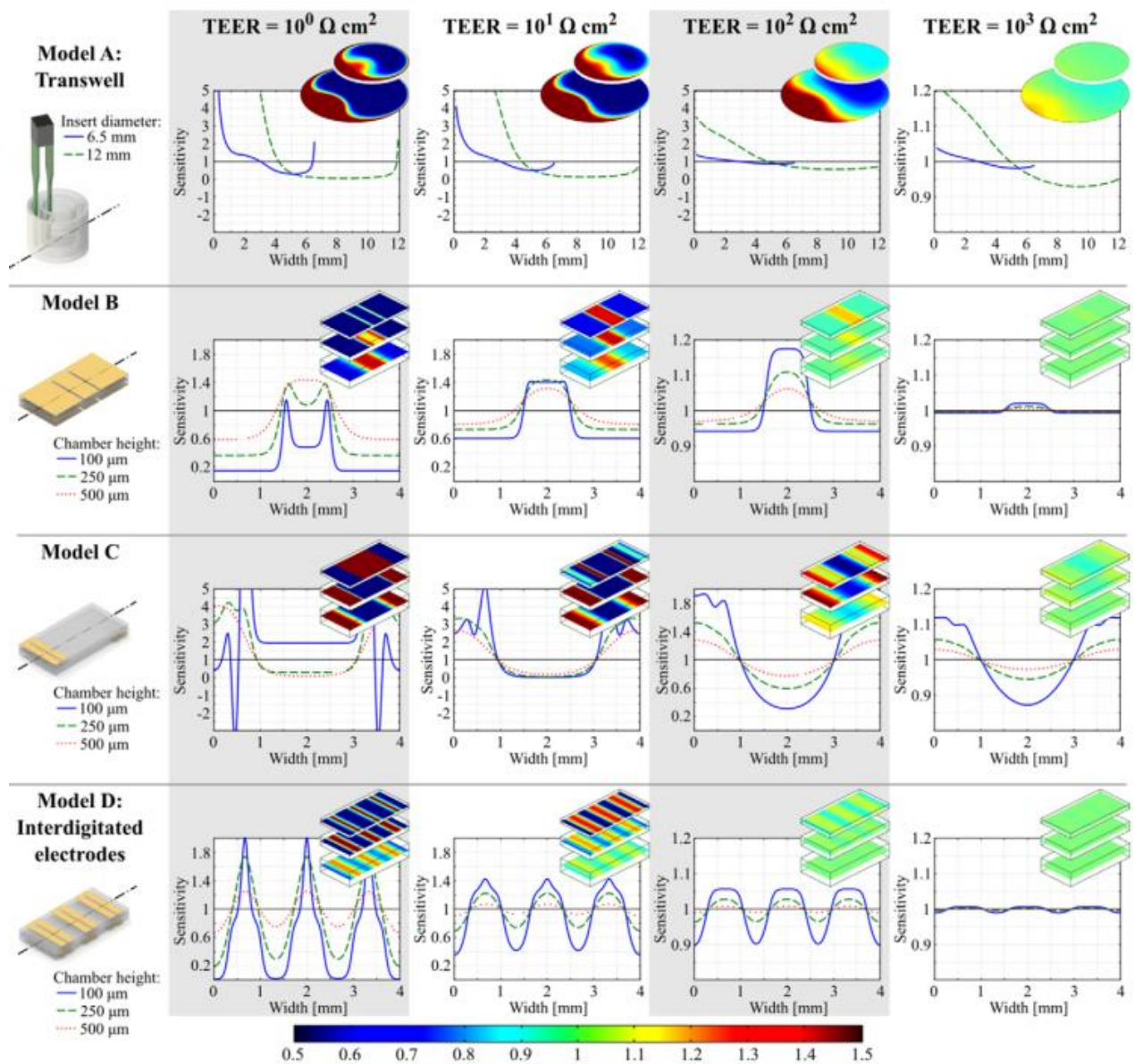
Ένας ακόμα παράγοντας που μειώνει την ακρίβεια των μετρήσεων είναι ο θόρυβος υποβάθρου που προέρχεται από χημικές διεργασίες οι οποίες λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου (επαφή ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη). Ο θόρυβος αυτός είναι ιδιαίτερα σημαντικός όταν το πλάτος του σήματος εισόδου είναι μικρό. Αύξησή του, όπως και της επιφάνειας των ηλεκτροδίων και πάλι επιτρέπει τη μείωση αυτού του θορύβου [116].

Οι van der Helm M.W. et al. [110] επέλεξαν ηλεκτρόδια μεγάλης επιφάνειας για να διασφαλίσουν καλή επαφή με το διάλυμα, με αποτέλεσμα αρκετά μεγάλη χωρητικότητα διπλού στρώματος ώστε να μην επηρεάσει τις μετρήσεις TEER σε χαμηλές συχνότητες [110].

Σε μελέτες προχώρησαν οι Yeste et al. [64], χρησιμοποιώντας το λογισμικό προσομοιώσεων COMSOL Multiphysics (Stockholm, Sweden), με στόχο να διαπιστώσουν την ευαισθησία στο ρεύμα (πυκνότητα) για την επιφάνεια των μονοστρωμάτων σε διάφορες διατάξεις ηλεκτροδίων και αποστάσεις. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήσαν δίνονται στο **σχ.31**:



Σχ.31. Τα μοντέλα που αξιολόγησαν οι Yeste et al. για τις μελέτες τους. Το μοντέλο A είναι το απλό transwell, ενώ τα υπόλοιπα είναι μικρορευστομηχανικά organ-on-chip. Τα ηλεκτρόδια μέτρησης και παροχής έχουν διαφορετικό χρώμα. (Yeste et al.)



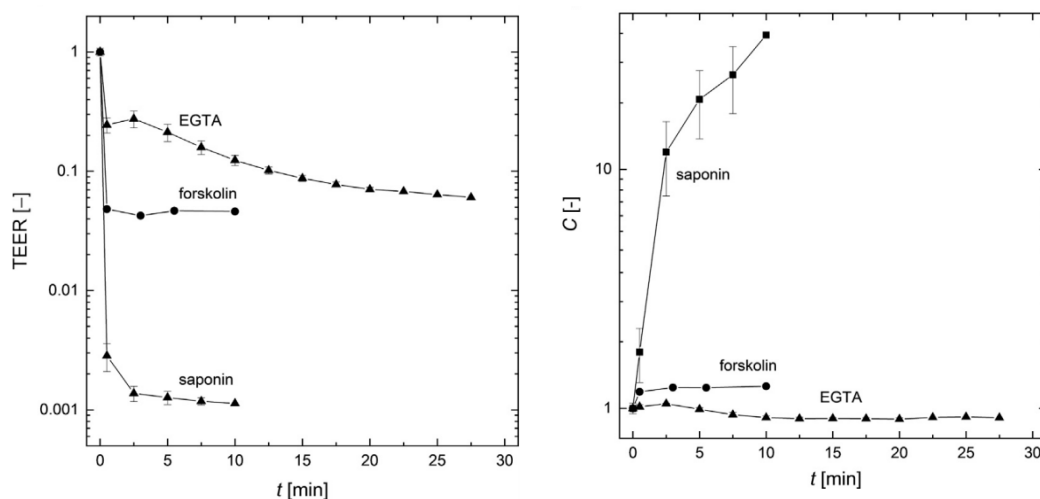
Σχ.32. Κατανομή ευαισθησίας (πυκνότητα ρεύματος) για το εκάστοτε μοντέλο (στήλη αριστερά) όταν το σήμα εισόδου είναι χαμηλής συχνότητας, στα πρότυπα της μέτρησης TEER. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται για διαφορετικές TEER, μεγέθη transwell μεμβρανών(6.5, 12 mm), & ύψη της μικρορευστομηχανικής διάταξης για τα organs-on-chips(100, 250, 500μm). Η ευαισθησία είναι κανονικοποιημένη. (Yeste et al.)

Η ιδανική διάταξη είναι αυτή που προσφέρει ομοιόμορφη κατανομή ρεύματος. Αυτό συμβαίνει στο μοντέλο B και D όταν έχουμε μεγαλύτερες αποστάσεις μεταξύ των ηλεκτροδίων και όταν έχουμε μεγαλύτερες τιμές TEER. Γενικά, αποστάσεις ηλεκτροδίων άνω του 1mm φαίνονται πιο κατάλληλες.

2) Οι *Linz et al.* διεξήγαγαν πειράματα ΦΕ σε μονοστρώμα κυττάρων CACO-2 χρησιμοποιώντας chopstick ηλεκτρόδια [2]. Με γαλβανοστατική μέτρηση, παρέχοντας

ρεύμα 10 μ A σάρωσαν τις συχνότητες 10Hz-100kHz με βήμα 10 μετρήσεων ανά δεκάδα συχνοτήτων. Επιβεβαίωσαν ότι ο εξοπλισμός τους δεν έβλαπτε τα κύτταρα (μη-επεμβατικός) παίρνοντας επαναλαμβανόμενες μετρήσεις από αυτά. Χρησιμοποίησαν λογισμικό Zview2 (Scribner Inc,USA) για να αναλύσουν τα δεδομένα και να εξάγουν παραμέτρους HIK μέσω NLLSF.

Οι εν λόγω μελετητές ερεύνησαν την απόκριση του μονοστρώματος σε ενισχυτές στενοσυνδέσμων (TEER enhancer) και Φορσκολίνη(Forskolin). Πριν το πείραμα, πλήρη φάσματα ΦΕ ελήφθησαν για να προσδιοριστούν οι αρχικές τιμές της TEER και C_C . Όλα τα δείγματα έδειξαν τουλάχιστον μια αρχική TEER της τάξης των 1500 $\Omega * cm^2$ και ολική C_C της τάξης των 3 $\mu F/cm^2$. Στο πέρας μιας μέτρησης φάσματος, το διάλυμα στην κορυφαία περιοχή αντικαταστάθηκε με διάλυμα με ενισχυτή στενοσυνδέσμων και ΦΕ εκτελέστηκε επανειλημμένα για να βρεθεί η απόκριση. Η μέτρηση τερματίστηκε όταν οι αλλαγές στο σύστημα έγιναν αμελητέες. Το ίδιο και με τις υπόλοιπες ουσίες.

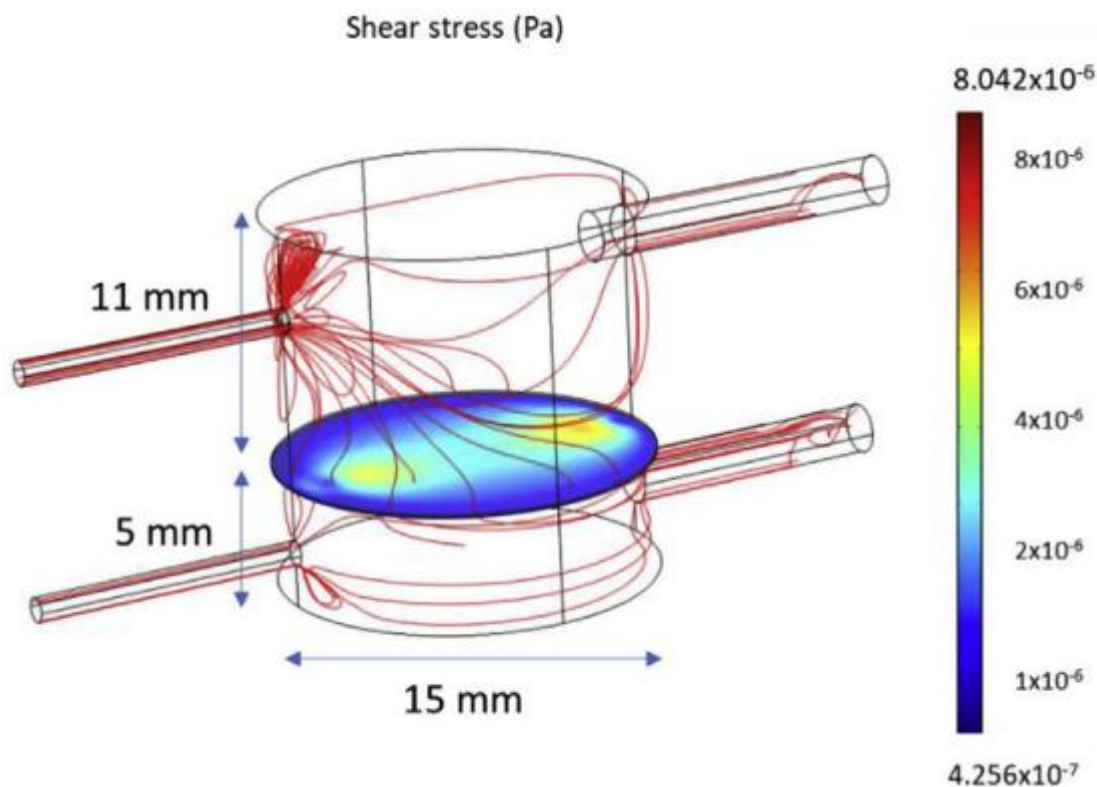


Σχ. 33. Τα γραφήματα δείχνουν την απόκριση μονοστρωμάτων CACO-2 σε EGTA, φορσκολίνη και σαπονίνη. Αριστερά βρίσκεται η TEER και δεξιά η C_C . Τα γραφήματα είναι κανονικοποιημένα στις αρχικές τιμές TEER και C_C . Όλες οι ουσίες μειώνουν δραστικά την TEER, όμως μόνο η σαπονίνη μεταβάλλει σημαντικά την C_C . Τα δεικνυόμενα δεδομένα αναπαριστούν μέσους όρους από 3 μετρήσεις για την κάθε περίπτωση (Linz et Al).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων(σχ.33) δείχνουν ότι ενώ όλες οι ουσίες μείωσαν την TEER σημαντικά, μόνον η σαπονίνη μετέβαλλε την C_C , εξαιτίας της αιμολυτικής επίδρασης αυτού του ανιονικού επιφανειοδραστικού [107]. Η ραγδαία αύξηση της C_C συσχετίζεται με την ύπαρξη αποπτωτικών κυττάρων [108]. Το ισοδύναμο Randles επιτρέπει την εκτίμηση των πειραματικών παραμέτρων κατά όλα τα στάδια σχηματισμού φραγμού και κατά τη διάρκεια σύνθετων βιολογικών γεγονότων, όπως μετά την εισαγωγή φορσκολίνης [2].

3) Οι *L. Cacopardo et al.* [57] παρουσίασαν ένα πειραματικό σύστημα organ-on-chip ικανό να προσομοιώσει το δυναμικό περιβάλλον κυτταρικών φραγμών, ενώ παράλληλα να αξιολογεί τα κύτταρα μέσω ΒΙΟ-ΦΕ πραγματικού χρόνου και απεικόνισης μέσω

μικροσκοπίου. Αποτελείται από μικρο-ρευστομηχανική διάταξη που περιέχει βασεοπλευρική, αλλά και κορυφαία περιοχή οι οποίες διαχωρίζονται από τη μικροπορώδη μεμβράνη (σχ.34).



Σχ.34. CFD μοντέλο του organ-on-chip των L. Cacopardo et al., που προσομοιώνει τη δυναμική ρευστών του. Οι κόκκινες γραμμές είναι οι κατευθύνσεις της ροής, ενώ τα χρώματα στη μεμβράνη αναπαριστούν την πίεση (Pa) που της ασκείται. (εδώ η ροή εισόδου=200μL/min, πυκνότητα νερού στους 37°C=0.6913mPa/s).

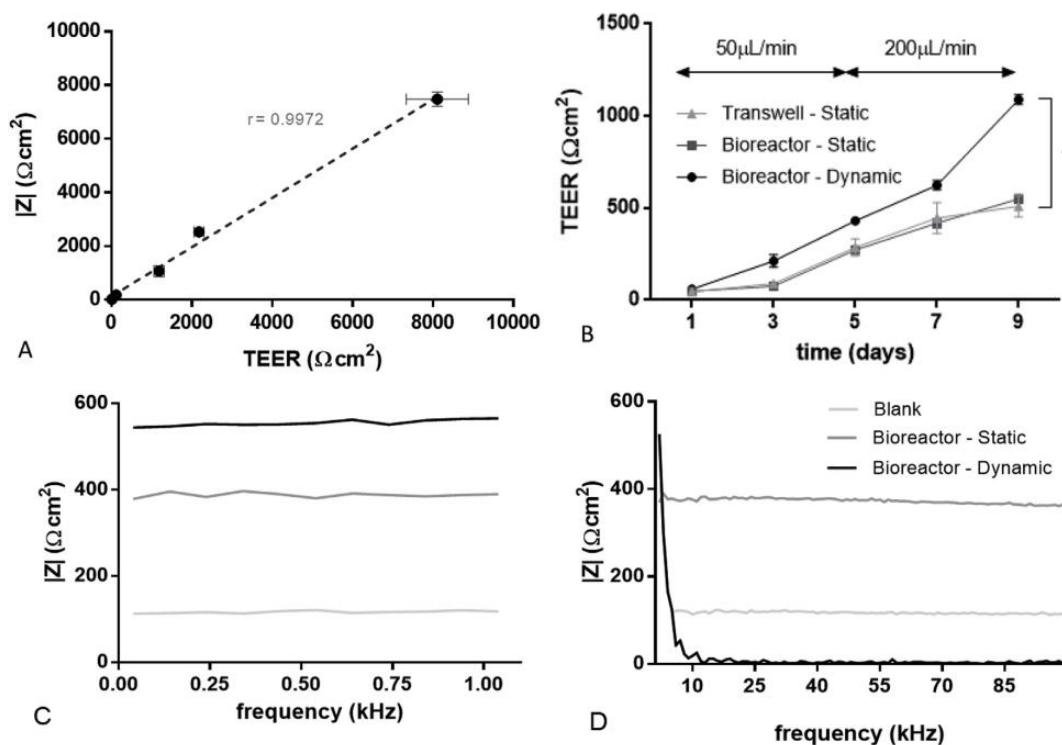
(L. Cacopardo et al. , COMSOL Multiphysics 4.3b (Stockholm, Sweden))

Το κύκλωμα μέτρησης εμπέδησης βασίζεται στο IC μέτρησης εμπέδησης AD5933 (Analog Devices Inc.) σε μία υλοποίηση πλακέτας που έχει προσαρμοστεί για μετρήσεις βιολογικών υλικών [109] και επιτρέπει μετρήσεις χαμηλής συχνότητας, με αποτέλεσμα ένα εύρος συχνοτήτων 40Hz – 100kHz. Επιπροσθέτως ακολουθήθηκε τετραπολική μέθοδος στα ηλεκτρόδια για να αποφευχθούν οι επιδράσεις των ηλεκτροδίων. Ένα Arduino (Arduino Micro - Interaction Design Institute, Ivrea, Italy) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του AD5933, δηλ. τον καθορισμό των παραμέτρων αρχικής συχνότητας, βήματος συχνότητας και αριθμού βημάτων. Οι μετρήσεις μπορούσαν να ληφθούν μέσω σειριακής επικοινωνίας.

Παραδείγματα αποκρίσεων συχνότητας δίνονται στο **σχ.35 C,D**. Τα γραφήματα επιτρέπουν σύγκριση μεταξύ της εμπέδησης ως προς τη συχνότητα στο σύστημα μετά το πέρας πέντε ημερών καλλιέργειας των κυττάρων σε στατικές (όχι ροή διαλύματος) και δυναμικές (με ροή διαλύματος) συνθήκες. Συγκεκριμένα, στη δυναμική περίπτωση,

σε χαμηλές συχνότητες (40-1040Hz), το μέτρο της εμπέδησης $|Z|$ παραμένει σταθερό, ενώ σε ψηλότερες συχνότητες (2-100kHz) ακολουθεί μια τυπική απόκριση συστήματος RC 1^{ης} τάξης (δηλαδή ρεύμα αρχίζει να περνά από τον διακυτταρικό δρόμο). Αντιθέτως στη στατική περίπτωση, η $|Z|$ είναι συνεχής για αμφοτέρως τις περιοχές συχνοτήτων, καταδεικνύοντας την έλλειψη της χωρητικότητας των κυττάρων. Πιθανότατα το ρεύμα περνά ανάμεσα από τα κύτταρα, σε δρόμους όπου δεν υπάρχουν στενοσύνδεσμοι και άρα δεν έχει σχηματιστεί φραγμός. Αφού και η εμπέδηση στις χαμηλότερες συχνότητες είναι μικρότερη απ' ό,τι στις δυναμικές συνθήκες, ενισχύεται αυτή η υπόθεση.

Η σύγκριση μεταξύ στατικών και δυναμικών συνθηκών επισημαίνει τη διαφορά στη ζωτικότητα των μονοστρωμάτων στις δύο περιπτώσεις, η οποία ήταν σημαντικά καλύτερη στις δυναμικές συνθήκες σε σχέση με τις στατικές. Τα απορρίμματα των κυττάρων παρασύρονται μακριά με τη ροή του διαλύματος, επιτρέποντας την πρόσβαση σε νέα θρεπτικά στοιχεία.



Σχ.35. Α) Σύγκριση μεταξύ μετρήσεων NaCl που πάρθηκαν με τη διάταξη των L. Cacopardo et al. (y-άξονας) και όργανο EVOM (x-άξονας). r =συντελεστής συσχέτισης Pearson. Β) Μετρήσεις TEER κατά τη διάρκεια των ημερών της καλλιέργειας κυττάρων που ελήφθησαν με το σύστημα του ερευνητή (bioreactor) και το EVOM (transwell). Γ) Μετρήσεις TEER 5 ημέρες μετά την εμφύτευση των κυττάρων σε στατικές και δυναμικές συνθήκες. Χαμηλές συχνότητες. Δ) Ψηλές συχνότητες. (L. Cacopardo et al.)

Τα αποτελέσματα όπως παρουσιάζονται στο **σχ.35** δείχνουν ότι οι δυναμικές συνθήκες προάγουν την ακεραιότητα του φραγμού και το σχηματισμό στενοσυνδέσμων όπως γίνεται αντιληπτό από τις συνεχώς υψηλότερες τιμές TEER κατά την περίοδο καλλιέργειας. Επιπροσθέτως, οπτική παρατήρηση μέσω μικροσκοπίου έδειξε ότι ο σχηματισμός μονοστρώματος ήταν πιο σταθερός και γρήγορος σε δυναμικές συνθήκες.

Λαμβάνοντας αυτά υπόψη, ο σχηματισμός μονοστρώματος αποδεικνύεται πως μπορεί να αξιολογηθεί απλά παρατηρώντας την απόκριση της εμπέδησης. Μόνον σε περίπτωση ύπαρξης συνεχούς και πυκνού φραγμού μεταδίδεται το ρεύμα μέσω του διακυτταρικού δρόμου στις υψηλές συχνότητες, γεγονός που μαρτυρά την παρουσία της C_c .

4) Οι van der Helm M.W. et al. επίσης διεξήγαγαν μονής-συχνότητας μελέτες TEER και επισημαίνουν παράγοντες που επηρεάζουν τις μετρήσεις στα organ-on-chip συστήματα [110]. Όπως περιγράφουν η αντίσταση του διαλύματος του μικρο-ρευστομηχανικού καναλιού, όπως είδαμε και στην εν.1.1.6, ισούται με

$$R_{ch} = \rho \frac{l_{ch}}{A_{ch}} (\Omega) \quad (\text{εξ.22})$$

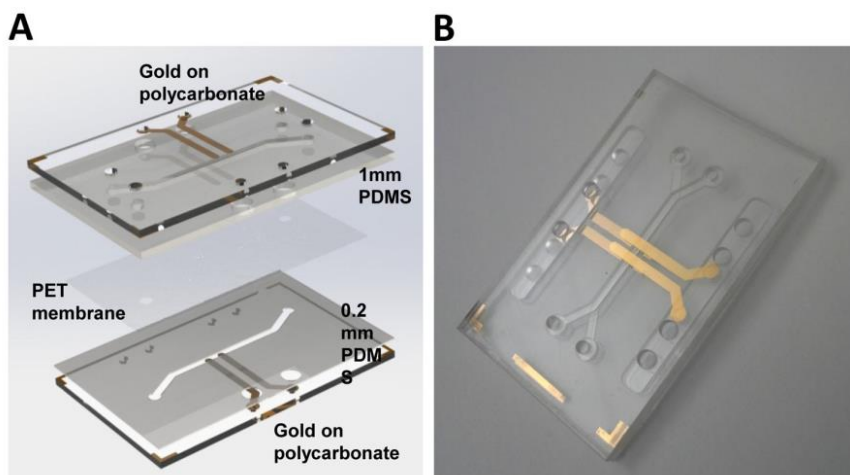
Όπου l_{ch} το μήκος του καναλιού και A_{ch} η επιφάνεια της διατομής του.

Από αυτήν την εξίσωση μπορεί να φανεί ότι σε συμβατικά Transwell συστήματα με chopstick ηλεκτρόδια, η σχετικά μικρή ενεργός επιφάνεια A_{ch} και το σχετικά μεγάλο μήκος καναλιού l_{ch} μπορούν να επιφέρουν μεγάλη αντίσταση R_{ch} για αυτά τα κανάλια. Διακυμάνσεις στη μετρούμενη εμπέδηση μπορούν εύκολα να εμφανιστούν από διαφορές στη θέση των ηλεκτροδίων όταν αυτά επανατοποθετούνται, λόγω του διαφορετικού l_{ch} . Επιπροσθέτως, η ενεργός επιφάνεια A_{ch} μπορεί να αλλάξει αν εμφανιστούν ανομοιογένειες, όπως φυσαλίδες, στο κανάλι. Επίσης, η ειδική αντίσταση ρ είναι ιδιότητα του ηλεκτρολύτη, και εξαρτάται από τη θερμοκρασία και τη σύνθεση. Σαν αποτέλεσμα, η μέτρηση για παράδειγμα σε διαφορετική θερμοκρασία ή συγκέντρωση διαλύματος σαν αποτέλεσμα της εξάτμισης μπορεί να επιφέρει σφάλματα σε συστήματα μονής-συχνότητας, αφού αλλάζει η $R_{blank} = R_{ch}$. Η έλλειψη ελέγχου και προτυποποίησης μπορεί να είναι αιτία σφαλμάτων ακόμα και για ίδιες κυτταρικές σειρές στα συστήματα αυτά [111].

Οι Srinivasan et al. [3] επίσης σημειώνουν την επίδραση της θερμοκρασίας στις μετρήσεις. Συνιστούν οι μετρήσεις ιδανικά να γίνονται μέσα στον επωαστή, ειδάλως να επιτρέπεται η ισοστάθμιση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τουλάχιστον 20 λεπτά πριν γίνει κάθε μέτρηση [3]. Για την περίπτωση όπου οι διακυμάνσεις θερμοκρασίας είναι βλαβερές για τα κύτταρα, και άρα δεν είναι διαθέσιμα τα 20 λεπτά, παραπέμπουν σε μια μελέτη, η οποία αποπειράται να εισάγει διόρθωση της μέτρησης με βάση τη θερμοκρασία (temperature-corrected TEER, tcTEER) [117]. Η διόρθωση αυτή φαίνεται να έχει καλά αποτελέσματα αλλά όχι ιδανικά.

Οι van der Helm M.W. et al. ελαχιστοποιούν τα σφάλματα λόγω θερμοκρασίας και συγκέντρωσης διαλύματος εξασφαλίζοντας δυναμικές συνθήκες ροής μέσα στο organ-on-chip και επιτρέποντας στο δείγμα να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος κάθε φορά που το αφαιρούν από τον επωαστή για να γίνει μέτρηση.

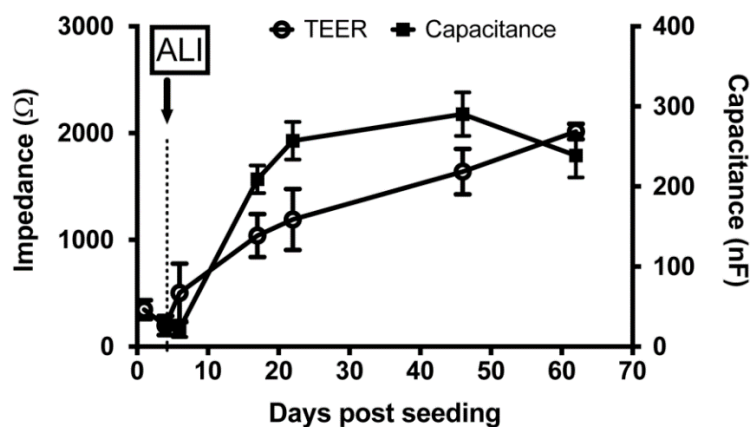
5) Οι Henry OYF et al. [60] κατέληξαν σε αρκετά συμπεράσματα από τις μελέτες BIO-ΦΕ που διεξήγαγαν σε αυτοσχέδιο Organ-on-chip [60]. Για τις μετρήσεις στο σύστημά τους χρησιμοποίησαν μετρήσεις 4 ηλεκτροδίων με όργανο ΦΕ PGstat128N(Metrohm Autolab BV, The Netherlands). Παρατήρησαν ότι η TEER κυριαρχεί στην απόκριση για συχνότητες <math><100\text{Hz}</math>. Η χωρητικότητα μπορεί να εξαχθεί από την καμπύλη σε συχνότητες 100Hz-10kHz. Στα 10 kHz κυριαρχεί πλέον σταθερά η αντίσταση διαλύματος. Αυτό συνάδει με τα ευρήματα των Koutsouras et al. [53] τα οποία αναφέρονται στο υποκεφάλαιο 2.



Σχ.36. Το Organ-on-chip των Henry OYF et al. [60] A)σε CAD μοντέλο. B)σε φωτογραφία. Οι διαστάσεις είναι 25x40mm.(Henry OYF et al. [60])

Επιπρόσθετα έδειξαν ότι για την εκτίμηση παραμέτρων αλλάζοντας τον πυκνωτή στο HIK Randles με ένα CPE υπάρχει καλύτερο ταιρίασμα σε επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου αεραγωγού. Σύμφωνα με περαιτέρω βιβλιογραφία όντως συμβαίνει αυτό για κάποια κύτταρα [64]. Πάντως η εν λόγω βελτίωση συμβαίνει μόνο για την καλλιέργεια σε οριζόντια χρόνου <math><6</math> ημερών.

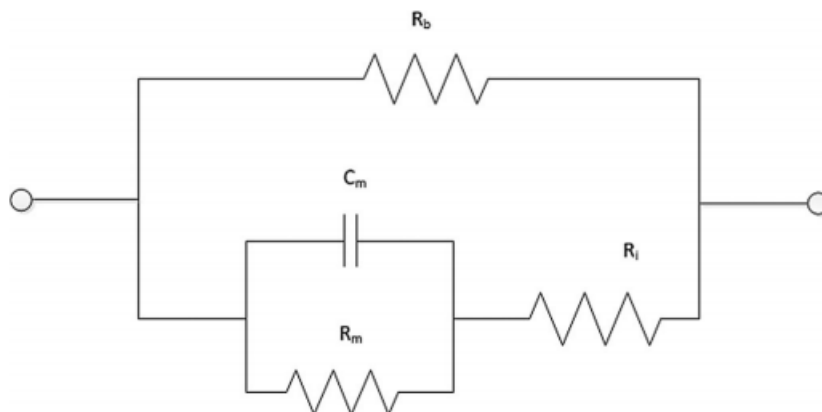
Όπως φαίνεται στο **σχ.37**, μετρήσεις ελήφθησαν τις ημέρες 1, 4, 6, 17, 22, 46 και 62 μετά την εμφύτευση των κυττάρων. Τις πρώτες 6 ημέρες, η TEER είχε διακυμάνσεις από 200 έως 500 Ω , γεγονός συνεπές με το σταδιακό σχηματισμό πυκνού φραγμού. Ο σχηματισμός επιφάνειας αέρα-υγρού (ALI) στην κορυφαία περιοχή, αφού αφαιρέθηκε το θρεπτικό διάλυμα, ξεκινάει από την ημέρα 6 και τελειώνει την ημέρα 62 με την αντίστοιχη χαρακτηριστική πορεία της TEER. Η χωρητικότητα ακολουθεί παρόμοια συμπεριφορά.



Σχ.37. Γράφημα που παρουσιάζει την πορεία των TEER & C_C κατά τη διάρκεια του πειράματος. (Henry OYF et al. [60])

- 6) Οι Qiao et al. [73] διεξήγαγαν καρκινικές μελέτες ΒΙΟ-ΦΕ σε τρεις σειρές κυττάρων:
- επιθετικά κύτταρα ανθρώπινου καρκίνου του μαστού (MDA-MB-231)
 - αρχικού σταδίου κύτταρα ανθρώπινου καρκίνου του μαστού (MCF-7)
 - υγιή κύτταρα ανθρώπινου μαστού (MCF-10A)

Επιχείρησαν να χρησιμοποιήσουν το παρακάτω ΗΙΚ για τη μοντελοποίηση της καλλιέργειας κυττάρων τους:



Σχ. 38. ΗΙΚ που χρησιμοποίησαν οι Qiao et al.(Qiao et Al)

Η αντίσταση R_b χρησιμοποιείται, διότι η καλλιέργεια δεν γίνεται σε transwell σύστημα, αλλά αιωρείται σε μια δεξαμενή όπου υπάρχει δρόμος για το ρεύμα να περάσει χωρίς να διαπερνά το κυτταρικό μονόστρωμα.

Παρακάτω δίνονται τα αποτελέσματα:

	R_b (Ω)	R_l (Ω)	R_m (Ω)	C_m (nF)	RMSE
MCF-10A	833.6	1542.2	1010.3	1.3	3.3
MCF-7	745.8	1474.5	1380.2	0.5	3.2
MDA-MB-231	833.1	1711.1	1000.6	0.7	4.5

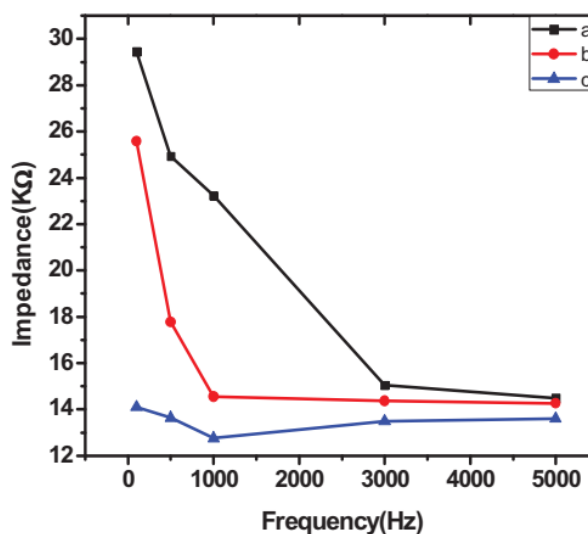
Πίνακας 2. Εκτίμηση παραμέτρων ΗΙΚ για τις σειρές κυττάρων του πειράματος. (Qiao et al.)

Χρήσιμο είναι να θυμόμαστε πως κατά την εκτίμηση παραμέτρων, το RMSE (μέσο τετραγωνικό σφάλμα) έχει τις ίδιες μονάδες με τη ζητούμενη παράμετρο. Εδώ αφορά τις τιμές αντίστασης, που κυμαίνονται στα $\sim 1000 \Omega$. Ένα σφάλμα $RMSE=4$ εδώ αναπαριστά ποσοστιαίο σφάλμα $\sim 0.4\%$.

Γενικά, οι ηλεκτρικές ιδιότητες μπορούν να συσχετιστούν με βιολογικές αλλαγές στις τρεις κυτταρικές σειρές. Αν επικεντρωθούμε στην κυτταρική μεμβράνη, είναι στατιστικά σημαντική η μείωση της χωρητικότητας C_c σε κύτταρα που έχουν πληγεί από καρκίνο σε σχέση με υγιή.

7) Οι Biswas et al. [1]. ανέπτυξαν ένα χαμηλού κόστους σύστημα για ΦΕ αίματος κατσίκας. Χρησιμοποιώντας μια πηγή ρεύματος ακριβείας, πέρασαν γνωστό ρεύμα από το αίμα και μέτρησαν την πτώση τάσης μέσω ενός NI-6009 DAQ συνδεδεμένου με LABVIEW PC. Χρησιμοποίησαν σήματα DC ή 100-5000Hz AC σε χαμηλά ρεύματα ως 16 μ A.

Ο σχεδιασμός των Biswas et al. χρησιμοποιήθηκε για να μετρηθεί η εμπέδηση του αίματος κατσίκας διαφορετικών συνθέσεων. Η ανάλυση του αίματος έδειξε τη χωρητική του φύση, όπως φαίνεται και από την απόκριση συχνότητας στο γράφημα (σχ.39).

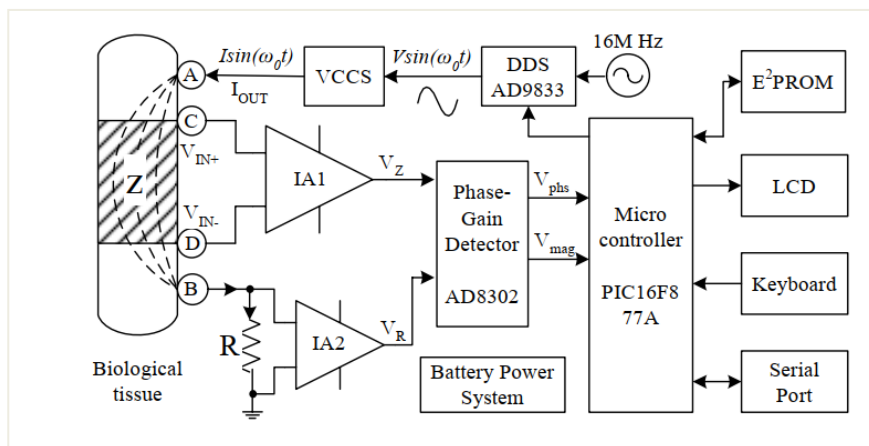


Σχ. 39. Συχνότητα σε συνάρτηση με την εμπέδηση των δειγμάτων αίματος. (Biswas et al., 2012)

Υπάρχει ένας περιορισμός ανώτερης συχνότητας λόγω του NI-9006 DAQ. Οι ίδιοι βρήκαν το σύστημα σταθερό και αποδοτικό στις συγκεκριμένες συχνότητες λειτουργίας.

8) Στην ίδια κατεύθυνση κινείται η υλοποίηση από τους Yuxiang et al. [7], που χρησιμοποιούν ΦΕ για να διαγνώσουν έλκη κατάκλισης στο δέρμα. Χρησιμοποιώντας ένα DDS (direct digital synthesis) IC παρήγαγαν συχνότητες 10Hz-1MHz. Χρησιμοποίησαν την τετραπολική μέθοδο (4-ηλεκτρόδια) με μια πηγή ρεύματος και δύο Kelvin επαφές για να διαβάσουν την πτώση τάσης στο δείγμα. Όπως προαναφέρθηκε οι Kelvin επαφές, γνωστές και ως «τεσσάρων σημείων», εξαιρούν τις επιπτώσεις των ηλεκτροδίων από τη μέτρηση. Έπειτα οι ερευνητές βρίσκουν το πλάτος και τη φάση της εμπέδησης χρησιμοποιώντας μικροελεγκτή και θεωρία κυκλωμάτων.

Προκαταρκτικά, μετρήθηκε η απόκριση ενός 1% film αντιστάτη σε διάφορες συχνότητες. Βρήκαν λιγότερο από 2.5% σφάλμα σε συχνότητες κάτω των 300 kHz (σε υψηλότερες συχνότητες, η επαγωγική συνιστώσα επιδρά σημαντικά). Βρήκαν το σύστημά τους χρήσιμο για τη διάγνωση ελκών κατάκλισης στο δέρμα.



Σχ.40. Το σύστημα των Yuxiang et al. [7].

9) Ένα τελευταίο αξιόλογο παράδειγμα είναι η υλοποίηση των Kuo-Sheng et al. [8]. Χρησιμοποιώντας την ίδια DDS όπως οι προηγούμενοι, παρήγαγαν συχνότητες 0,1-100 kHz σε μια συσκευή χαμηλού κόστους με 2 ηλεκτρόδια.

Οι Kuo-Sheng et al. χρησιμοποίησαν μια αντίσταση 1kΩ και μέτρησαν το σφάλμα εξόδου να περιορίζεται σε <0.25% σε συχνότητες μέχρι 20 kHz, ενώ η αρμονική παραμόρφωση για διάφορες συχνότητες παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3**

Freq. (Hz)	THD (dBc)	THD (%)	Freq. (Hz)	THD (dBc)	THD (%)
100	-52.3	0.245	10k	-52	0.244
500	-51.3	0.273	50k	-51	0.279
1k	-52.4	0.241	100k	-48	0.396
5k	-53.3	0.217	--	--	--

Πίνακας 3. Ολική αρμονική παραμόρφωση της πηγής ρεύματος με φορτίο 1KΩ αντιστάτη. (Imperial decimals) (Cheng et al., 2006)

Πάνω από συχνότητες 10 kHz υπάρχει σημαντική ολίσθηση φάσης στο σύστημα. Σύμφωνα με το συγγραφέα, αυτό λύνεται αν χρησιμοποιηθούν εξαρτήματα υψηλής ταχύτητας (bandwidth, slew rate). Από τα πειραματικά αποτελέσματα, βρίσκουν ότι το σύστημά τους παρουσιάζει καλή απόδοση για κλινικές εφαρμογές.

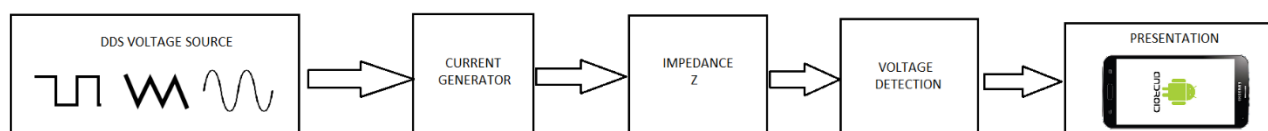
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Σχεδιασμός, Ανάπτυξη και Έλεγχος της Διάταξης.

Τα παραπάνω εγχειρήματα είναι αξιόλογα, ωστόσο δεν έχουν όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Χρειαζόμαστε ένα ολοκληρωμένο σύστημα, φορητό, ασύρματο και χαμηλού κόστους, αν είναι δυνατόν. Επίσης σύμφωνα με τα όσα προαναφέρθηκαν στις εν. 1.4.5.2, 1.4.5.3, 1.4.5.5, κάποια χαρακτηριστικά μεγάλου εύρους ζώνης που πολλά όργανα διαθέτουν δεν συνεισφέρουν ιδιαίτερα στην εφαρμογή που εξετάζεται στην παρούσα εργασία και συνεπώς μπορούν να παραληφθούν, περιορίζοντας έτσι το κόστος και την περιπλοκότητα του συστήματος.

Όσον αφορά το ηλεκτρονικό κομμάτι, παρουσιάζεται ένα εργαστηριακό πρωτότυπο με βασική διαμόρφωση η οποία ακολουθεί αυτή που προτείνεται από τους Yuxiang et al. [7] (Σχ. 40). Η βασική δομή του συστήματος απεικονίζεται στο σχ.41 και το σύστημα έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Προσαρμοστικότητα σε πεδίο συχνοτήτων που επιθυμεί ο χρήστης. Θα λειτουργεί σε συχνότητες 10Hz-10kHz, διότι όπως προαναφέρθηκε, η χωρητική συμπεριφορά των δειγμάτων εξαλείφεται σε συχνότητες μεγαλύτερες των 10 kHz και υπάρχει σταθεροποίηση της απόκρισης μέτρου-φάσης. Επιπροσθέτως το πλατώ που δημιουργείται στις χαμηλές συχνότητες καθιστά ρεαλιστικό τον ορισμό ελάχιστης συχνότητας στα 10Hz [49,57,60]. Το βήμα συχνότητας καθορίζεται κατ' ελάχιστο στα 10Hz. Θα χρησιμοποιηθεί το DDS (direct-digital-synthesizer) AD9833, που μπορεί να υπερκαλύψει το εν λόγω εύρος. Το εν λόγω IC έχει εύρος συχνότητας εξόδου 0-12,5MHz, ακρίβεια συχνότητας 0,1Hz και ολική αρμονική παραμόρφωση (THD) από -66 ως -56 dBc. (Η THD εκφράζει το περιεχόμενο του σήματος σε ανεπιθύμητες αρμονικές.)
- Ακριβής ανάγνωση φάσης του δείγματος σε συχνότητες έως και 300Hz. Έως το 1kHz μπορεί να παρατηρηθεί η διαφορά φάσης της απόκρισης του δείγματος, ωστόσο με μειωμένη ακρίβεια. Ο λόγος γι' αυτό είναι η αδυναμία ακριβούς ανάγνωσης φάσης σε υψηλότερες συχνότητες λόγω ανεπαρκούς συχνότητας δειγματοληψίας ενός απλού μικροελεγκτή. Το μέτρο $|Z|$ ανιχνεύεται χωρίς πρόβλημα έως τα 10kHz.
- Δυνατότητα πειραματισμού με τρεις κυματομορφές. Ημίτονο/τρίγωνο/τετράγωνο. Ο έλεγχος των κυματομορφών εισόδου γίνεται πολύ γρήγορα μέσω του πρωτοκόλλου σειριακής επικοινωνίας SPI. Η SPI επικοινωνία δεν επηρεάζει το θόρυβο μέτρησης, καθώς γίνεται εκτός των περιόδων που εκτελούνται οι μετρήσεις.
- Χρησιμοποιεί το wifi-enabled CC3200 mcu της TI, ώστε η διαδικασία να ελέγχεται ασύρματα και τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται σε φορητή συσκευή με λειτουργικό σύστημα ANDROID. Η σύνδεση είναι ad-hoc με wpa2 ασφάλεια. Ιδιαίτερη μέριμνα έχει ληφθεί, ώστε το wifi να μην επηρεάζει ιδιαίτερα το θόρυβο μέτρησης.

- Το ρεύμα στο φορτίο έχει μέση τιμή 0 (μόνο AC σήματα). Επίσης πρέπει $I_{p-p} < 50\mu A$, όπως περιγράφηκε στην εν.1.2.4.1. Στην προτεινόμενη προσέγγιση χρησιμοποιείται ρεύμα $\approx 20\mu A$ p-p.
- Γαλβανοστατική, 4-σημείων μέτρηση.
- ≈ 7 s για την εξαγωγή της κάθε φασματικής απόκρισης, και επιλεγόμενο από τον χρήστη μεσοδιάστημα για τη λήψη κάθε απόκρισης 60s-24h.
- Εύρος μετρούμενων τιμών εμπέδησης: 10Ω - $50k\Omega$
- Επιβεβαιωμένη θερμοκρασία λειτουργίας 10 - $50^\circ C$. Απαραίτητο μιας και ο επωαστής λειτουργεί στους $37^\circ C$.
- $\approx 80mA$ κατανάλωση ρεύματος εν ώρα λειτουργίας.
- Απαιτούμενη τάση εισόδου $3,5$ - $5,5V$. Δυνατότητα λειτουργίας και με μπαταρίες.
- Φορητότητα. Μπορεί να λειτουργήσει με μία μπαταρία λιθίου ή από φορτιστή κινητού.
- Σχετικά χαμηλού κόστους και ολοκληρωμένο σαν κύκλωμα. -->BOM $\approx 30\text{€}$
- Η πλακέτα μπορεί με κάποιες αλλαγές να χρησιμοποιηθεί και για άλλα πειράματα ΦΕ, όπως έρευνα σε μπαταρίες.
- Χρησιμοποιείται AC σύζευξη στα ηλεκτρόδια μέτρησης προς αποφυγή της τυχούσας παραμένουσας τάσης DC, που εμποδίζει τη μέτρηση.



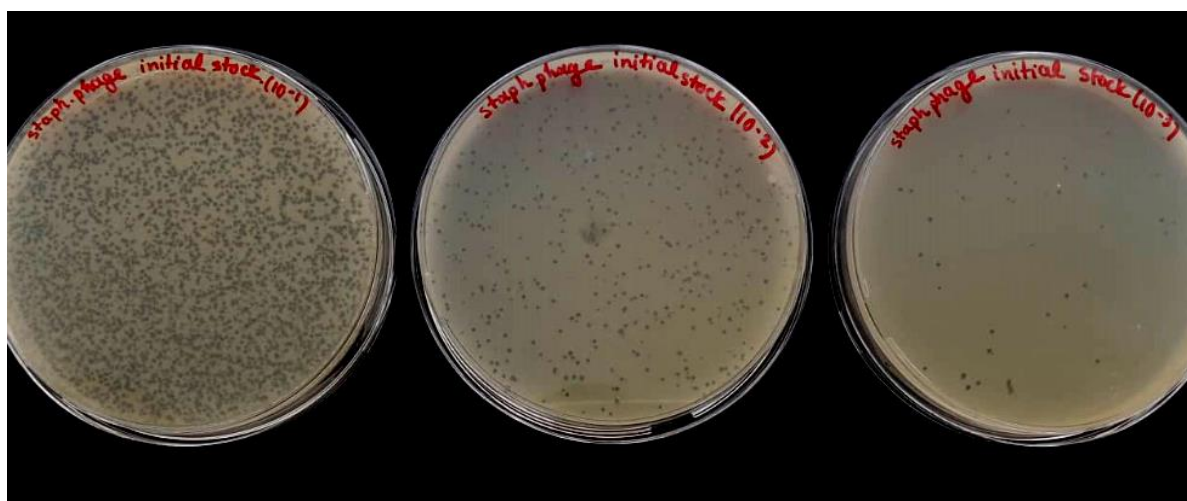
Σχ.41. Block διάγραμμα του συστήματος.

1) Η ευρύτερη διάταξη

Η μικροβιακή αστάθεια στο άσθμα μπορεί να σχετίζεται ή/και να οφείλεται σε υποβόσκουσα αστάθεια φάγων. Η παρούσα προσπάθεια σε συνεργασία με το εργαστήριο της Β' παιδιατρικής κλινικής του ΕΚΠΑ, αποπειράται τη διερεύνηση των τριμερών αλληλεπιδράσεων και τις συμβιωτικές/ανταγωνιστικές σχέσεις μεταξύ βακτηρίων, φάγων και επιθηλιακών κυττάρων με στόχο την καλύτερη κατανόηση της επίδρασης των φάγων στην υγεία και ασθένεια. Συγκεκριμένα αναπτύσσεται ένα σύστημα in-vitro μελέτης μέσω μικρο-ρευστομηχανικής συσκευής που επιτρέπει την προσομοίωση του βλεννογόνου επιθηλίου επιτρέποντας συνεχή ροή βακτηρίων και φάγων στις επιθηλιακές επιφάνειες.

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά **Beas-2b (B2b)** όπως και ανθρώπινα ρινικά κύρια επιθηλιακά κύτταρα (**HNPECs**). Τα HNPECs διαθέτουν ανοσολογικούς υποδοχείς και είναι ικανά να διαισθανθούν πληθώρα περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, συμβάλλοντας στην ενεργοποίηση της ανοσοαπόκρισης. Όταν τα HNPECs καλλιεργούνται σε συνθήκες ALI (επιφάνειας αέρα-υγρού), μπορούν να διαμορφωθούν σε ψευδο-πολύστιβο επιθήλιο. Το καλά διαμορφωμένο επιθήλιο αποτελείται από βλεφαριδωτά κύτταρα και κύτταρα βλεννογόνου και αναπτύσσει υψηλή TEER που όπως έχει αναφερθεί στα προηγούμενα κεφάλαια αποτελεί ένδειξη του φραγμού. Τα εν λόγω κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη ανοσοαποκρίσεων και την επίδραση διαφορετικών ερεθισμάτων στο φραγμό σε *in vitro* συνθήκες.

Η συλλογή βακτηρίων και φάγων επετεύχθη σε συνεργασία με το μικροβιολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου Παναγιώτη και Αγλαΐας Κυριακού. Συλλέχθηκαν κλινικά στελέχη *S. aureus* (40 στελέχη), *P. aeruginosa* (15 στελέχη), *S. pneumoniae* (40 στελέχη), *M. catarrhalis* (20 στελέχη), *H. influenzae* (21 στελέχη) and *A. baumannii* (30 στελέχη).



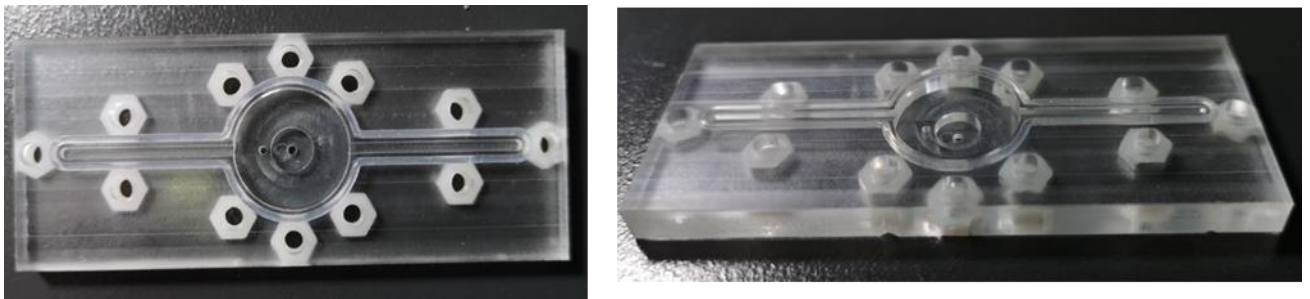
Σχ. 42. Καλλιέργειες από στελέχη φάγων staphylococcus. (B' παιδιατρική κλινική, ΕΚΠΑ)

Το μικρορευστομηχανικό μέρος της συσκευής περιέχει την καλλιέργεια των επιθηλιακών κυττάρων μαζί με τα θρεπτικά διαλύματα. Η κατασκευή επίσης περιέχει τα απαραίτητα ηλεκτρόδια, ώστε να γίνονται οι μετρήσεις BIO-ΦΕ/ TEEI. Επιπρόσθετα, το σύστημα κρίνεται σκόπιμο να κυκλοφορεί και να ανανεώνει το θρεπτικό διάλυμα αυτόματα. Μια δυνατότητα για εισαγωγή βακτηρίων/ φάγων στα κύτταρα είναι τέλος απαραίτητη. Το σύστημα αυτό κατασκευάστηκε από τον Κούτση Τζ. στα πλαίσια της διδακτορικής του διατριβής με τίτλο «Ενσωματωμένα Συστήματα με Ρευστομηχανικές Διατάξεις για Βιοϊατρικές Εφαρμογές με Έμφαση σε Αναπνευστικά προβλήματα» και τα πειράματα έγιναν και γίνονται από τον ίδιο σε συνεργασία με το εργαστήριο της Β' παιδιατρικής κλινικής του ΕΚΠΑ.

Η δομή σχεδιάστηκε σε λογισμικό CAD (computer-aided-design) και κατασκευάστηκε σε υψηλής ακρίβειας σύστημα 3D μικρο-κατεργασίας (Colinbus Laboflex Pro 30/HF).

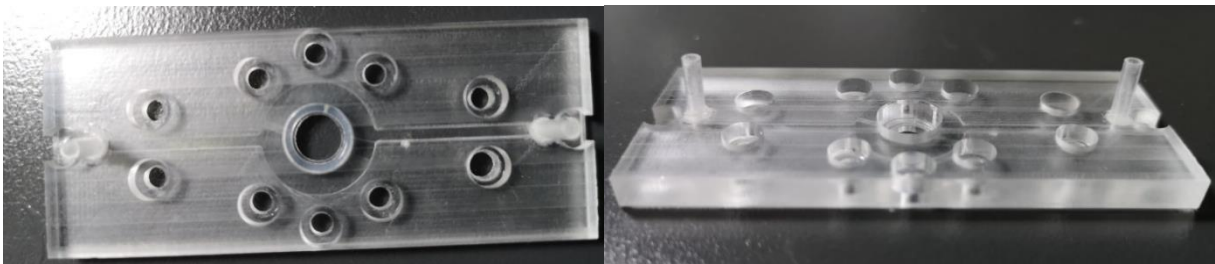
Στο 1^ο στάδιο το σύστημα κατασκευάστηκε σε πολυκαρβονικό (PC) υπόστρωμα. Το συγκεκριμένο υλικό αξιολογήθηκε και απεδείχθη συμβατό με τα κύτταρα υπό μελέτη. Σε αυτή, τη φάση σχηματίστηκαν και τα μικρο-κανάλια με τη μικρο-δεξαμενή. Οι διαστάσεις των καναλιών είναι 1,5mm x 1mm x 2,25mm (πλάτος, βάθος, ύψος αντιστοίχως). Η μικρο-δεξαμενή, όπου θα βρίσκεται και το διάλυμα, έχει κυκλικό σχήμα διαμέτρου 16mm, και βάθος 2,5mm, το οποίο διαμορφώνει τον όγκο της δεξαμενής στα 0,5ml. Τα ηλεκτρόδια δεν ενσωματώθηκαν σε αυτή τη φάση, μιας και πρώτα έπρεπε να εξακριβωθούν οι ρευστομηχανικές παράμετροι του συστήματος.

Το κάτω μέρος της κατασκευής παρουσιάζεται στο **σχ.43**. Τα μικρο-κανάλια εμφανίζονται μαζί με τη μικρο-δεξαμενή, η οποία βρίσκεται κάτω από την πορώδη μεμβράνη. Δεικνύονται επίσης οι τρύπες για τις βίδες, που διασφαλίζουν την αδιαβροχοποίηση της κατασκευής.



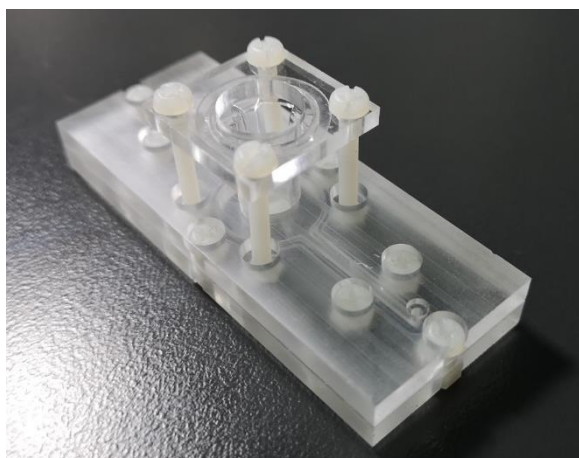
Σχ. 43. Το κάτω μέρος της μικρορευστομηχανικής κατασκευής.

Το κάλυμμα της κατασκευής παρουσιάζεται στο **σχ.44**, όπου φαίνονται ξεκάθαρα η εισαγωγή και η εξαγωγή. Το μέρος αυτό μονώνει τον πάτο του μικρο-καναλιού εκτός από το πάνω μέρος της μικρο-δεξαμενής, όπου θα βρίσκονται το transwell πηγάδι με το μονοστρώμα κυττάρων.

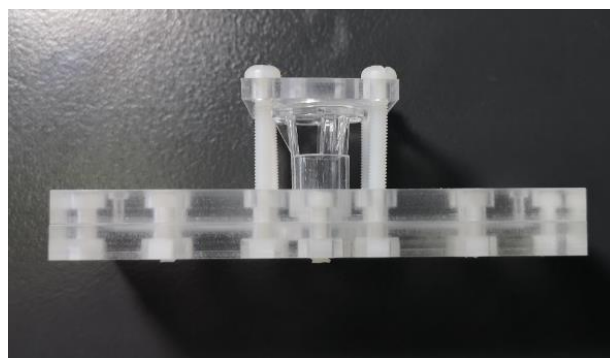


Σχ.44. Το πάνω μέρος της μικρορευστομηχανικής κατασκευής.

Η συναρμολογημένη μικρορευστομηχανική κατασκευή φαίνεται στο **σχ.45**. Το πηγάδι transwell βρίσκεται στερεωμένο στην κορυφή της μικρο-δεξαμενής.



(α)



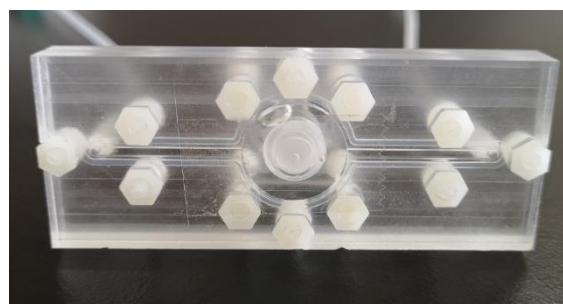
(β)

Σχ.45. Η μικρορευστομηχανική κατασκευή συναρμολογημένη.

Η μικρορευστομηχανική κατασκευή συναρμολογημένη και συνδεδεμένη με τις παροχές εισόδου/εξόδου αποτυπώνεται στο **σχ.46**.



(α)



(β)

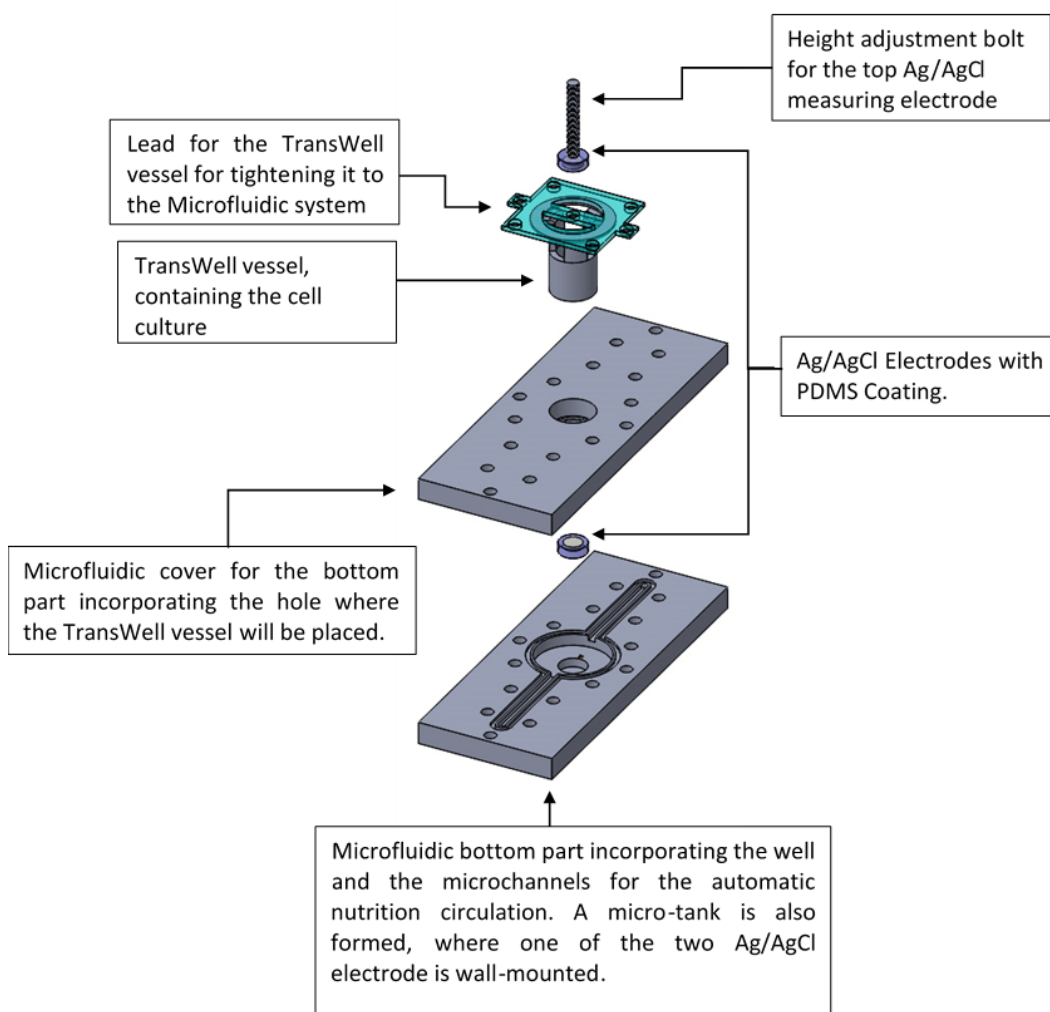
Σχ.46. Η μικρορευστομηχανική κατασκευή συναρμολογημένη και συνδεδεμένη με τις παροχές εισόδου/εξόδου.

Δεδομένου ότι η ροή ρευστών στα μικρορευστομηχανικά δημιουργείται από την πίεση, μια αντλία σύριγγας (syringe pump) χρησιμοποιείται για την κυκλοφορία υγρού στην κατασκευή όπως φαίνεται στο **σχ.47**. Η κυκλοφορία του διαλύματος είναι συνεχής και πλήρως αυτοματοποιημένη, έτσι η ανθρώπινη επίδραση στο πείραμα ελαχιστοποιείται και οι συνθήκες πλησιάζουν περισσότερο στο *in vivo* περιβάλλον.



Σχ.47. Η μικρορευστομηχανική κατασκευή συνδεδεμένη με μια αντλία σύριγγας. Η εκροή καταλήγει σε άδειο δοχείο.

Στο επόμενο στάδιο τα μικρο-ηλεκτρόδια ενσωματώνονται στο μικρορευστομηχανικό σύστημα, προκειμένου να γίνονται οι ηλεκτρικές μετρήσεις ΤΕΕΙ.



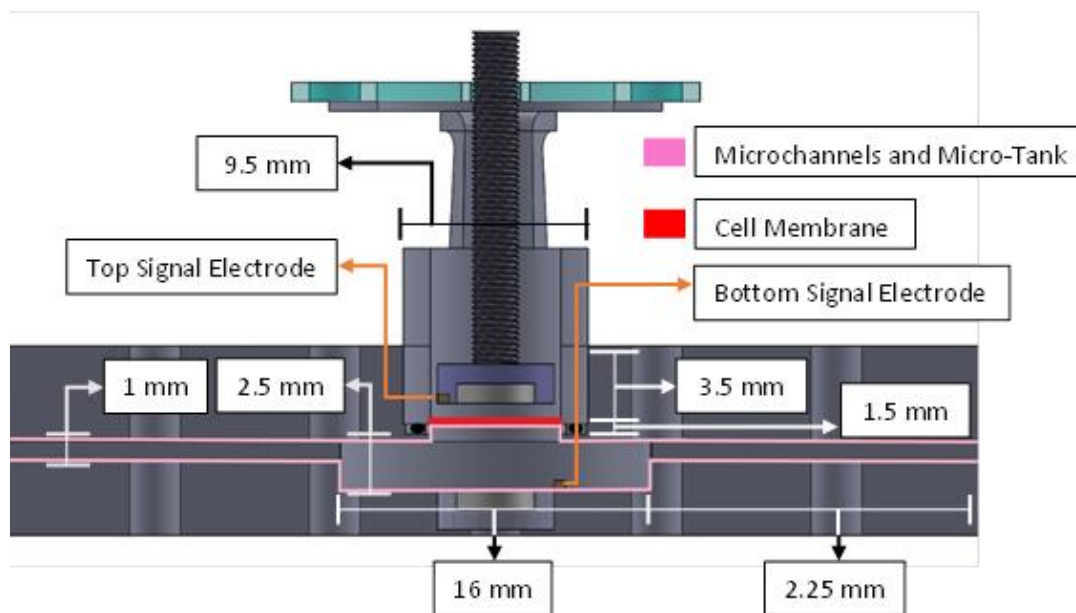
Σχ.48. Τα κύρια μέρη της μικρορευστομηχανικής κατασκευής.

Τα κύρια μέρη της τελικής κατασκευής παρουσιάζονται στο **σχ.48**. Το κύριο μέρος αποτελείται από τα πάνω και κάτω καλύμματα που περιεγράφηκαν προηγουμένως. Δημιουργείται μια μικρο-δεξαμενή, στον πάτο της οποίας τοποθετείται το ένα ηλεκτρόδιο μέτρησης τάσης Ag/AgCl. Ο χώρος που διατίθεται στο ηλεκτρόδιο είναι 6mm σε διάμετρο, 2mm βάθος και έχει μια τρύπα διαμέτρου 1mm στο κέντρο για τη διασύνδεση της γραμμής του ηλεκτροδίου. Το πηγάδι τοποθετείται στο πάνω μέρος της κατασκευής όπως φαίνεται και στο σχήμα. Το καπάκι του πηγαδιού, που λειτουργεί και σαν αποστάτης, κρατά τη μεμβράνη σε σταθερή θέση στη μικρο-δεξαμενή. Το πάνω ηλεκτρόδιο μέτρησης τάσης Ag/AgCl βρίσκεται σε ειδικά επιλεγμένη βίδα που επιτρέπει ακριβή ρύθμιση του ύψους. Τα δύο κυκλικά ηλεκτρόδια μέτρησης τάσης Ag/AgCl φαίνονται στο σχήμα. Τα δύο επιχρυσωμένα ηλεκτρόδια που φέρουν το ρεύμα εισόδου βρίσκονται κοντά στα αντίστοιχα ηλεκτρόδια μέτρησης τάσης. Η κατασκευή

προορίζεται για μεμβράνες transwell διαμέτρου 6.5mm, όμως εύκολα προσαρμόζεται και για transwell διαμέτρου 12mm.

Τα ηλεκτρόδια είναι ενσωματωμένα στο μικρορευστομηχανικό σύστημα, οπότε μπορούν να λαμβάνονται πιο αξιόπιστες και επαναλήψιμες μετρήσεις.

Συναρμολογημένα τα κάτω και πάνω μέρη έχουν μήκος 75mm, πλάτος 30mm και ύψος 10mm. Στο **σχ.49** αποτυπώνεται μια τομή της κατασκευής με το πηγάδι.



Σχ.49. Τομή της κατασκευής με τις αντίστοιχες διαστάσεις.

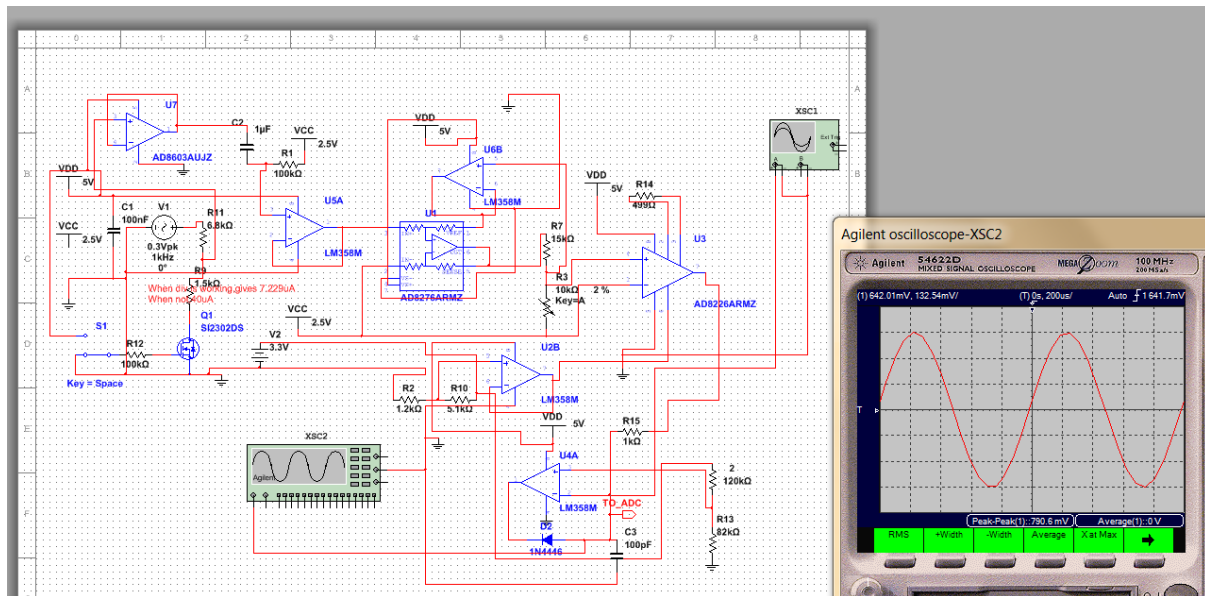


Σχ.50. Η μικρορευστομηχανική διάταξη συνδεδεμένη με την αντλία σύριγγας και την εξαγωγή. Στο πηγάδι περιέχει και την καλλιέργεια κυττάρων. Το ροζ υγρό είναι θρεπτικό διάλυμα κυττάρων.

Η κατασκευή αξιολογήθηκε υπό πραγματικές συνθήκες και δεν βρέθηκαν διαρροές.

2) Προσομοίωση

Για να εξετάσουμε την αναλογική πλευρά του κυκλώματος προβήκαμε σε προσομοιώσεις στο Multisim (National Instruments Corporation, Austin, Texas) (όπως φαίνεται στο σχ.51.). Τα στοιχεία του κυκλώματος αναλύονται στην παρακάτω ενότητα.



Σχ.51. Προσομοίωση στο multisim.

Το παραπάνω κύκλωμα έχει αντίσταση φορτίου 200Ω και στην είσοδο ο διαιρέτης είναι OFF.

Όπως φαίνεται από τον παλμογράφο, στην έξοδο λαμβάνουμε σήμα $\approx 800\text{mV}$ p-p. Ο μικροελεγκτής εκτελεί την πράξη:

$$Z = \frac{V_{ac}}{I_{ac}} = \frac{800\text{mV}}{100 \cdot 40\mu\text{A}} = 200\Omega \quad (\text{εξ.23})$$

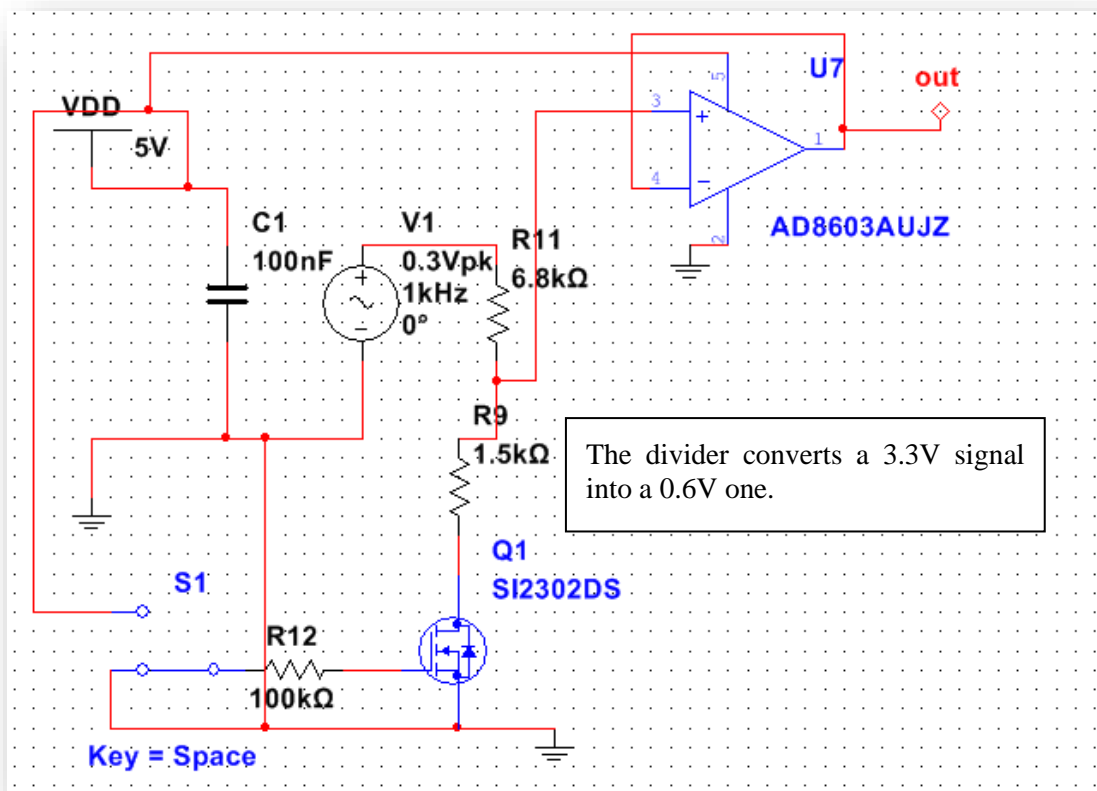
Με τον τρόπο αυτό εξάγεται το πλάτος της εμπέδησης. Για την ανίχνευση φάσης απλά συγκρίνονται τα χρονικά σημεία από κορυφή σε κορυφή μεταξύ σημάτων εισόδου και εξόδου.

Αναλυτικά τα μέρη του κυκλώματος:

1. Γεννήτρια κυματομορφών και διαιρέτης τάσης:

Αρχικά προσομοιώνεται η IC γεννήτρια κυματομορφών AD9833, η οποία σε λειτουργία τριγώνου και ημιτόνου έχει έξοδο $0.6V_{ac}$ peak-peak & $0.3V_{dc}$ bias. Στη συνέχεια υπάρχει διαιρέτης τάσης ελεγχόμενος από MOSFET όσο το δυνατόν χαμηλής $R_{DS(on)}$ και C_{DS} . Με αυτόν πετυχαίνουμε την εξίσωση του τετραγωνικού παλμού (που κυμαίνεται στα 0-3,3v) από το DDS με τον ημιτονοειδή και τον

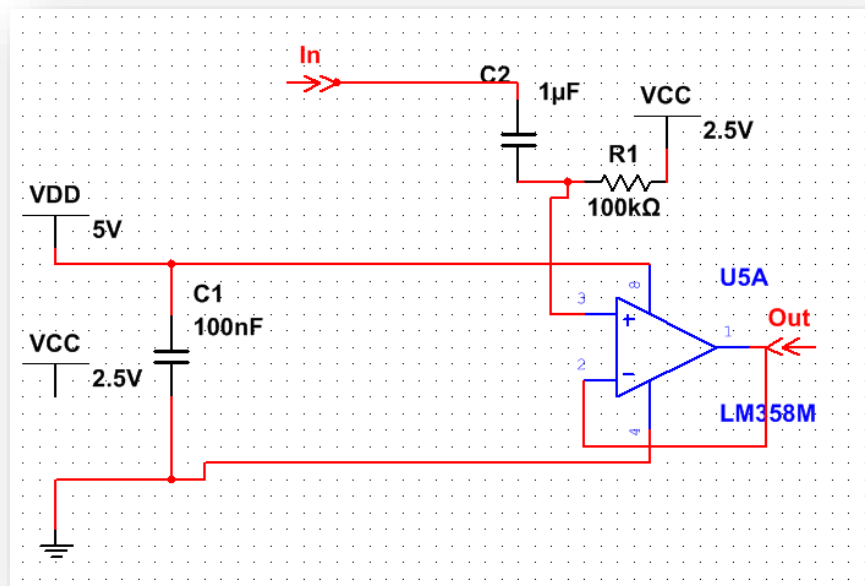
τριγωνικό (σχ.52). Ο τελεστικός ακριβείας (U7) είναι απαραίτητος για την αποφυγή παραμόρφωσης, καθώς το σήμα φτάνει κοντά στα 0V.



Σχ.52. Η πηγή κυματομορφών και ο διαιρέτης τάσης.

2. AC σύζευξη

Προκειμένου να κρατήσουμε το κύκλωμα απλό και χωρίς θόρυβο αποφεύγουμε τη δημιουργία αρνητικών τάσεων και προτιμάμε την πόλωση του σήματος AC γύρω από ένα μέσο DC σημείο. Για να έχουμε τη μέγιστη δυνατή μεταβολή τάσης Κορυφής-Κορυφής (MPP) για την πηγή ρεύματος, το σημείο αυτό πρέπει να είναι το μέσο της τάσης τροφοδοσίας. Μιας και η τάση τροφοδοσίας του κυκλώματος δεν είναι δεδομένη (λειτουργία και με μπαταρίες), χρησιμοποιείται τελεστικός ενισχυτής με διαιρέτη τάσης $V_{dd}/2$ για τη δημιουργία του. Στο σχ.53 παρουσιάζεται μια μέση λήψη τάσης 2.5V(V_{cc}) που παίρνουμε κατά την τροφοδοσία με usb(5V), και η AC σύζευξη με το σήμα που πήραμε από το σχ.52.

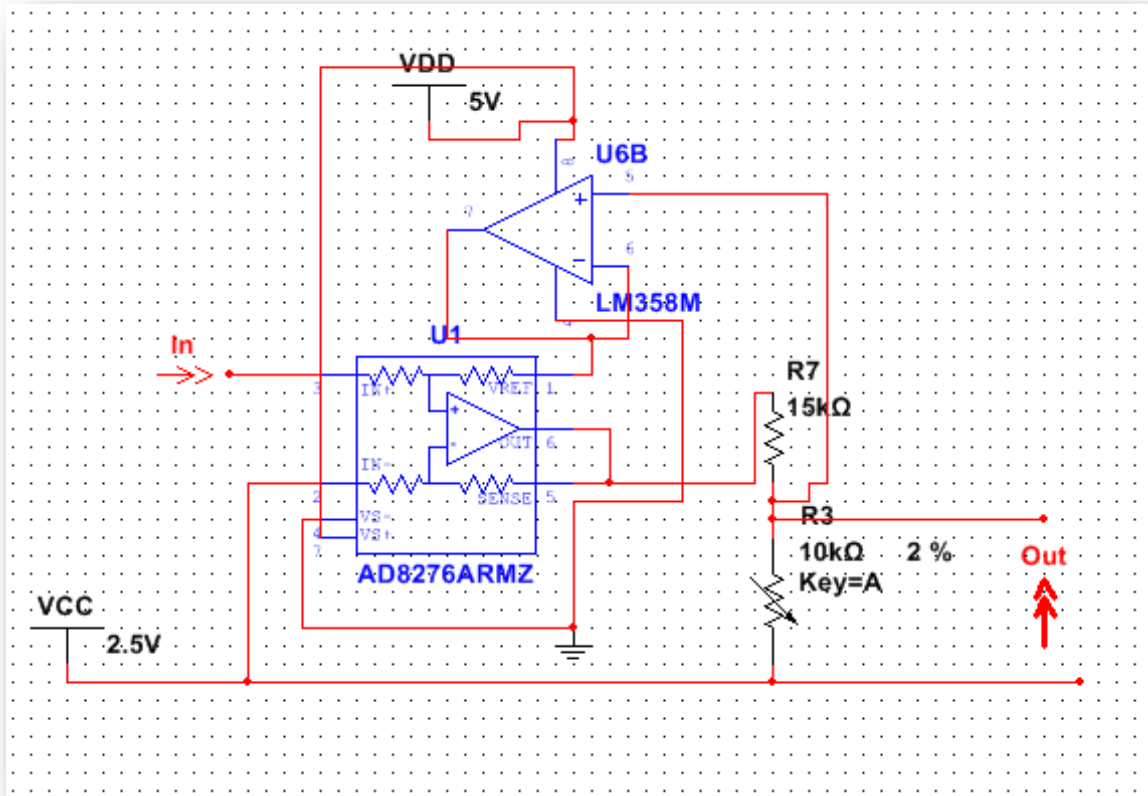


Σχ.53. Σύζευξη του AC σήματος και της DC τάσης πόλωσης. Το σήμα εξόδου δεν φτάνει κοντά στα άκρα τροφοδοσίας και άρα ένας γενικού σκοπού LM358 αρκεί.

Το φίλτρο που σχηματίζεται έχει κάτω συχνότητα αποκοπής 1,59Hz και σταθερά χρόνου 0,1s. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι στα 10Hz το σήμα δεν επηρεάζεται, και επίσης σε 0,3s αφού εφαρμοστεί ισχύς το κύκλωμα έχει σταθεροποιηθεί και είναι σε θέση να κάνει μετρήσεις.

3. Πηγή ρεύματος ακριβείας

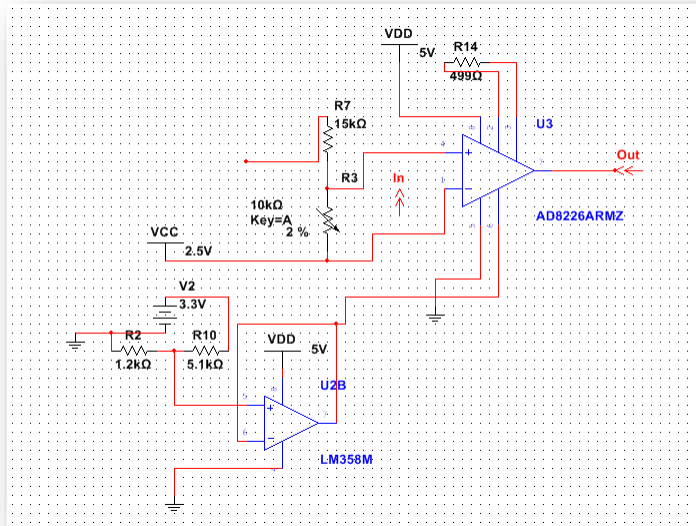
Δεδομένου ότι για την εφαρμογή απαιτείται η παραγωγή μικρού ρεύματος με μεγάλη ακρίβεια, επιλέχτηκε η προσέγγιση της πηγής ρεύματος τύπου howland. Το συγκεκριμένο σχέδιο που παρουσιάζεται στο **σχ.54** έχει παρθεί από την πρόταση της Analog Devices [47] και ονομάζεται βελτιωμένη πηγή howland. Η $R7=15k\Omega$ ρυθμίζει το ρεύμα εξόδου σε 40μΑ κορυφή-κορυφή για είσοδο 0,6V κορυφή-κορυφή.



Σχ.54. Βελτιωμένη πηγή howland πολωμένη στα 2,5V. Η R3 αναπαριστά την εμπέδηση φορτίου.

4. Ανίχνευση τάσης φορτίου

Για την ανίχνευση της τάσης στο φορτίο χρησιμοποιείται τελεστικός οργανολογίας (in-amp) AD8226(U3) ο οποίος ήταν ο φθηνότερος που πληροί τα κριτήρια ακρίβειας από όσους δοκιμάστηκαν. Η R14 προσδίδει κέρδος $\times 100$ για την προσομοίωση. Ο U2B δημιουργεί μια τάση 0,7V. Αυτή χρησιμοποιείται σαν τάση πόλωσης στον AD8226, με σκοπό να έχουμε ένα μέγιστο AC σήμα εξόδου μέχρι $2 \times 0,7 = 1,4V$ MPP. Η τάση αυτή είναι το όριο μέτρησης και λειτουργίας του ADC του μικροελεγκτή.

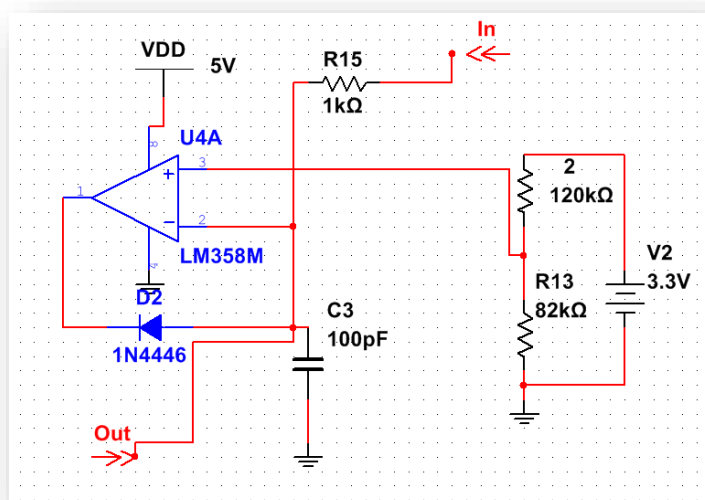


Σχ.55. Τελεστικός οργανολογίας και πόλωση στα 0,7V.

5. Ψαλιδιστής και χαμηλοπερατό φίλτρο ADC.

Το κύκλωμα που παρουσιάζεται στο σχ.56 έχει διπλό ρόλο.

- Ο U4A μαζί με την D2 και το R15 είναι ψαλιδιστής (clipper), προστασία για να μην καταστραφεί ο ADC αν το σήμα υπερβεί τα 1.4V.
- Τα C3 και R15 σχηματίζουν το απαραίτητο φίλτρο για την είσοδο του ADC, όπως προτείνει το φύλλο δεδομένων (datasheet) του AD8226 [9]



Σχ.56. Ψαλιδιστής και χαμηλοπερατό φίλτρο ADC.

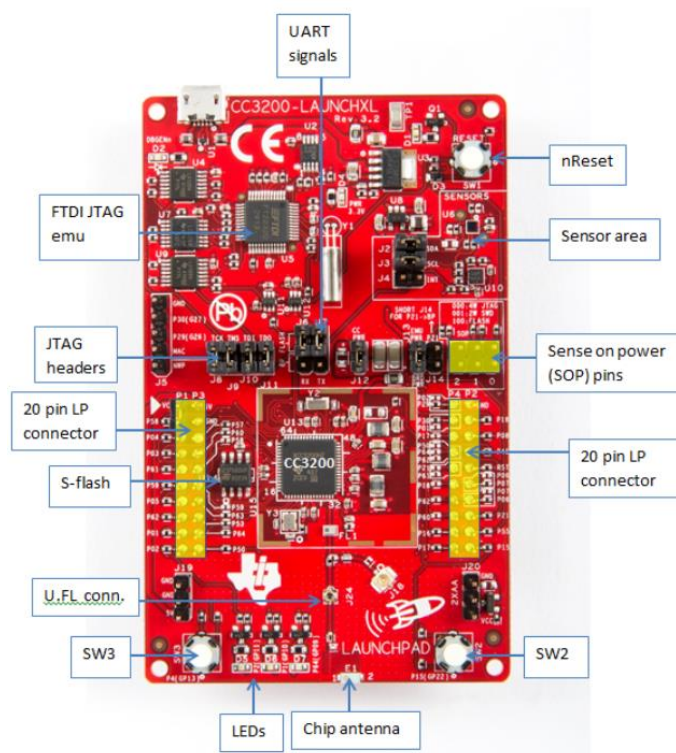
3) Ο Μικροελεγκτής TI CC3200

Για τον έλεγχο του συστήματος και την επεξεργασία των σημάτων είναι απαραίτητη η χρήση ενός μικροελεγκτή. Δεδομένου ότι σύμφωνα με τις προδιαγραφές που τέθηκαν απαιτείται ασύρματος έλεγχος της συσκευής, επιλέχτηκε το CC3200 MCU της Texas Instruments (Dallas, Texas, USA).

Ο CC3200 είναι μικροελεγκτής ARM αρχιτεκτονικής διπλού πυρήνα. Υπάρχει WIFI ενσωματωμένο στο IC που ελέγχεται από τον 2ο πυρήνα (network processor, NWP). Οι εντολές για τον NWP είναι όπως στο linux (berkeley sockets). Η συχνότητα λειτουργίας του IC είναι 80MHz. Ο NWP αποφορτίζει πλήρως τον κύριο πυρήνα από την WIFI επικοινωνία και προσφέρει μεταξύ άλλων λειτουργία σημείου πρόσβασης (ACCESS POINT) και ασφάλεια WPA2.

Κρίσιμης σημασίας είναι ο 12-bit ADC 4-καναλιών που διαθέτει με 62,5 KSPS ανά κανάλι. Μπορεί να λειτουργήσει ομαδικά για δειγματοληψίες 250KSPS.

Η ανάπτυξη έγινε χρησιμοποιώντας το αναπτυξιακό CC3200-LAUNCHXL (σχ.57), που προσφέρει 4-καλωδίων JTAG debugger ενσωματωμένο στην πλακέτα με τη δυνατότητα να συνδεθεί εξωτερικά (JTAG HEADERS), προκειμένου να γίνει ζωντανή αποσφαλμάτωση (debugging) στην εκάστοτε πειραματική πλακέτα. Η φόρτωση του προγράμματος στη μνήμη FLASH επιτυγχάνεται μέσω UART.



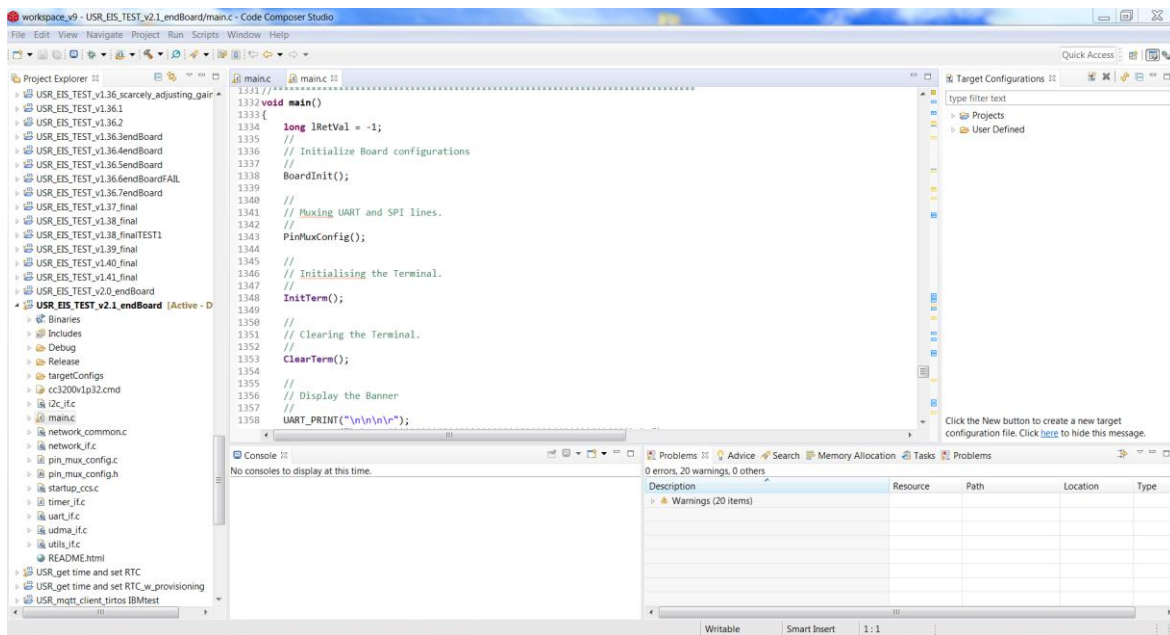
Σχ.57. Αναπτυξιακό CC3200-LAUNCHXL.(Texas Instruments)

Για ορθή πρακτική το κύκλωμα της κεραίας του WIFI θα πρέπει να εγκριθεί από αρμόδιες αρχές για να εκπέμπει. Για να παρακάμψουμε αυτό τον περιορισμό, καταφύγαμε σε έτοιμα module με την κεραία ήδη τυπωμένη επάνω, τα οποία είναι ήδη εγκεκριμένα για να εκπέμπουν (σχ.58).



Σχ.58. CDSNET E103-W02. Η κεραία διακρίνεται πάνω αριστερά. Τα modules κοστίζουν περί τα 10€ και έχουν πιστοποίηση CE. (CDSNET)

Η κατασκευάστρια ΤΙ παρέχει δωρεάν περιβάλλον ανάπτυξης (IDE) για τα συστήματά της. Το περιβάλλον αυτό λέγεται Code Composer Studio και είναι βασισμένο στην πλατφόρμα eclipse. Έτσι αποφεύγονται τα παλαιότερα περιβάλλοντα ανάπτυξης και η προμήθεια ακριβών αδειών για αυτά.

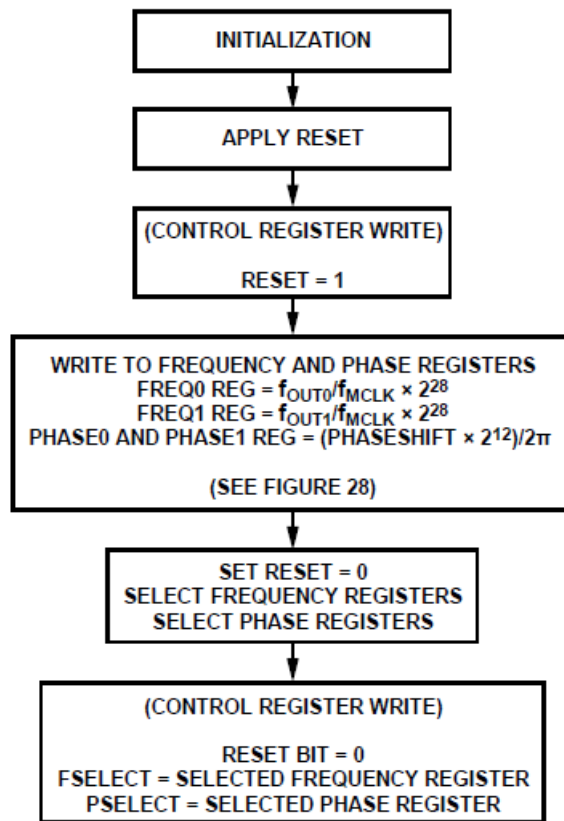


Σχ.59. Code Composer Studio. (Texas Instruments)

4) Πρακτική υλοποίηση-DDS

Αρχικά κατασκευάστηκε το πρόγραμμα στον μικροελεγκτή για το DDS, ώστε να επιβεβαιωθεί η ορθή λειτουργία του.

Ο έλεγχος γίνεται πολύ γρήγορα μέσω SPI. Για να ελεγχθεί το DDS από τον μικροελεγκτή λαμβάνουμε υπόψη το ακόλουθο διάγραμμα ροής:



Σχ. 60. Διάγραμμα ροής για τη λειτουργία του DDS. (Analog devices)

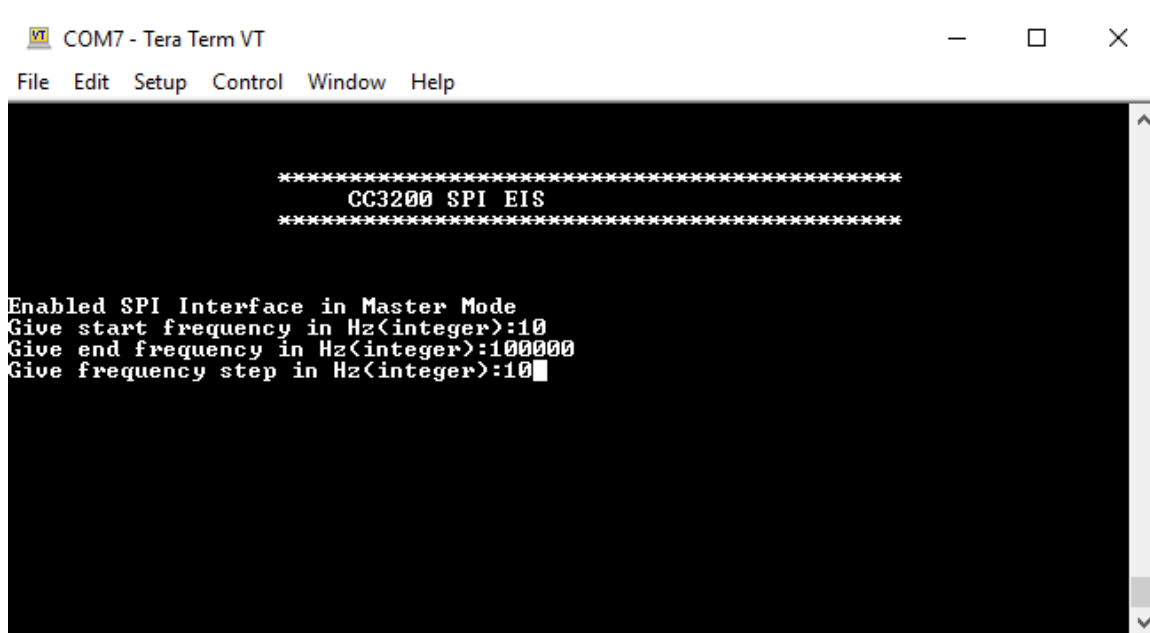
Ουσιαστικά όταν ξενικά η συσκευή, για να δώσει έξοδο πρέπει να εφαρμοστεί reset, να εισαχθούν στον control register τα στοιχεία για την κυματομορφή που θέλουμε και να επιλεγεί η τιμή της συχνότητας και της φάσης. Έπειτα απενεργοποιείται το reset και η έξοδος λειτουργεί.

Η συνάρτηση που δίνει την τιμή του καταχωρητή FREQREG σύμφωνα με το φύλλο δεδομένων είναι

$$FREQREG = \frac{F_{out} * 2^{28}}{Mclk} \quad (\epsilon\zeta.24)$$

Όπου Fout η συχνότητα εξόδου και Mclk η συχνότητα του ρολογιού επεξεργαστή του IC. Στην πλακέτα του πειράματος υπάρχει κρύσταλλος 25 MHz, οπότε Mclk=25 × 10⁶ Σύμφωνα με τις τιθέμενες προδιαγραφές της παρούσας εφαρμογής θα πρέπει αρχικά να γίνεται σάρωση (sweep) σε διάφορες διακριτές συχνότητες με έλεγχο από τον Η/Υ μέσω UART terminal. Το UART terminal είναι εύκολος τρόπος για να ελέγχεται ο μικροελεγκτής από Η/Υ και χρησιμοποιείται το ίδιο καλώδιο USB μέσω του οποίου γίνεται και η επικοινωνία για την αποσφαλμάτωση από το περιβάλλον του υπολογιστή. Επιλέγεται αρχική συχνότητα, τελική συχνότητα και βήμα, όπως στο σχ.61. Επίσης

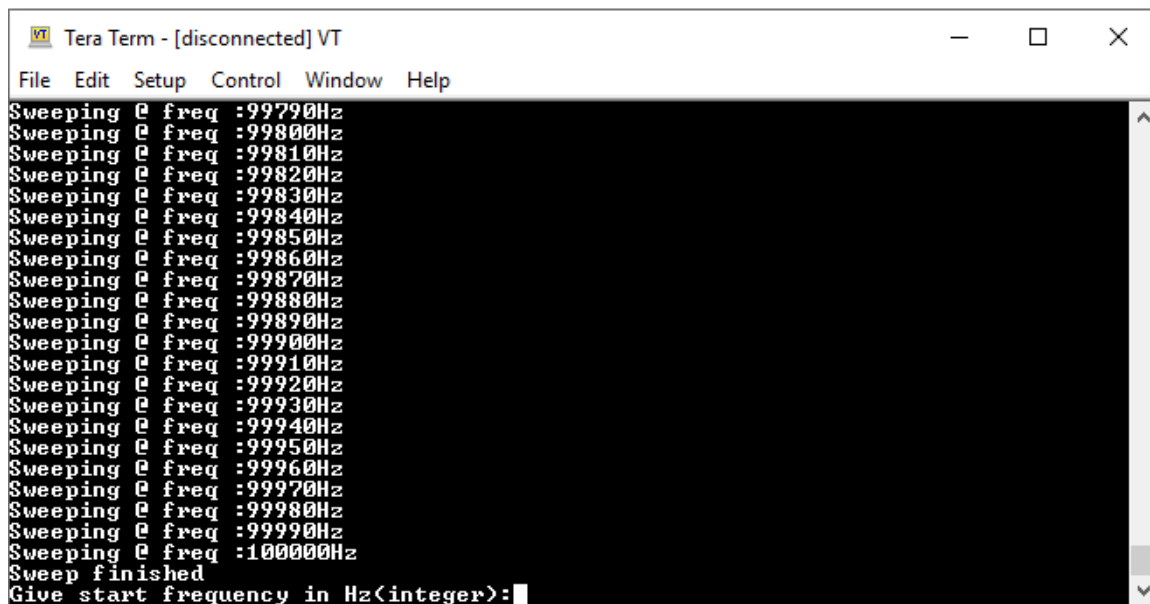
επιλέγεται είδος κυματομορφής. Για λόγους δοκιμής χρησιμοποιούνται συχνότητες πέραν των 10kHz.



```
COM7 - Tera Term VT
File Edit Setup Control Window Help
*****
CC3200 SPI EIS
*****
Enabled SPI Interface in Master Mode
Give start frequency in Hz(integer):10
Give end frequency in Hz(integer):100000
Give frequency step in Hz(integer):10
```

Σχ.61. Εισαγωγή επιλογών στο terminal του Η/Υ.

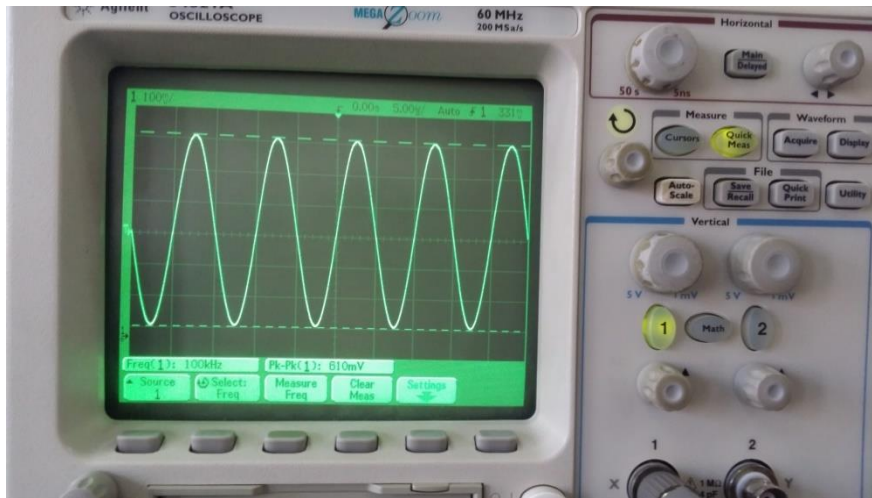
Στο τερματικό εμφανίζονται διαδοχικά, μέχρι τέλους, οι συχνότητες όπου έγινε σάρωση σε πραγματικό χρόνο (σχ. 62).



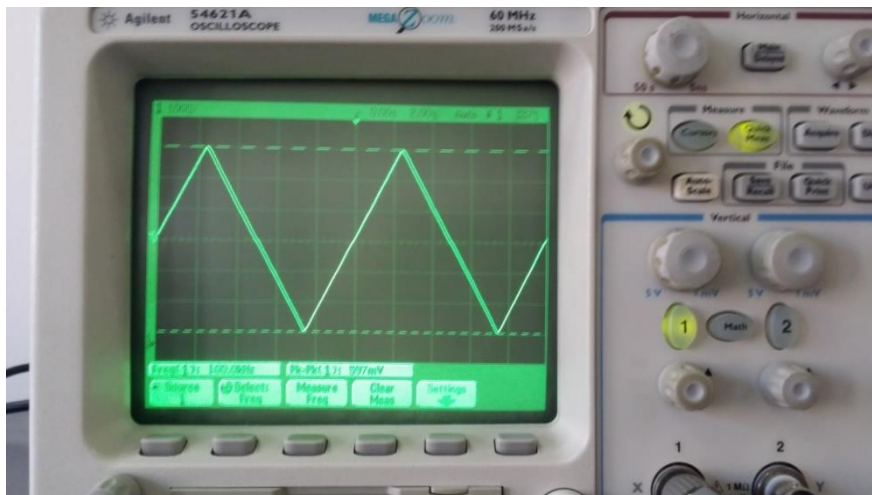
```
Tera Term - [disconnected] VT
File Edit Setup Control Window Help
Sweeping @ freq :99790Hz
Sweeping @ freq :99800Hz
Sweeping @ freq :99810Hz
Sweeping @ freq :99820Hz
Sweeping @ freq :99830Hz
Sweeping @ freq :99840Hz
Sweeping @ freq :99850Hz
Sweeping @ freq :99860Hz
Sweeping @ freq :99870Hz
Sweeping @ freq :99880Hz
Sweeping @ freq :99890Hz
Sweeping @ freq :99900Hz
Sweeping @ freq :99910Hz
Sweeping @ freq :99920Hz
Sweeping @ freq :99930Hz
Sweeping @ freq :99940Hz
Sweeping @ freq :99950Hz
Sweeping @ freq :99960Hz
Sweeping @ freq :99970Hz
Sweeping @ freq :99980Hz
Sweeping @ freq :99990Hz
Sweeping @ freq :100000Hz
Sweep finished
Give start frequency in Hz(integer):
```

Σχ. 62. Οι τελευταίες τιμές που έγινε σάρωση μέσω του DDS.

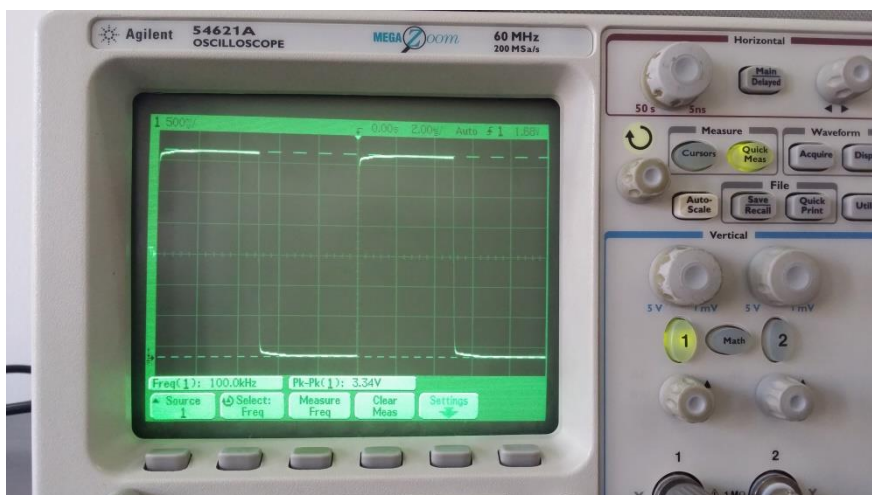
Στα ακόλουθα σχήματα (63-65) απεικονίζονται τα αποτελέσματα στον παλμογράφο για ημιτονικό, τριγωνικό και τετραγωνικό παλμό.



Σχ. 63. Ημίτονο στον παλμογράφο (100kHz).



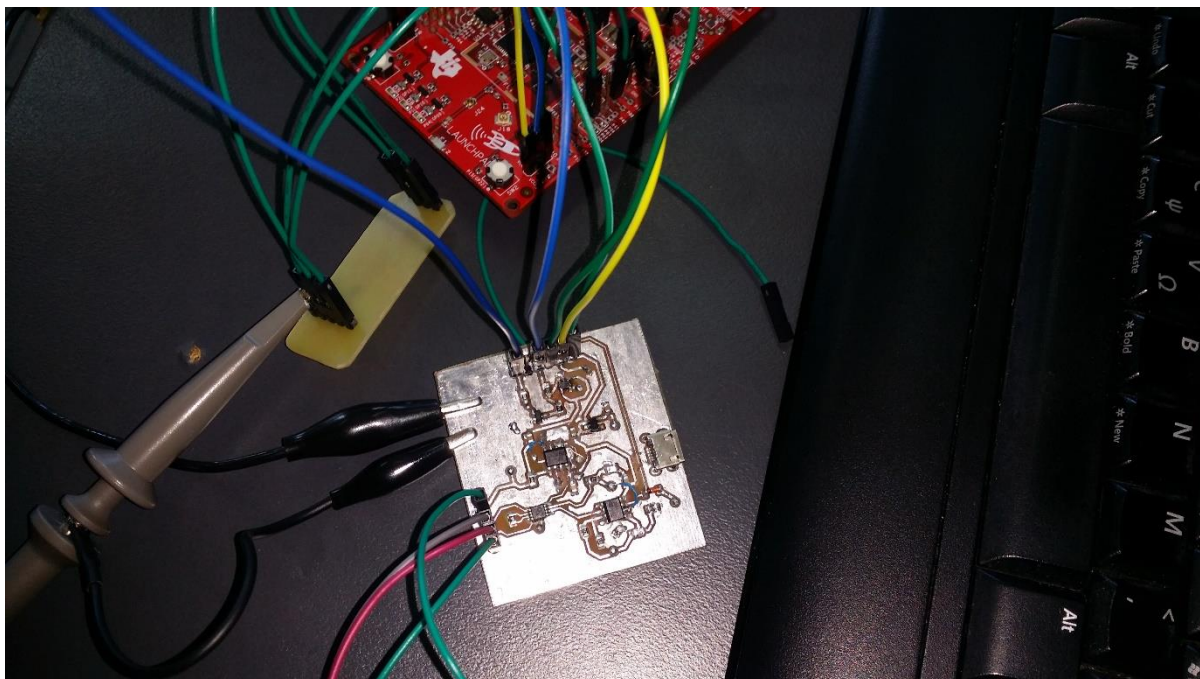
Σχ. 64. Τριγωνικός παλμός στον παλμογράφο (100kHz).



Σχ. 65. Τετραγωνικός παλμός στον παλμογράφο (100kHz).

5) Πρακτική υλοποίηση –Αναλογικό μέρος

Όσον αφορά το αναλογικό μέρος της διάταξης, κατασκευάστηκε ειδική πλακέτα PCB με το κύκλωμα που απεικονίζεται στο Σχ. 66:



Σχ. 66. Το αναλογικό κύκλωμα που κατασκευάστηκε για την εφαρμογή.

Τα πρώτα πειραματικά αποτελέσματα κατέδειξαν χαμηλότερο εύρος ζώνης (~68 kHz) από το αναμενόμενο όπως βρέθηκε με την προσομοίωση μέσω του πακέτου multisim (~120 kHz). Αυτό δεν αναμένεται να αποτελέσει πρόβλημα, καθώς μας ενδιαφέρουν κυρίως οι χαμηλότερες συχνότητες.

6) Σχεδιασμός ολοκληρωμένης πλακέτας

Η τελική πειραματική πλακέτα σχεδιάστηκε με τα εξής χαρακτηριστικά:

- Σχεδιασμός στο altium designer (Altium systems, Australia), το οποίο είναι ένα λογισμικό που χρησιμοποιείται κατά κόρο από τις εταιρίες του χώρου.
- Ανάγκη να βρίσκεται όλο το σύστημα πάνω στην PCB πλακέτα, ώστε να υπάρχει απλότητα στις δοκιμές και η απαραίτητη ακεραιότητα σήματος (αν το κύκλωμα είναι διαμερισμένο σε πλακέτες που ενώνονται με jumper αυτό συνιστά πρόβλημα για την ακεραιότητα σήματος).
- Προσοχή στους περιορισμούς για κατασκευή PCB στο εργαστήριο MicroSenses:
 - Ελάχιστη απόσταση (Minimum clearance)=5mil, προτιμώμενη 20mil όπου είναι εφικτό.
 - Ελάχιστο πλάτος γραμμής (Min. trace width) 5mil, προτιμώμενο 20mil.

-Προτιμώμενη ελάχιστη. διάμετρος νησίδας (Min. pad diameter) 60 mil, hole 30mil.

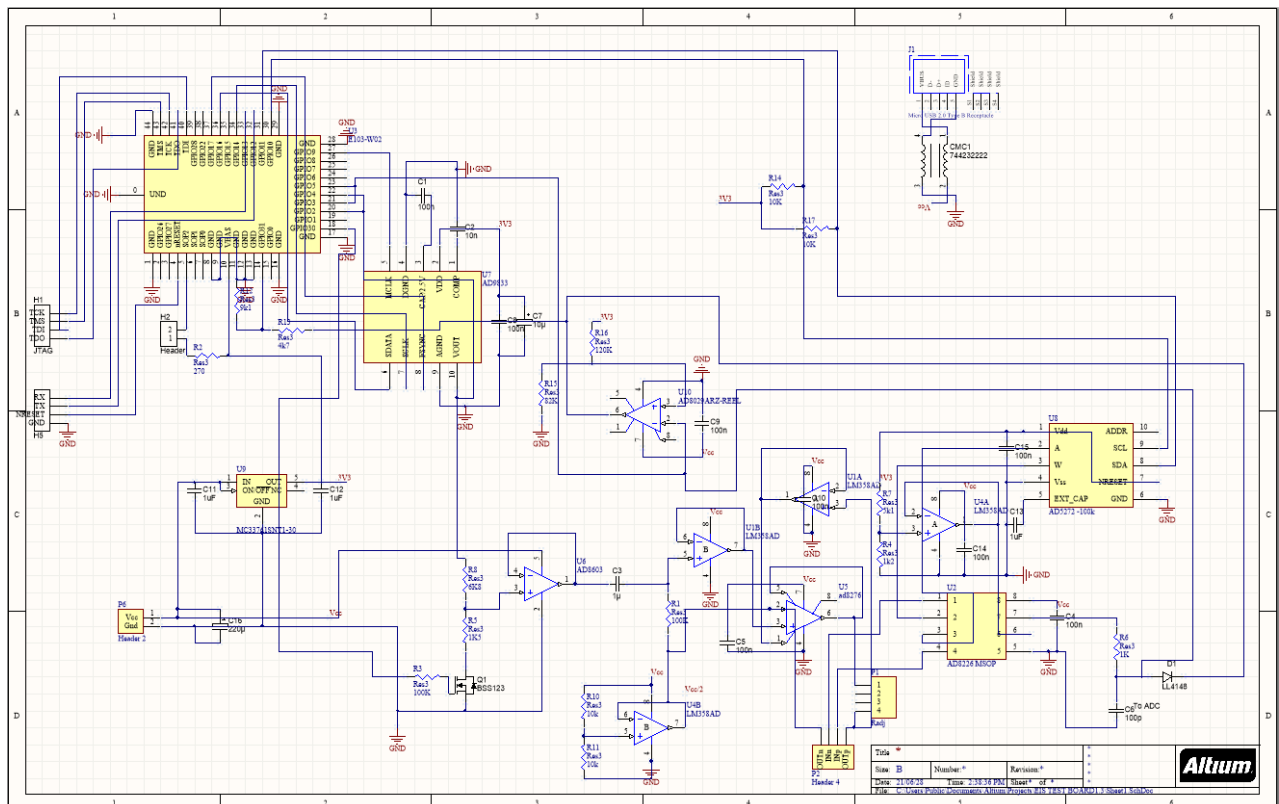
-Κατά μέγιστο 2 στρώματα PCB.

-Όχι BGA, δεν είναι δυνατή η κόλληση.

- Στον τελεστικό οργανολογίας προστίθεται ένα ψηφιακός ροοστάτης AD5272 (100KΩ,1%), ώστε να ρυθμίζεται το κέρδος και να μετρούνται και μεγαλύτερες αντιστάσεις. Θεωρητικά το μέγιστο για τον AD8226 είναι 180kΩ για το ρεύμα 20 μΑ p-p που δίνουμε. Αυτό προκύπτει από τις εξ1,2,3 σελ.20 του φύλλου δεδομένων [9].
- Ψαλιδιστής χρησιμοποιώντας AD8029. Με το LM358 υπήρχε υπερέψωση που μπορεί να κάψει τον ADC του CC3200.
- Εισαγωγή στην πλακέτα Headers για JTAG debug και φόρτωση προγράμματος.
- Φροντίδα στην απομόνωση των θορυβωδών ψηφιακών σημάτων από τα μικρού πλάτους αναλογικά.
- Δυνατότητα τροφοδοσίας της πλακέτας όχι από το USB, αλλά μέσω header από τροφοδοτικό, για να μετρηθεί το ρεύμα.

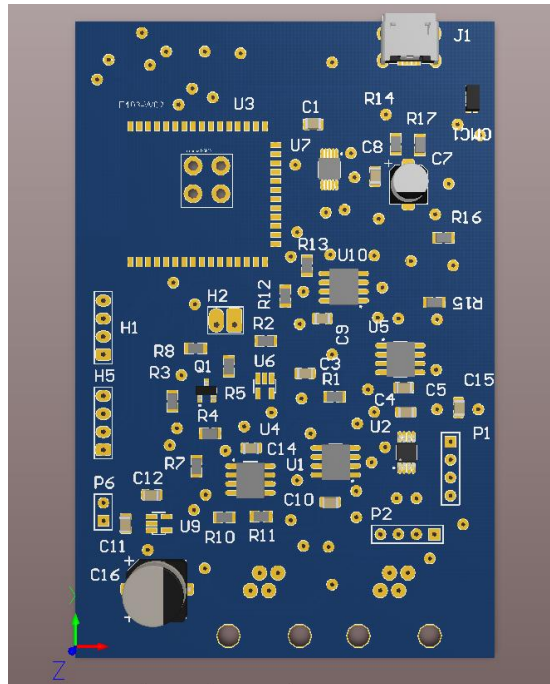
1. Σχέδια πλακέτας:

Στο σχήμα 68 παρουσιάζεται το ηλεκτρονικό σχέδιο του κυκλώματος, όπως αυτό αποτυπώθηκε στην πλακέτα.

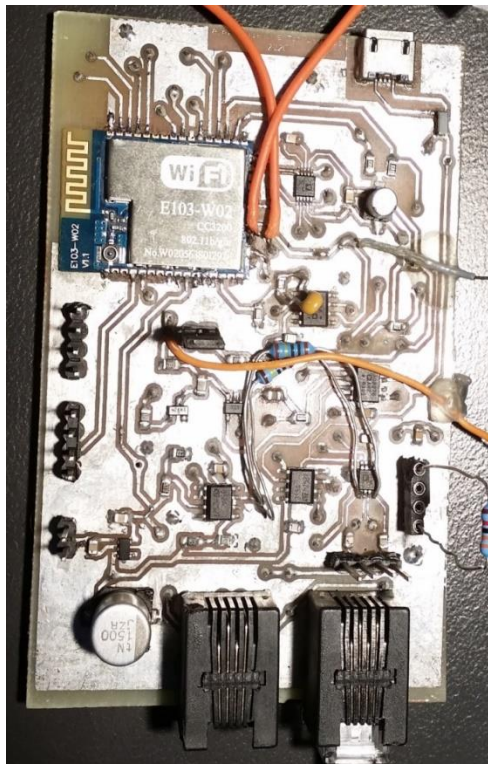


Σχ. 67. Σχηματικό στο Altium.

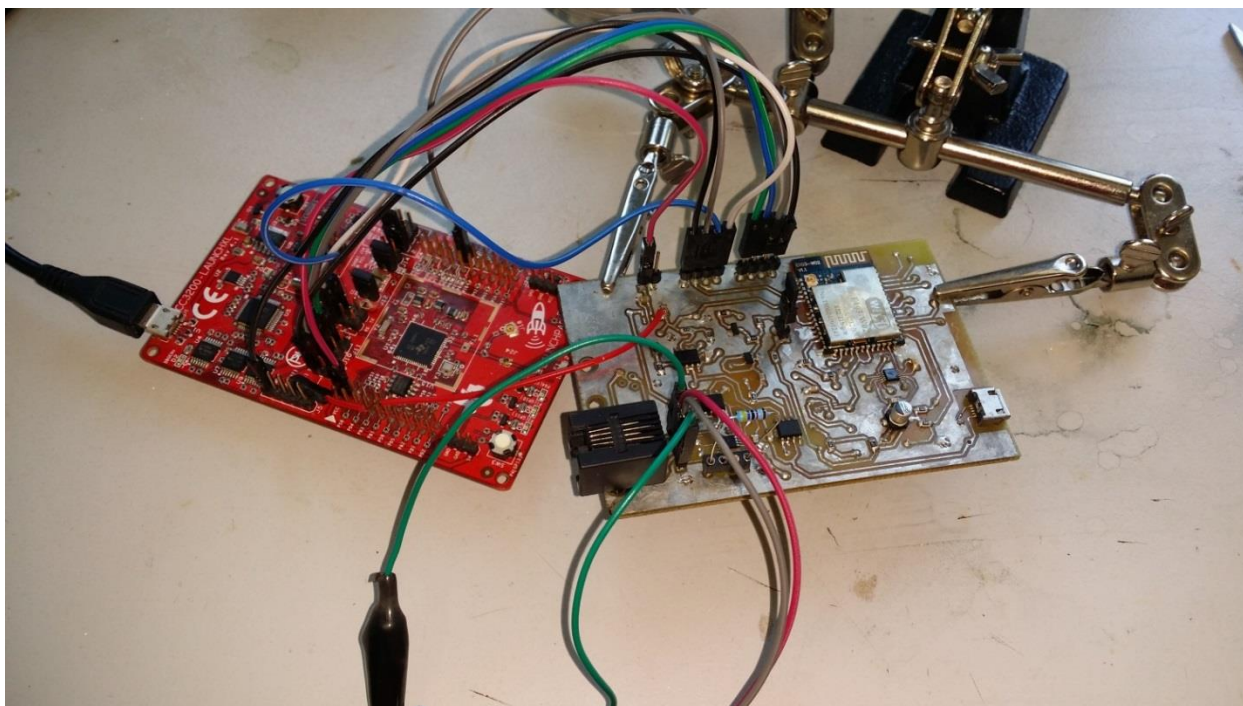
Στο σχ.68 απεικονίζεται η πλακέτα PCB που δημιουργήθηκε από το Altium με βάση το ηλεκτρονικό σχέδιο του σχ.67 και στο σχ.69 απεικονίζεται το τελικό κύκλωμα, όπως αυτό κατασκευάστηκε στο εργαστήριο microSENSES.



Σχ. 68. PCB στο Altium. Κάτω δεξιά οι P1 & P2.



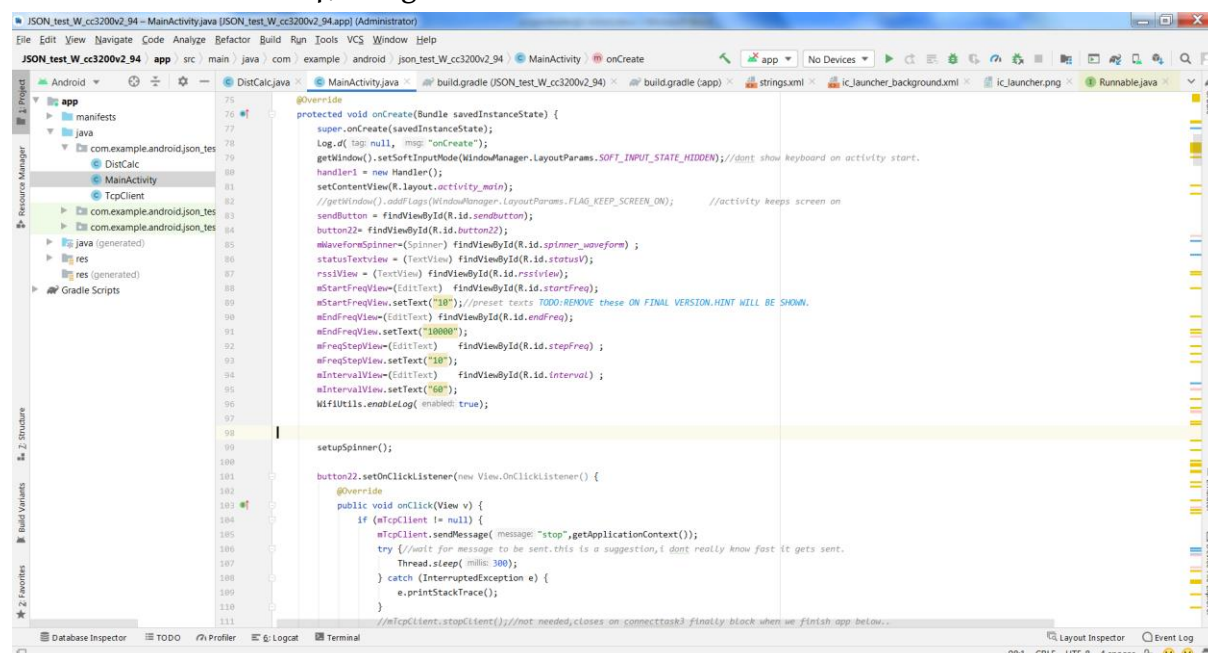
Σχ.69. Η πραγματική πλακέτα του συστήματος, που περιέχει όλο το σύστημα, φτιαγμένη στο εργαστήριο microSENSES.



Σχ.70. Η πλακέτα PCB του συστήματος δεξιά. Αριστερά είναι η πλακέτα του αναπτυξιακού, που χρησιμοποιείται ως JTAG debugger και programmer.

7) Η διεπαφή με συσκευή ANDROID

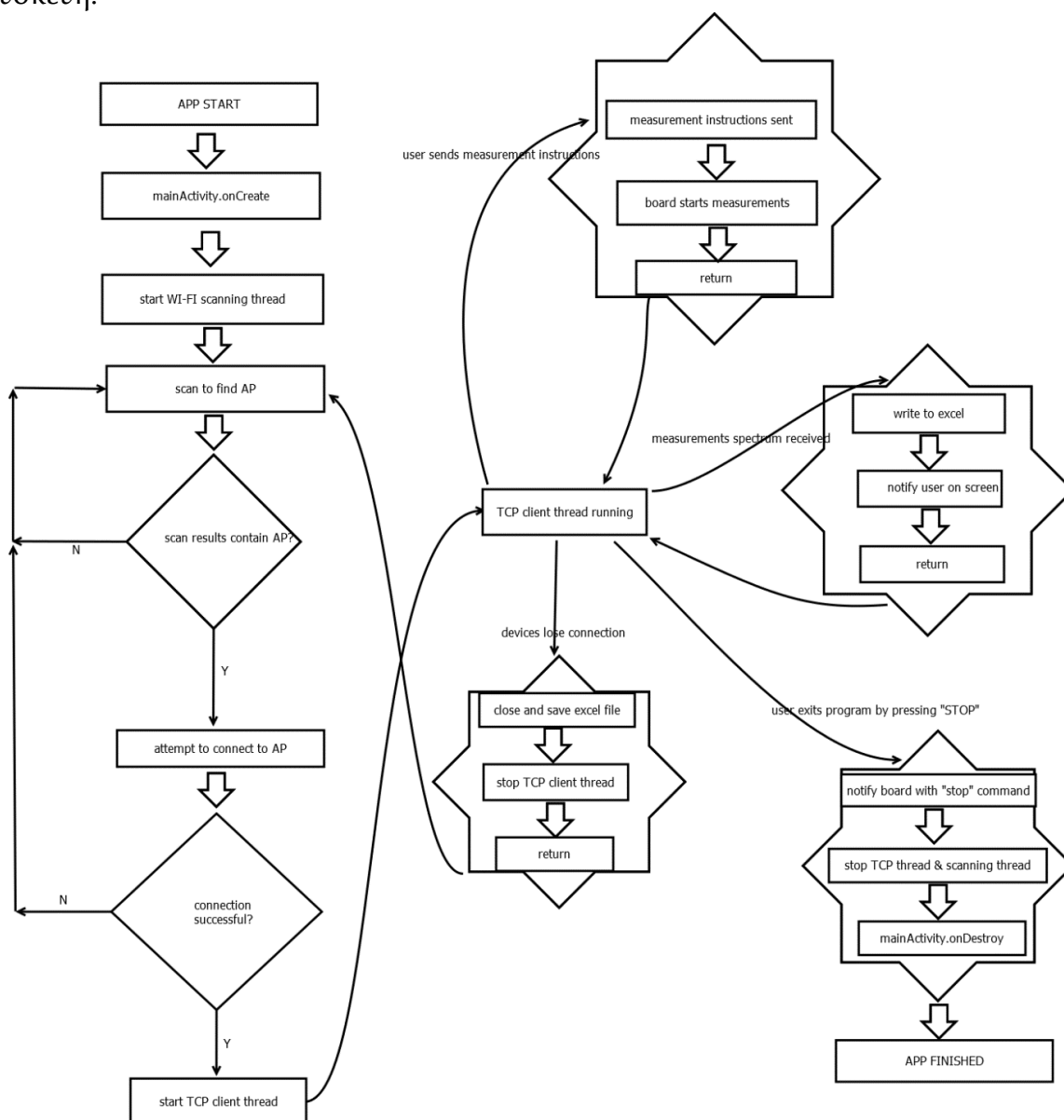
Για τον έλεγχο της συσκευής και την παρουσίαση των δεδομένων κρίθηκε σκόπιμη η ανάπτυξη προγράμματος σε ANDROID περιβάλλον. Γίνεται χρήση του ANDROID STUDIO της Google.



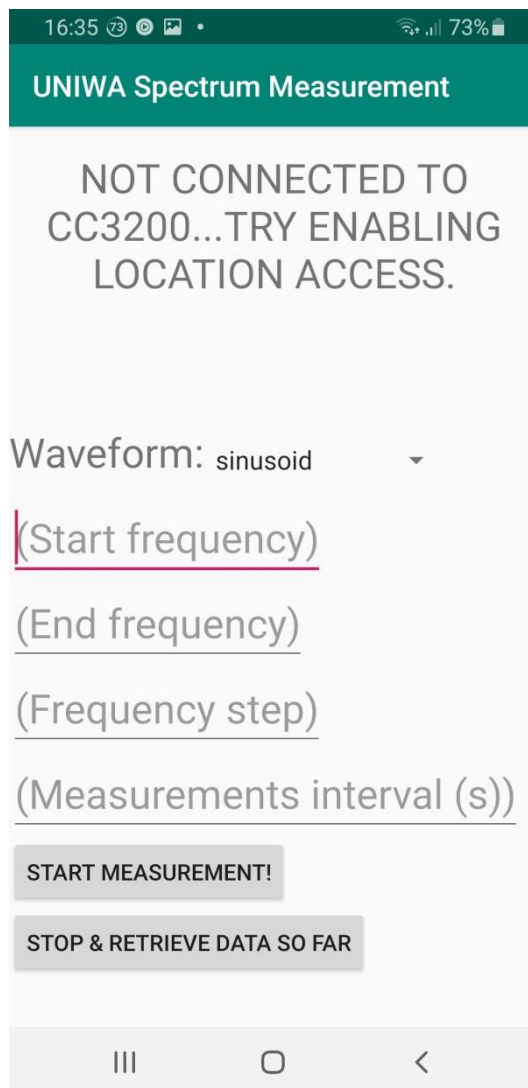
Σχ.71. Android studio. Η mainActivity.java ξεκινάει όταν ανοίγει η εφαρμογή. Το onCreate είναι η πρώτη ρουτίνα (συνάρτηση) που τρέχει.

Το εν λόγω περιβάλλον έχει πληθώρα εύχρηστων λειτουργιών όπως breakpoints στο πρόγραμμα, παρακολούθηση μνήμης, επεξεργαστή, ενέργειας και χρήσης δικτύου σε πραγματικό χρόνο.

Όπως φαίνεται και στο **σχ.72**, η εφαρμογή ξεκινάει με τη `mainActivity.java` και έχει τρία νήματα που τρέχουν συνεχώς όταν γίνονται μετρήσεις. Αυτά είναι το UI thread, το WIFI scanning thread, και το TCP CLIENT thread. Η εφαρμογή είναι σχεδιασμένη να τρέχει και στο παρασκήνιο αλλά αυτό δεν συνιστάται καθώς συσκευές επιβαρυνμένες με άλλες εργασίες μπορεί να την κλείσουν. Πάνω αριστερά στο σχήμα είναι η έναρξη της εφαρμογής και κάτω δεξιά ο τερματισμός. Τερματισμός της εφαρμογής κανονικά γίνεται όταν ο χρήστης πατήσει το κουμπί “STOP” και λάβει τις μετρήσεις. Στο **σχ.73** απεικονίζεται το περιβάλλον διεπαφής χρήστη, όπως αυτό προβάλλεται στην κινητή συσκευή.



Σχ.72. Διάγραμμα ροής για το πρόγραμμα ANDROID. Το πρόγραμμα αποτελείται από τρία συνολικά νήματα (thread) που τρέχουν συνεχώς κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Σε οκτάγωνα βρίσκονται συμπληρωματικά νήματα που τρέχουν προσωρινά έως ότου τελειώσουν τη λειτουργία που επιτελούν. Οι καμπυλωτές γραμμές στο δεξί μισό της σελίδας, που κάποιες έχουν και περιγραφή, σηματοδοτούν τη μετάβαση σε άλλο νήμα.



Σχ.73. Διεπαφή χρήστη κατά την έναρξη της εφαρμογής (η συσκευή δεν έχει συνδεθεί στην παρούσα εικόνα).

1. Διαδικασία λήψης μετρήσεων χρησιμοποιώντας τη συσκευή ANDROID.

Για την καθοδήγηση του χρήστη έχει προετοιμαστεί εγχειρίδιο που περιέχει οδηγίες εγκατάστασης, προδιαγραφές, οδηγίες χρήσης, αντιμετώπιση προβλημάτων κτλ, το οποίο παρατίθεται στο Παράρτημα 1.

1. Ο χρήστης βεβαιώνεται ότι έχει τοποθετηθεί ο σωστός αντιστάτης επιλογής ρεύματος στην υποδοχή P1 (σχ.67,68,69) της πλακέτας. Συνδέει την πλακέτα στη διάταξη ΦΕ μέσω του βύσματος στο κάτω μέρος (σχ.69) ή της υποδοχής P2 (σχ.68, 69).
2. Η πλακέτα συνδέεται σε κατάλληλο τροφοδοτικό USB ή μπαταρία.
3. Ο χρήστης εκκινεί την εφαρμογή ANDROID. Ο χρήστης πρέπει να βεβαιωθεί ότι δεν έχει συνδεθεί άλλη συσκευή ANDROID στην πλακέτα, καθώς υποστηρίζει

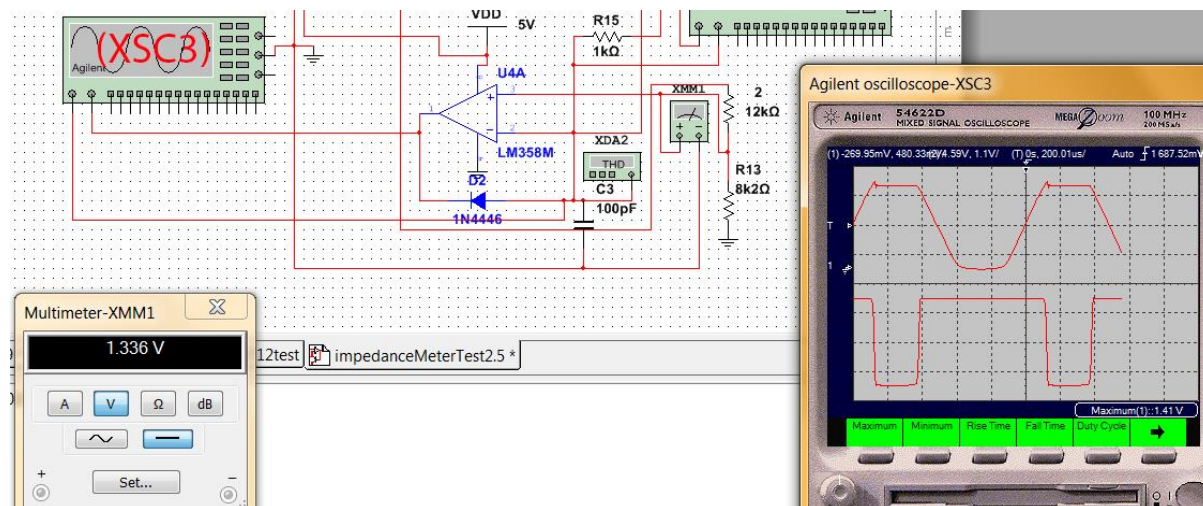
μόνον μία. Ο χρήστης μπορεί να επιλέξει τις παραμέτρους των μετρήσεων (σχ.73) στα όρια που καθορίζονται στις προδιαγραφές.

4. Ο χρήστης περιμένει την εφαρμογή να συνδεθεί αυτόματα στην πλακέτα.
5. Όταν συνδεθεί ο χρήστης ενημερώνεται στο πάνω μέρος με την επιγραφή “CONNECTED”. Επιλέγει «START MEASUREMENT» για να εκκινήσει τη διαδικασία μετρήσεων στις επιλεγμένες παραμέτρους.
6. Όταν επιθυμεί τη διακοπή των μετρήσεων και την έξοδο από την εφαρμογή, επιλέγει το κουμπί «STOP & RETRIEVE DATA». Το αρχείο .csv αποθηκεύεται στον ανάλογο φάκελο που κατονομάζεται στο εγχειρίδιο.
7. Αφαιρείται η πλακέτα από την παροχή τάσης.
8. Η πλακέτα φυλάσσεται σε ξηρό μέρος. Συνιστάται η τοποθέτηση της συσκευής σε ισοστάθμιση τοποθετώντας το κατάλληλο βύσμα βραχυκύκλωσης στο P2 και βυθίζοντας τα ηλεκτρόδια σε ηλεκτρολυτικό διάλυμα όπως PBS.

8) Έλεγχος και εξακρίβωση της διάταξης

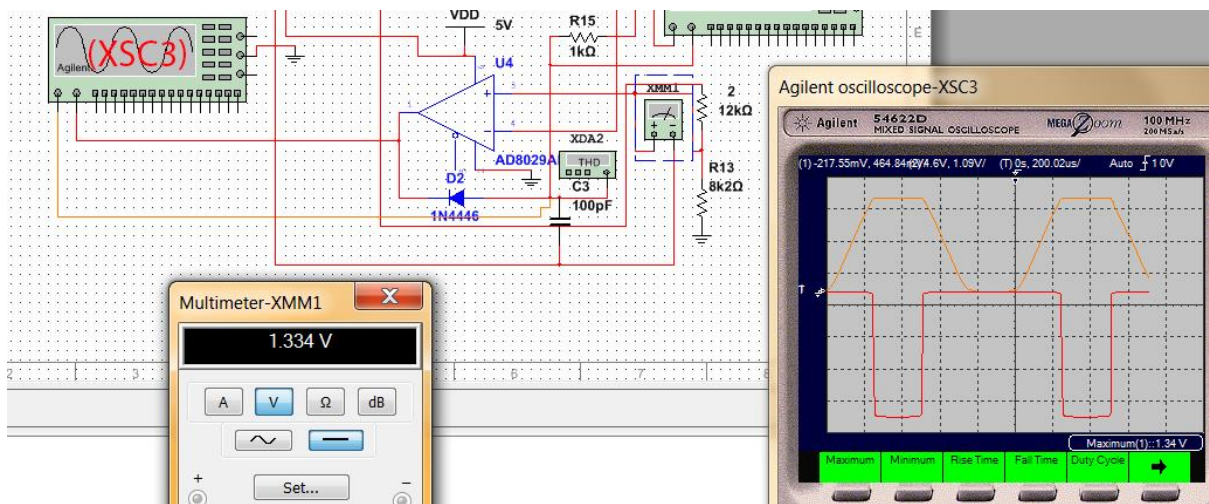
1. Σχεδιασμός ψαλιδιστή:

Τόσο στην προσομοίωση, όσο και στην πραγματική πλακέτα παρατηρήθηκε μια μη επιθυμητή συμπεριφορά από τον ψαλιδιστή (clipper), με αποτέλεσμα να περνάει κάποια τάση πάνω από 1,4V που είναι επικίνδυνη για τον ADC. Στο σχ.74 φαίνεται η κυματομορφή στο Multisim:



Σχ. 74. Ο ψαλιδιστής με LM358. Το πρόβλημα εστιάζεται στην αιχμή κατά την άνοδο του σήματος του καναλιού A (πάνω).

Γίνεται εμφανής η αδυναμία του LM358 να αντιδράσει εγκαίρως. Το πρόβλημα λύνεται με αλλαγή του TE με έναν πιο κατάλληλο, όπως ο AD8029 (σχ. 75).



Σχ. 75. Η συμπεριφορά του κυκλώματος με χρήση του ψαλιδιστή AD8029.

Όπως φαίνεται στο σχ. 75, με τον καινούργιο Τ.Ε. γίνεται περιορισμός της εξόδου κοντά στην επιθυμητή τάση αναφοράς.

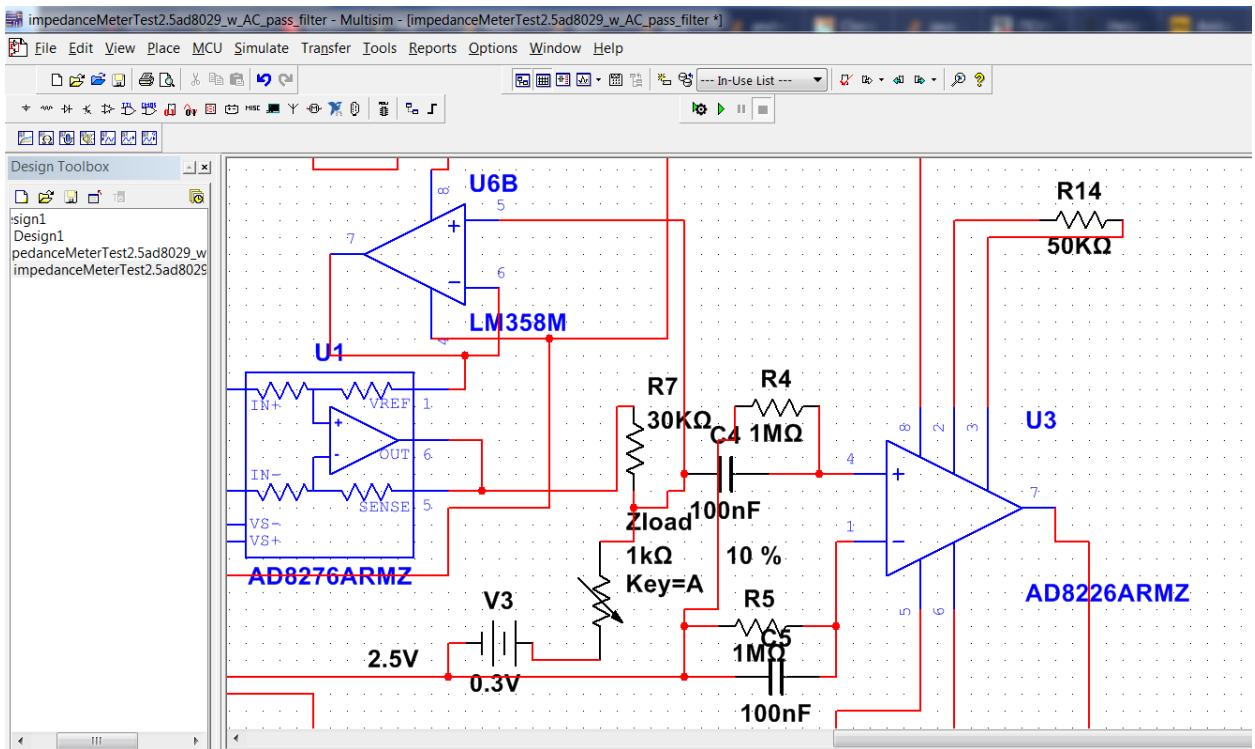
2. AC σύζευξη:

Στη νέα πλακέτα παρατηρήθηκε DC ολίσθηση στα ηλεκτρόδια, ενώ βρίσκονται μέσα σε ηλεκτρολυτικά διαλύματα (αλατόνερο και θρεπτικό διάλυμα). Η ολίσθηση αυτή πολλαπλασιάζεται αναπόφευκτα στον τελεστικό οργανολογίας εμφανίζοντας στην έξοδο σφάλμα τουλάχιστον 300mV, που ψαλιδίζει το σήμα και επηρεάζει τη μέτρηση. Μετά από έρευνα, στην παρακάτω δημοσίευση με τίτλο «Cell barrier characterization in transwell inserts by electrical impedance spectroscopy» [49] σημειώνεται: «If not in use, the chopstick-like electrode was stored in phosphor buffered saline (PBS) with the two reference electrodes in short circuit to allow the electrode pair to equilibrate and limit the potential difference.»

Και στο εγχειρίδιο χρήσης του MILLICELL:

«For voltage measurement, the STX01 electrode needs to be equilibrated to eliminate any offset before use. To equilibrate, prepare an electrolyte solution similar to the one you will use when taking measurements, or use phosphate buffered saline (PBS), 0.15 M sodium chloride (NaCl), or 0.1 M potassium chloride (KCl).»

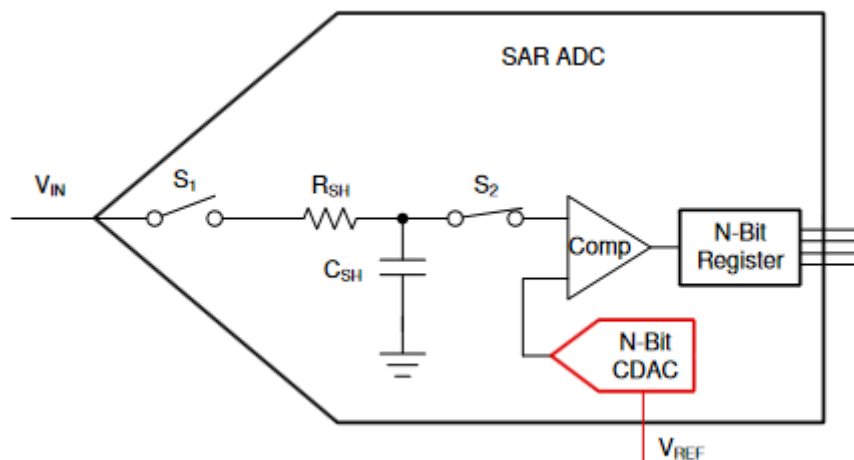
Από αυτά τα δεδομένα φαίνεται ότι υπάρχει παραμένον δυναμικό στα ηλεκτρόδια, το οποίο χρειάζεται ισοστάθμιση για να εξαλειφθεί. Επειδή όμως δεν μπορεί να εξαλειφθεί τελείως, αποφασίστηκε να χρησιμοποιήσουμε AC σύζευξη στον τελεστικό οργανολογίας. Χρησιμοποιώντας πυκνωτές 1μF (C4,C5) και αντιστάσεις 1MΩ (R4,R5), πραγματοποιήθηκαν οι σχετικές προσομοιώσεις στο Multisim (σχ.76) και μετά έγιναν οι αντίστοιχες αλλαγές στη φυσική πλακέτα.



Σχ.76. AC σύζευξη στον ΤΕ οργανολογίας. Η κάτω συχνότητα αποκοπής με τους πυκνωτές 1μf είναι 0,15Hz, ενώ με τους 100nF που φαίνονται στο σχήμα είναι 1,5Hz. Σε κάθε περίπτωση η μέτρηση που ξεκινάει από τα 10Hz είναι ασφαλής.

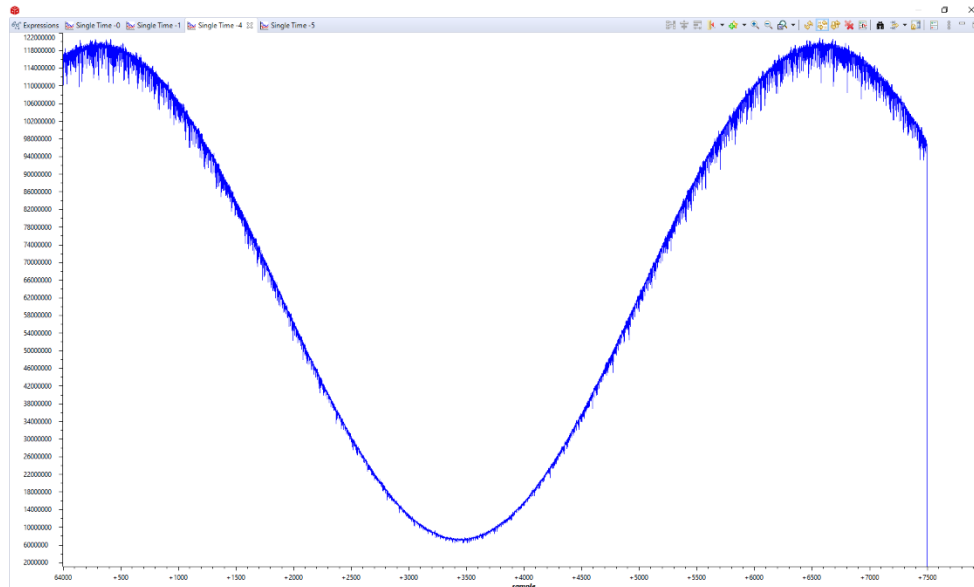
3. Ανίχνευση των κυματομορφών με ADC

Ο ADC (αναλογικός-ψηφιακός μετατροπέας) του CC3200 IC έχει αρχιτεκτονική SAR (successive approximation) (σχ.77)). Αυτό το είδος ADC είναι διαδομένο σε εφαρμογές γενικού σκοπού για χαμηλές έως μεσαίες συχνότητες σημάτων. Συνήθως προσφέρει ταχύτητες έως 4 MSPS και μεσαία έως υψηλή ανάλυση με μεγάλη ακρίβεια AC & DC.

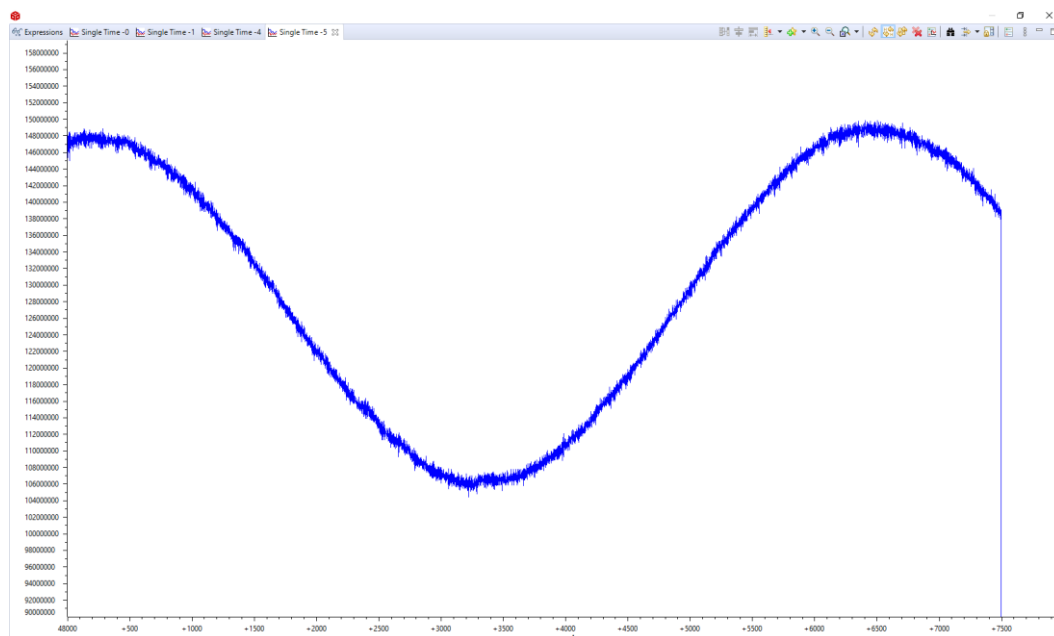


Σχ.77. Αρχιτεκτονική SAR ADC του cc3200 (Texas Instruments).

Παρατίθενται ορισμένα παραδείγματα από δειγματοληψία που εκτελεί η συσκευή στα ημιτονοειδή σήματα εισόδου και εξόδου. Το CCS debugging μέσω JTAG επιτρέπει να γίνεται ανάγνωση και γραφική παρουσίαση δεδομένων από όλη τη μνήμη του μικροελεγκτή. Τα παρακάτω δεδομένα (σχ.78,79) είναι αυτά που χρησιμοποιούνται στις μετρήσεις. Ας σημειωθεί ότι η δειγματοληψία είναι 125KSPS τόσο για το κανάλι της εισόδου, όσο και της εξόδου.



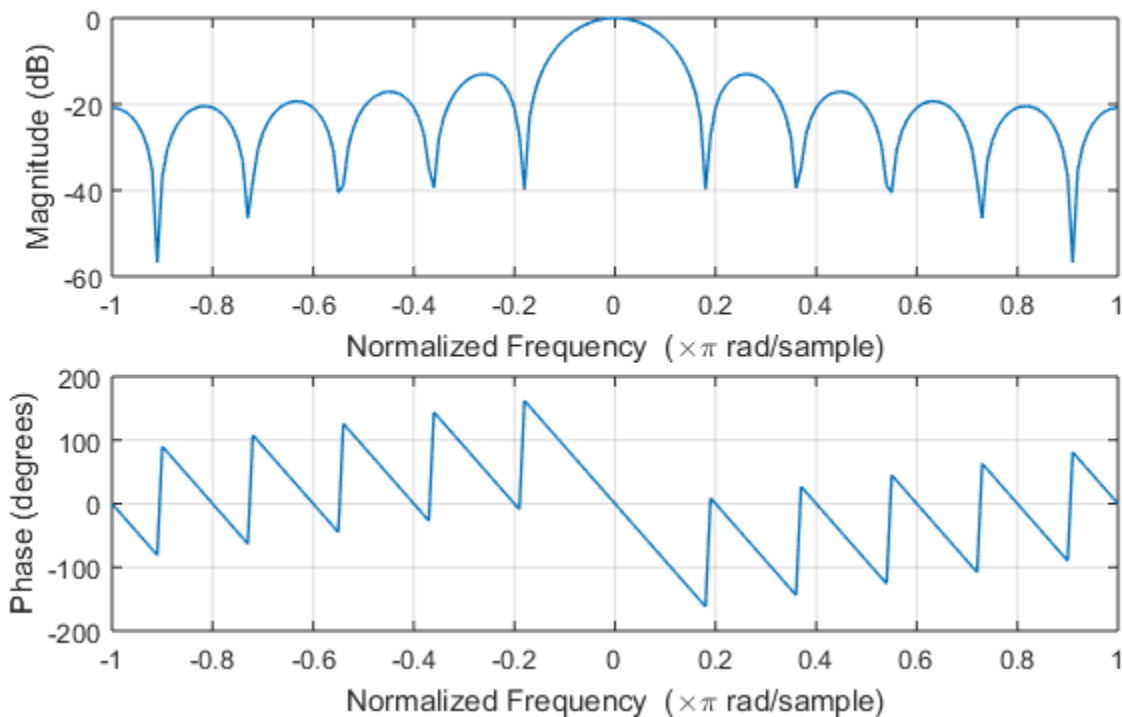
Σχ. 78. Κυματομορφή ημιτόνου εισόδου 10Hz. Το συγκεκριμένο σήμα είναι το σήμα όπως εκπέμπεται από το DDS και ανιχνεύεται από τον ADC. Ο θόρυβος στις υψηλότερες τιμές τάσης είναι χαρακτηριστικό του SAR ADC, ωστόσο οι κορυφές, που μας ενδιαφέρουν, διατηρούνται.



Σχ.79. Κυματομορφή αντίστοιχης εξόδου, όπως ανιχνεύεται από τον ADC, για το σήμα του σχ.79. Το φορτίο που έχει τοποθετηθεί είναι ωμικό και δεν υπάρχει εμφανής διαφορά φάσης. Το πλάτος του συγκεκριμένου σήματος είναι μικρό και γι' αυτό η παραμόρφωση είναι ίδια παντού.

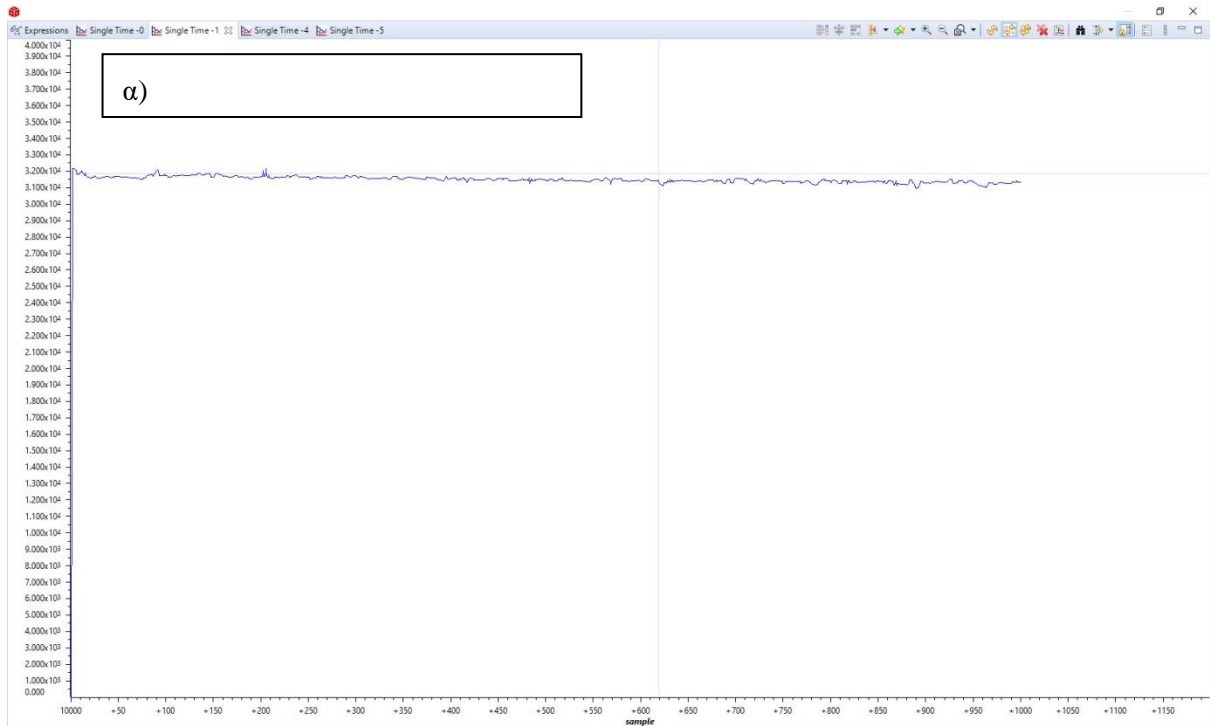
4. Ψηφιακό φίλτρο για τις κυματομορφές εισόδου-εξόδου

Για την αφαίρεση του θορύβου στις κυματομορφές εισόδου και εξόδου, όπως αυτός αποτυπώνεται στα σχήματα 78,79, μπορεί να εφαρμοστεί ψηφιακό φίλτρο κυλιόμενου διαμέσου (rolling median) ή κυλιόμενης μέσης τιμής (rolling average). Όμως η απόκριση συχνότητας αυτών των φίλτρων δεν είναι ιδανική(σχ.80).

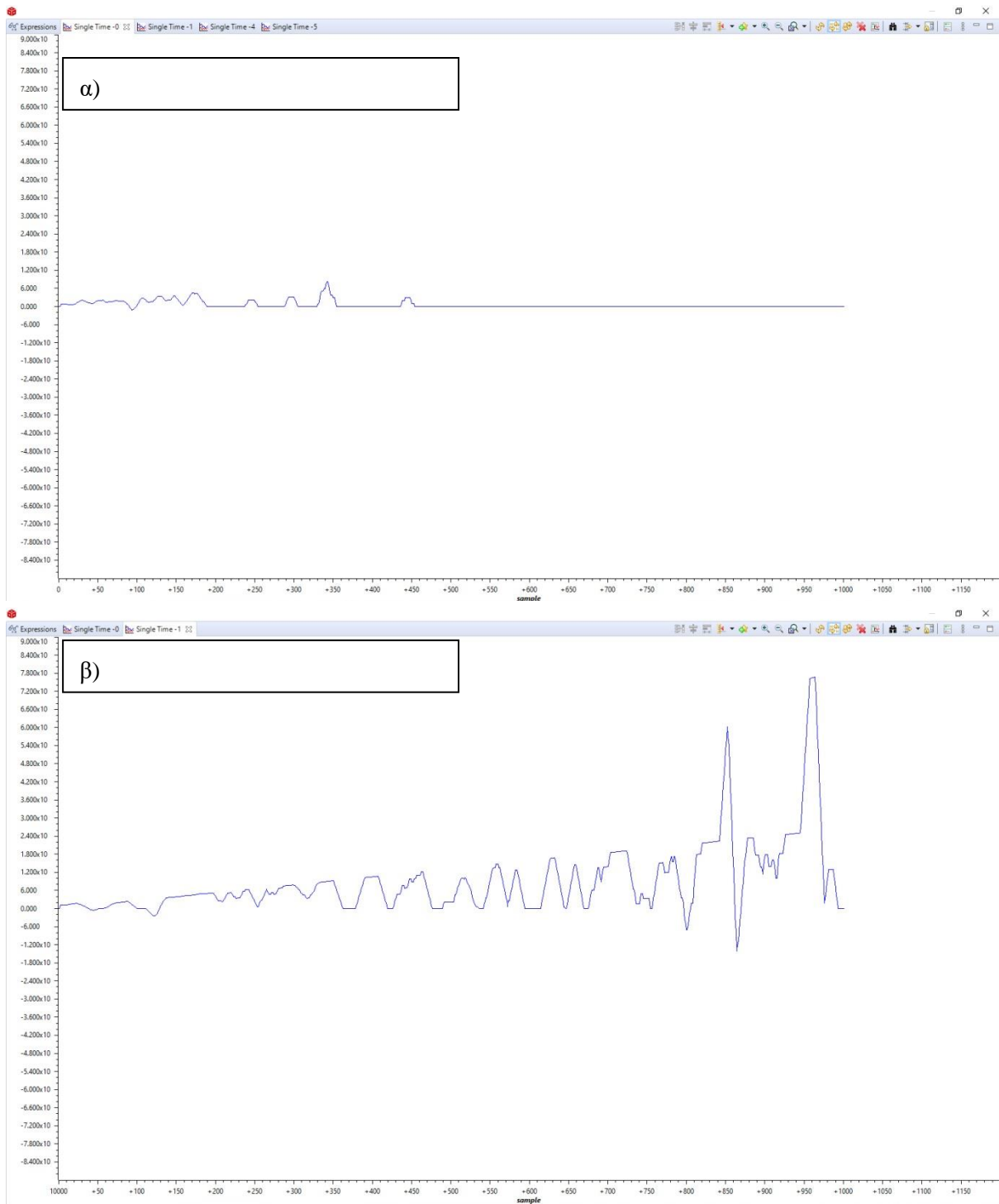


Σχ.80. Απόκριση συχνότητας ενός ψηφιακού φίλτρου κυλιόμενης μέσης τιμής. (www.gaussianwaves.com)

Αυτό το γεγονός έχει σαν αποτέλεσμα αλλοίωση της απόκρισης μέτρου-φάσης. Οι συνέπειες φαίνονται στα σχ.81 & σχ.82. Στο σχ.81(β) είναι εμφανής η απώλεια εύρους ζώνης. Στο σχ.82(β) είναι εμφανής η παραμόρφωση στην απόκριση φάσης.



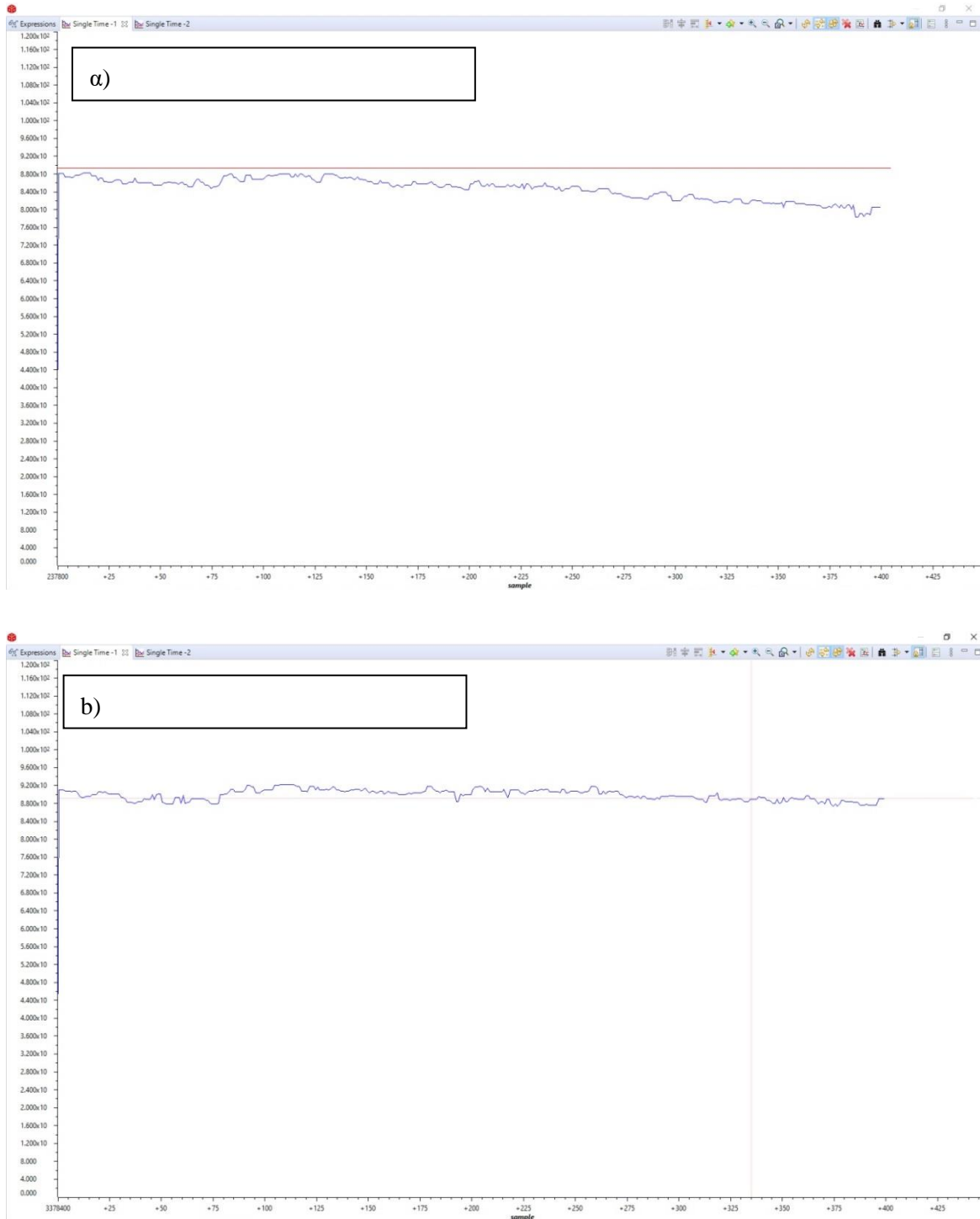
Σχ.81. Γραφική παράσταση από τον CCS debugger όπου απεικονίζεται η απόκριση μέτρου για αντίσταση 33kΩ(χωρίς βαθμονόμηση). Στη δειγματοληψία από το σχήμα α) δεν έχει εφαρμοστεί φίλτρο κυλιόμενης διαμέσου, ενώ στο β) έχει εφαρμοστεί φίλτρο κυλιόμενης διαμέσου με το ελάχιστο δυνατό μέγεθος παραθύρου, $n=3$. (Φάσμα 10Hz-10kHz. Η 1000στή μέτρηση, στη δεξιά πλευρά, είναι τα 10kHz.)



Σχ.82. Γραφική παράσταση από τον CCS debugger όπου απεικονίζεται η απόκριση φάσης για αντίσταση $33k\Omega$. Στη δειγματοληψία από το σχήμα α) δεν έχει εφαρμοστεί φίλτρο κυλιόμενης διαμέσου, ενώ στο β) έχει εφαρμοστεί φίλτρο κυλιόμενης διαμέσου με το ελάχιστο δυνατό μέγεθος παραθύρου, $n=3$. (Φάσμα 10Hz-10kHz. Η 1000στή μέτρηση, στη δεξιά πλευρά, είναι τα 10kHz.)

5. Αλλαγή MOSFET

Το MOSFET Q1 όπως φαίνεται στο **σχ.52** έχει υψηλή σχετικά παρασιτική χωρητικότητα. Αυτό σε συνδυασμό με τις R11, R9 σχηματίζουν ένα χαμηλοπερατό φίλτρο που εύκολα μπορεί να επηρεάσει το εύρος ζώνης της συσκευής. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, η ελαχιστοποίηση των R11,R9 και η επιλογή MOSFET με χαμηλότερες χωρητικότητες είναι επιτακτικά. Τα πειραματικά αποτελέσματα φαίνονται στα **σχ.83**.



Σχ.83. Φάσμα εμπέδησης για μια αντίσταση 90Ω. Πάνω με το MOSFET Si2302 και κάτω με το MOSFET 2N7002-F(χαμηλότερης παρασιτικής χωρητικότητας) με ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση των R11,R9.

6. Αλλαγή R14 με ψηφιακό ροοστάτη

Η R14 αντίσταση ρύθμισης κέρδους (σχ.56) θα πρέπει να είναι ρυθμιζόμενη, ώστε να λαμβάνεται σήμα σωστού πλάτους για μεγάλο εύρος αντιστάσεων.

Το AD8226 έχει κέρδος τάσης που ορίζεται από τον τύπο

$$G = 1 + \frac{49400}{R_G} \quad (\text{εξ.25})$$

Όπου R_G η R14. Επιλέχθηκε το IC AD5272-100, 10-BIT ψηφιακό ροοστάτη τιμής 100kΩ το οποίο ελέγχεται μέσω I2C από τον μικροελεγκτή. Η τιμή του ροοστάτη ορίζεται από τον τύπο:

$$R = D * \frac{100000}{1023} \Omega \quad (\text{εξ.26})$$

Όπου D η τιμή που έχει σταλεί στον καταχωρητή του AD5272. Η τιμή του ροοστάτη αλλάζει από τον μικροελεγκτή, όποτε διαπιστώνεται πολύ μικρό ή πολύ μεγάλο σήμα στην έξοδο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επικοινωνία δεν εισάγει θόρυβο στη μέτρηση, καθώς όποτε γίνει, συμβαίνει πριν από τη μέτρηση.

Θέτοντας τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές για το D, =1 και =1023, έχουμε εύρος κέρδους τάσης για τον AD8226 από 506,3 έως 1,494 αντίστοιχα.

7. Εύρεση ακρίβειας συστήματος και εκτίμηση με NLLSF

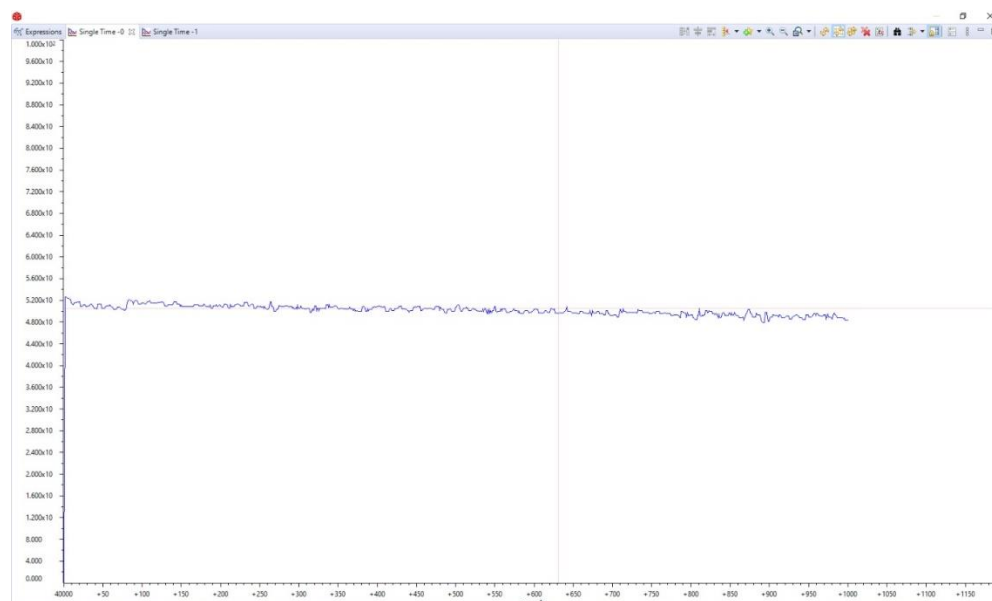
Το σύστημα βαθμονομήθηκε χρησιμοποιώντας γνωστές αντιστάσεις ακριβείας. Η απόκλιση που αρχικά είχε οφείλεται στην πηγή ρεύματος, η οποία δεν παρέχει ακριβώς 20 μΑ p-p αλλά 18.7. Αυτό συμβαίνει, γιατί ο μαθηματικός τύπος που δίνει το ρεύμα Howland στην πραγματικότητα δεν είναι ο [47, εξ2], αλλά ο πιο σύνθετος [47, εξ1.]

Στη συνέχεια το σύστημα τέθηκε υπό δοκιμή για την εύρεση της ακρίβειας που έχει σε όλο το εύρος αντιστάσεων. Κατ' αρχήν μετρήθηκε αντίσταση 10Ω. Παρακάτω στο σχήμα 84 φαίνεται η απόκριση πλάτους, με ένα σφάλμα $\approx 4\Omega$.



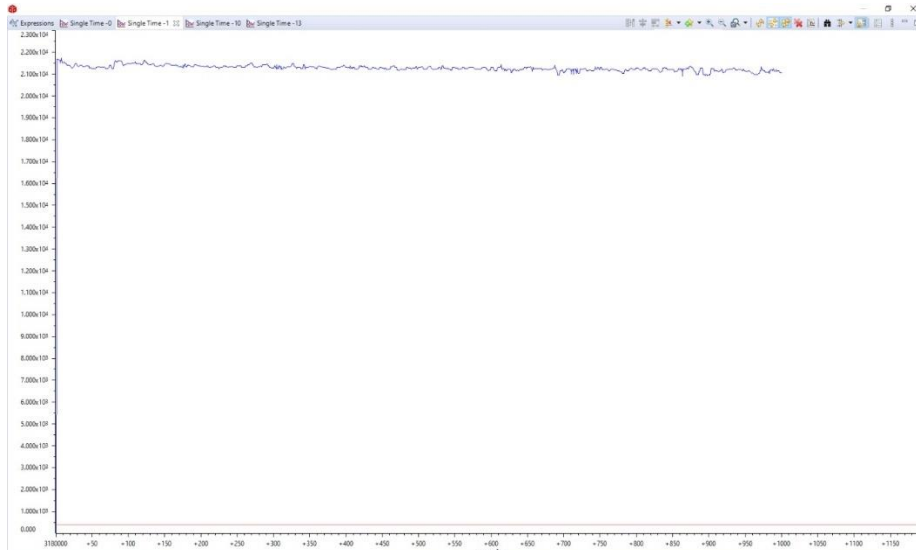
Σχ.84. Στη μέτρηση αντίστασης 10Ω έχουμε 4Ω σφάλμα.

Όμως και κατά τη μέτρηση μιας αντίστασης 47Ω έχουμε το ίδιο σφάλμα.



Σχ.85. Στη μέτρηση αντίστασης 47Ω έχουμε 4Ω σφάλμα.

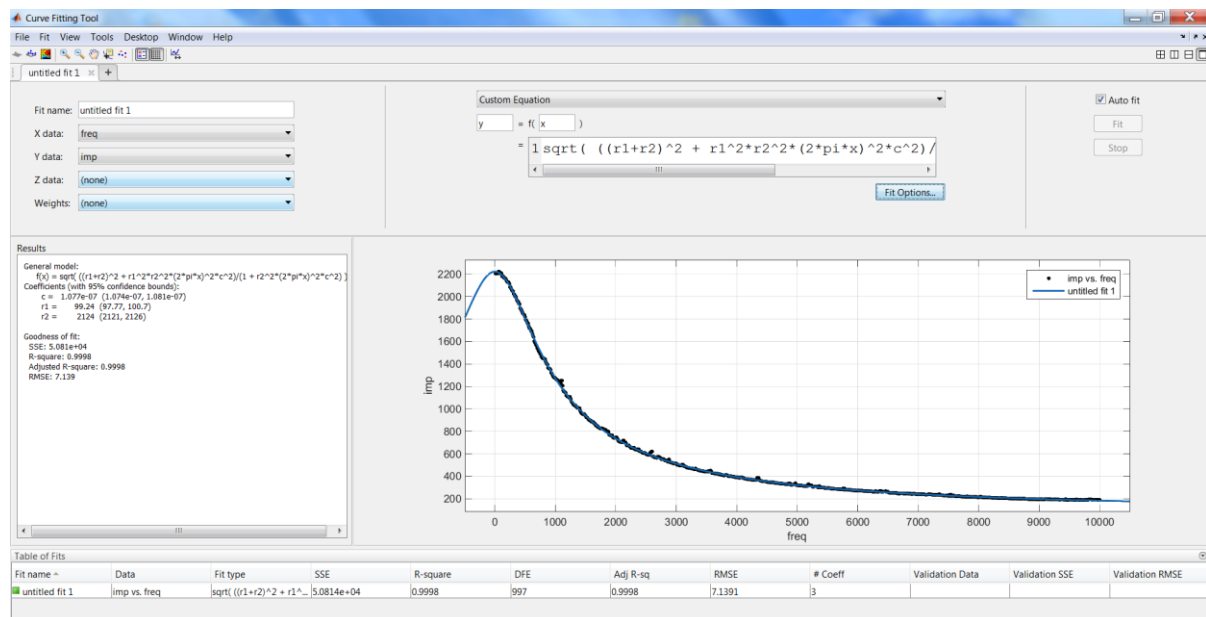
Το ίδιο συμβαίνει και σε μεγαλύτερες αντιστάσεις στην περιοχή έως $\sim 2k\Omega$ όπου είναι οι καλλιέργειες που μετράμε. Αυτό το σφάλμα χαρακτηρίζεται ως συστηματικό και απαλείφεται, αν ακολουθηθούν τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στην εν.2.4.4. Σε μεγαλύτερες τιμές εμπεδήσεων το σφάλμα δεν είναι σημαντικό, ειδικά αν χρησιμοποιηθεί μπαταρία σαν τροφοδοσία που μειώνει το θόρυβο μέτρησης. Λ.χ. για μια αντίσταση $22k\Omega$, που μετρήθηκε $21.8k\Omega$ με πολύμετρο ακριβείας, η απόκριση πλάτους απεικονίζεται στο σχ.86:



Σχ.86. Απόκριση πλάτους για αντίσταση 22kΩ.

Στα 10Hz η μέτρηση φτάνει πολύ κοντά στην πραγματική τιμή (21,6kΩ), ενώ σε μεγαλύτερες συχνότητες υπάρχει μικρή πτώση λόγω εύρους ζώνης. Κανένα σύστημα δεν μπορεί να απαλείψει τελείως τα χωρητικά φαινόμενα.

Για την εκτίμηση παραμέτρων μετά τη λήψη ενός πλήρους φάσματος τα δεδομένα λαμβάνονται από τη συσκευή ANDROID και εισάγονται σε λογισμικό MATLAB. Η διακρίβωση του συστήματος μέσω αυτής της μεθόδου είναι δυνατή χρησιμοποιώντας γνωστά στοιχεία κυκλώματος.

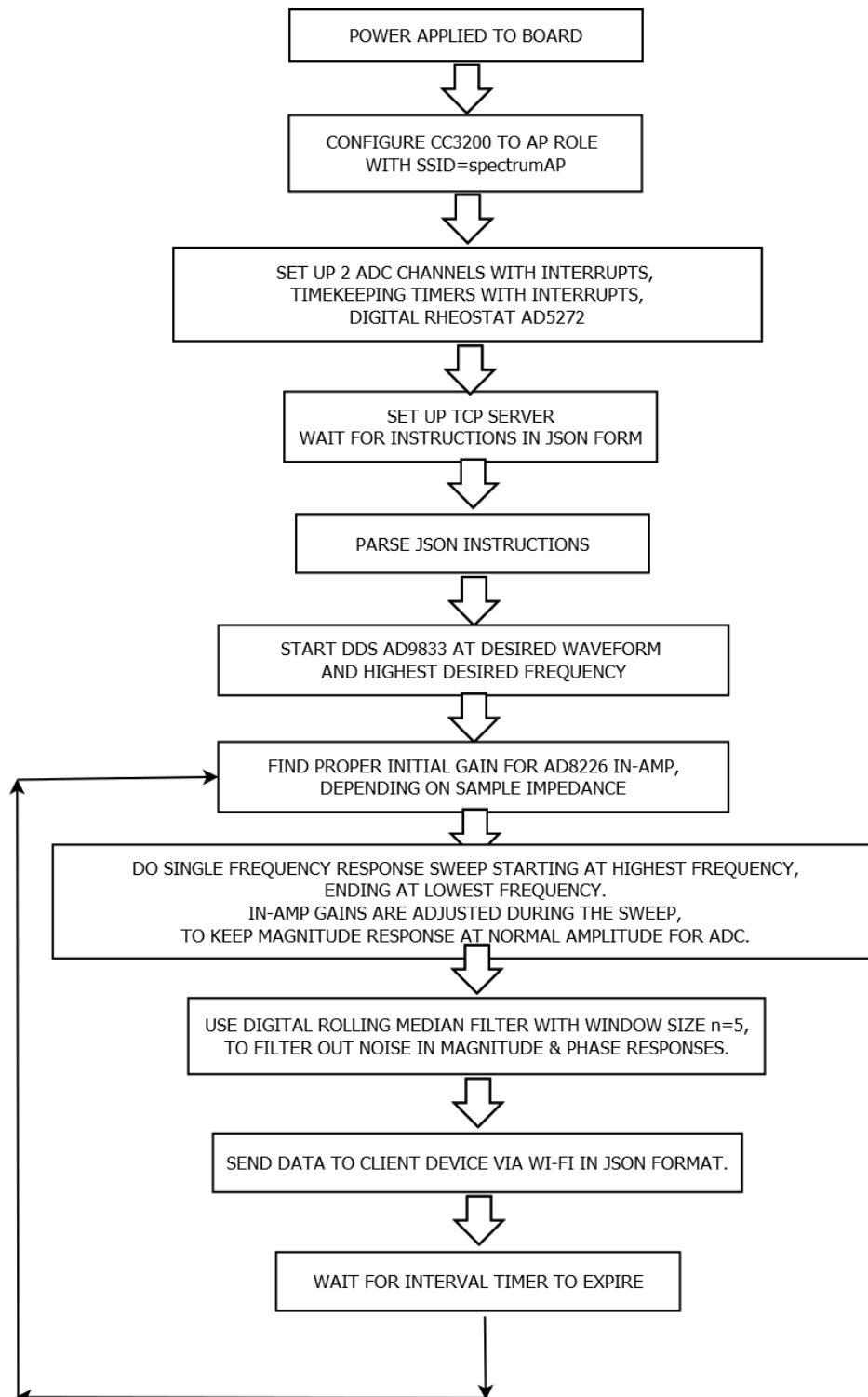


Σχ.87. Χρήση matlab για υλοποίηση NLLSF με το δικό μας σύστημα. Οι άγνωστοι παράμετροι είναι τρεις. Οι σωστές τιμές εξαγονται με απόκλιση <1%, <1%, 3,5%.

Στο παραπάνω σχήμα, τα στοιχεία του κυκλώματος Randles βρέθηκαν με απόκλιση <1%, <1%, 3,5%. Επρόκειτο για έναν πυκνωτή C=107 nF, μία αντίσταση R1=100 Ω, και άλλη μία αντίσταση R2=2200 Ω, αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι μεγαλύτερη απόκλιση εμφανίζει η R2.

8. Διάγραμμα ροής μικροελεγκτή

Ο μικροελεγκτής TI CC3200 πρέπει να διαχειρίζεται τις μετρήσεις και την επικοινωνία του WIFI ταυτόχρονα. Αυτό το επιτρέπει η αρχιτεκτονική διπλού πυρήνα. Το σχετικό διάγραμμα ροής απεικονίζεται στο σχήμα 88.

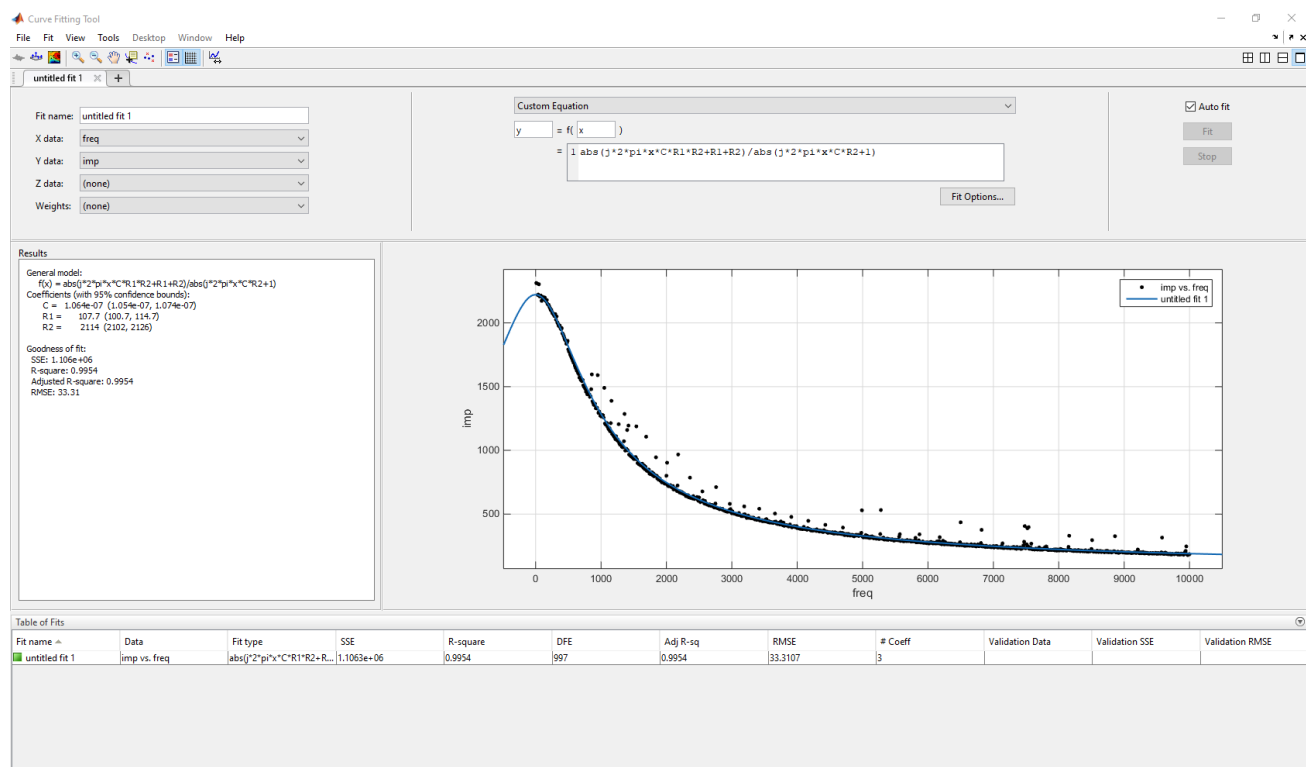


Σχ.88. Διάγραμμα ροής για το μικροελεγκτή. Τα μηνύματα WIFI ανταλλάσσονται σε μορφή JSON.

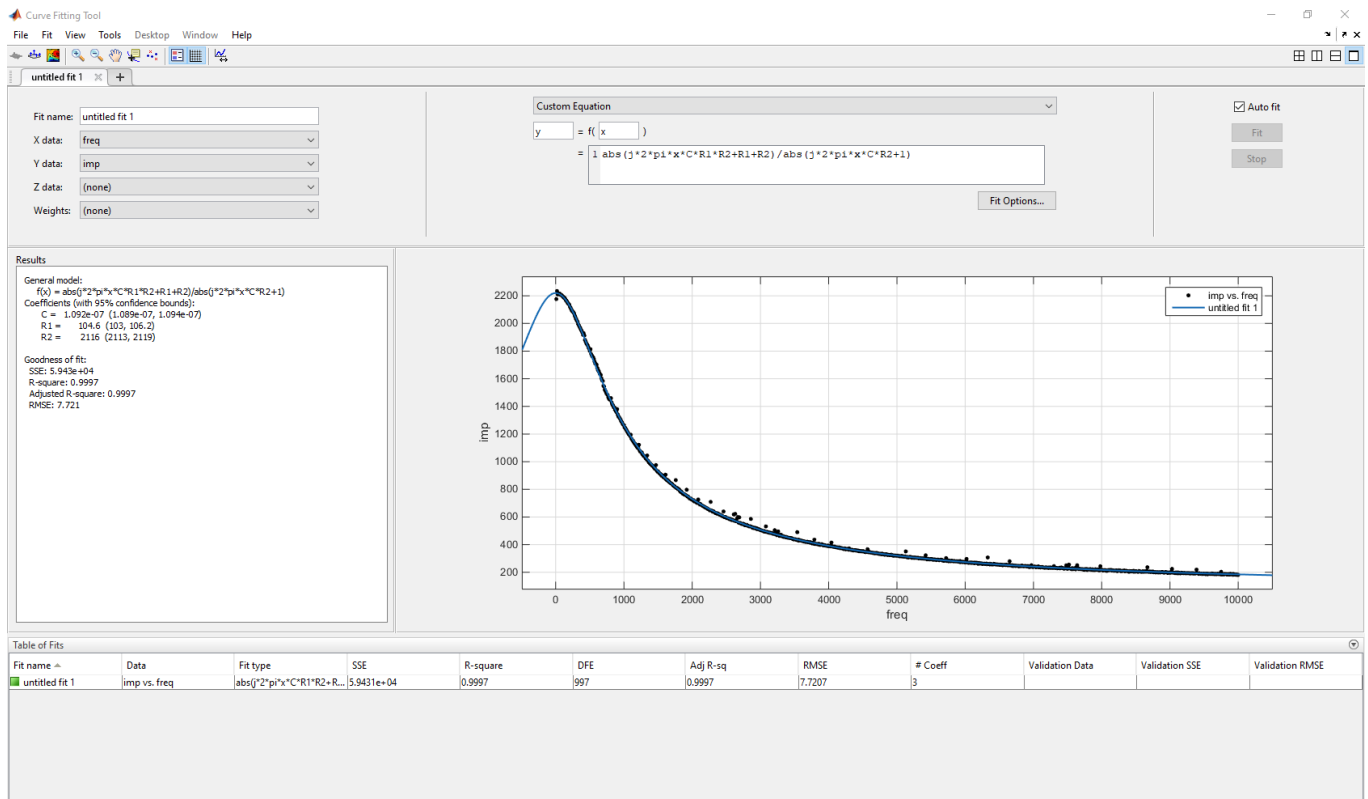
9. Σύγκριση λειτουργίας με μπαταρία/τροφοδοτικό.

Ως γνωστόν ένα τροφοδοτικό δεν είναι ποτέ πλήρως απαλλαγμένο από θόρυβο, είτε αυτός είναι θόρυβος γραμμής, είτε διακοπτικός για τα διακοπτόμενα τροφοδοτικά (switching). Στην πλακέτα που σχεδιάστηκε για την παρούσα εφαρμογή λαμβάνονται μέτρα για την ελάττωση του θορύβου που εισέρχεται από το USB, λ.χ. τα στοιχεία CMC1,C16,C11,C12, και οι υπόλοιποι πυκνωτές παράκαμψης διάσπαρτοι στο κύκλωμα του **σχ.67**. Επιπροσθέτως χρησιμοποιούνται φίλτρα κυλιόμενης διαμέσου στις αποκρίσεις αφού ληφθούν, φιλτράροντας μέρος του θορύβου. Σε αυτήν την περίπτωση εκμεταλλευόμαστε ότι υπάρχουν πολλές συχνότητες μέτρησης σε κάθε φάσμα κι έτσι μπορούμε να «πετάξουμε» κάποιες που παρουσίασαν θόρυβο. Το βήμα αυτό δεικνύεται και στο διάγραμμα ροής στην προηγούμενη ενότητα.

Παρ' όλα αυτά λόγω της μικρής στάθμης του σήματος ο θόρυβος αυτός εμφανίζεται στις μετρήσεις. Λειτουργία με μπαταρία σχεδόν μας απαλλάσσει από αυτό τον θόρυβο. Παρακάτω στα **σχ.89,90** παρουσιάζονται αποκρίσεις μέτρου για το κύκλωμα randles που αναφέρθηκε στην εν.2.8.7 αφού εισήχθησαν στο MATLAB για εύρεση των παραμέτρων. Παρόλο που τα δύο γραφήματα έχουν εμφανείς διαφορές στο θόρυβο, η μέθοδος εκτίμησης ελαχίστων τετραγώνων ελάχιστα επηρεάζεται.



Σχ.89. Λειτουργία με τροφοδοτικό. Η εκτίμηση των παραμέτρων C,R1,R2 φαίνεται αριστερά. Όλα τα σημεία με θόρυβο, που βγαίνουν εκτός καμπύλης, δίνουν μεγαλύτερη εμπέδηση. Αυτό συμβαίνει διότι ο μικροελεγκτής «βλέπει» μεγαλύτερες κορυφές σε αυτά τα σημεία, καθώς προστίθεται και ο θόρυβος.

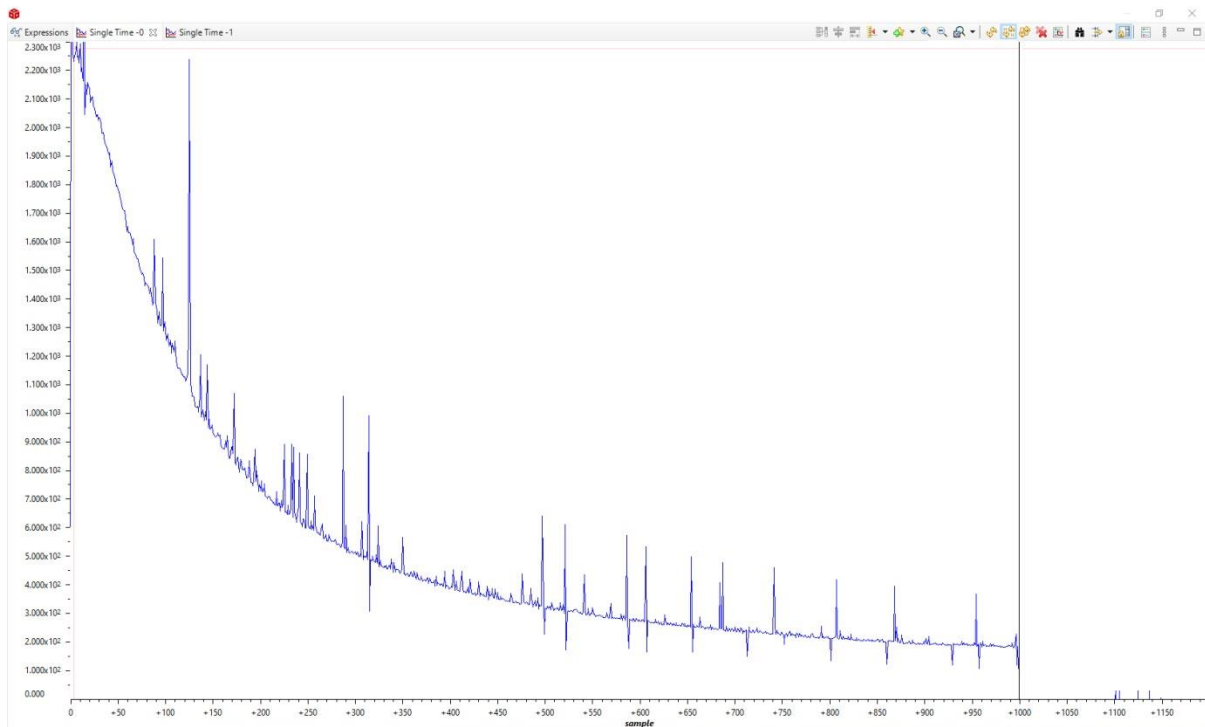


Σχ.90. Λειτουργία με μπαταρία. Πάνω στην καμπύλη υπάρχει εμφανώς λιγότερος θόρυβος. Ωστόσο παρά τους καλύτερους δείκτες RMSE & R-square, η εξαγόμενη εκτίμηση παραμέτρων είναι σχεδόν όμοια με την αντίστοιχη του σχήματος 89.

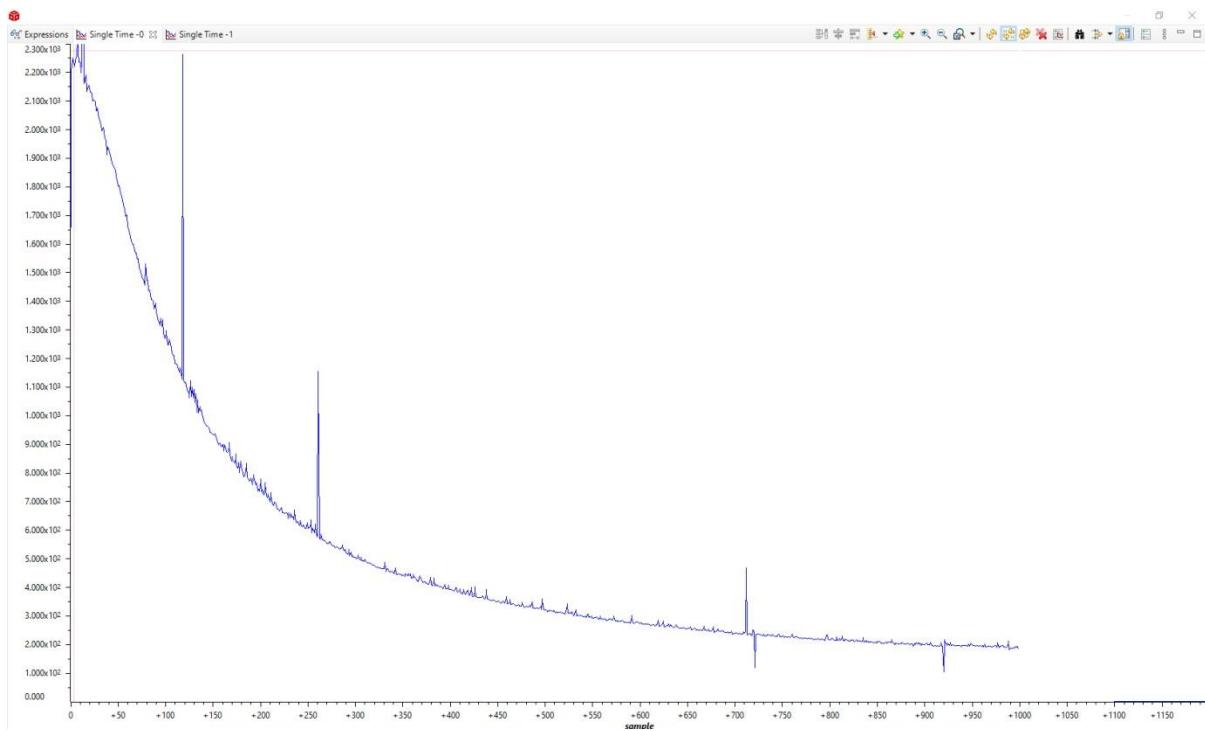
Ας σημειωθεί ότι οι αποκρίσεις που δεικνύονται στα προηγούμενα σχήματα της παρούσας ενότητας έχουν παρθεί με τροφοδοτικό και εμφανίζουν παραπάνω θόρυβο απ' ότι στα τελικά πειράματα που θα γίνονται με μπαταρία.

10. Έλεγχος επίδρασης θορύβου WIFI στη μέτρηση.

Καθώς το φυσικό επίπεδο(PHY) του WIFI και ο ADC βρίσκονται στο ίδιο IC, ήταν επόμενο να υπάρξει σύζευξη θορύβου στη μέτρηση. Στα **σχ.91,92** παρουσιάζονται αποκρίσεις μέτρου για το δικτύωμα Randles, με και χωρίς WIFI. Οι αποκρίσεις έχουν παρθεί από τον debugger και δεν έχει εφαρμοστεί σε αυτές το φίλτρο διαμέσου που περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα.

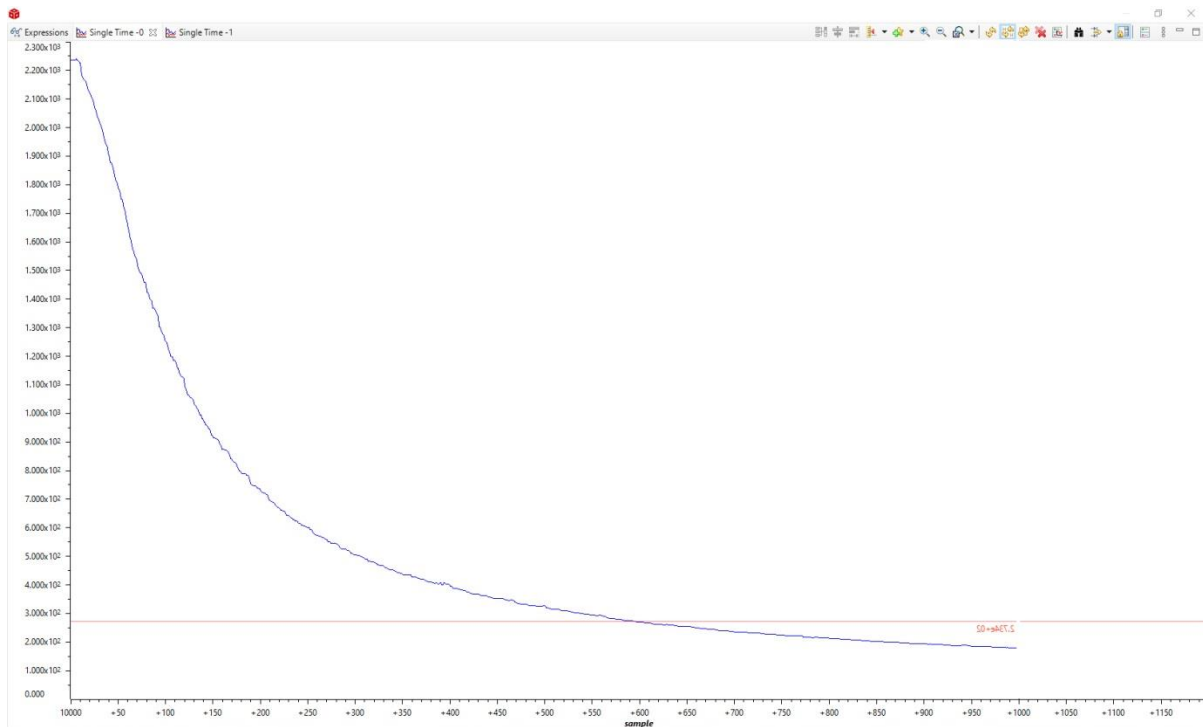


Σχ.91. Απόκριση μέτρου του Randles με WIFI ενεργό.



Σχ.92. Απόκριση μέτρου του Randles με WIFI ανενεργό.

Ωστόσο εάν εφαρμοστεί το φίλτρο διαμέσου στην απόκριση του σχ.91, οι κορυφές εξαφανίζονται (σχ.93).



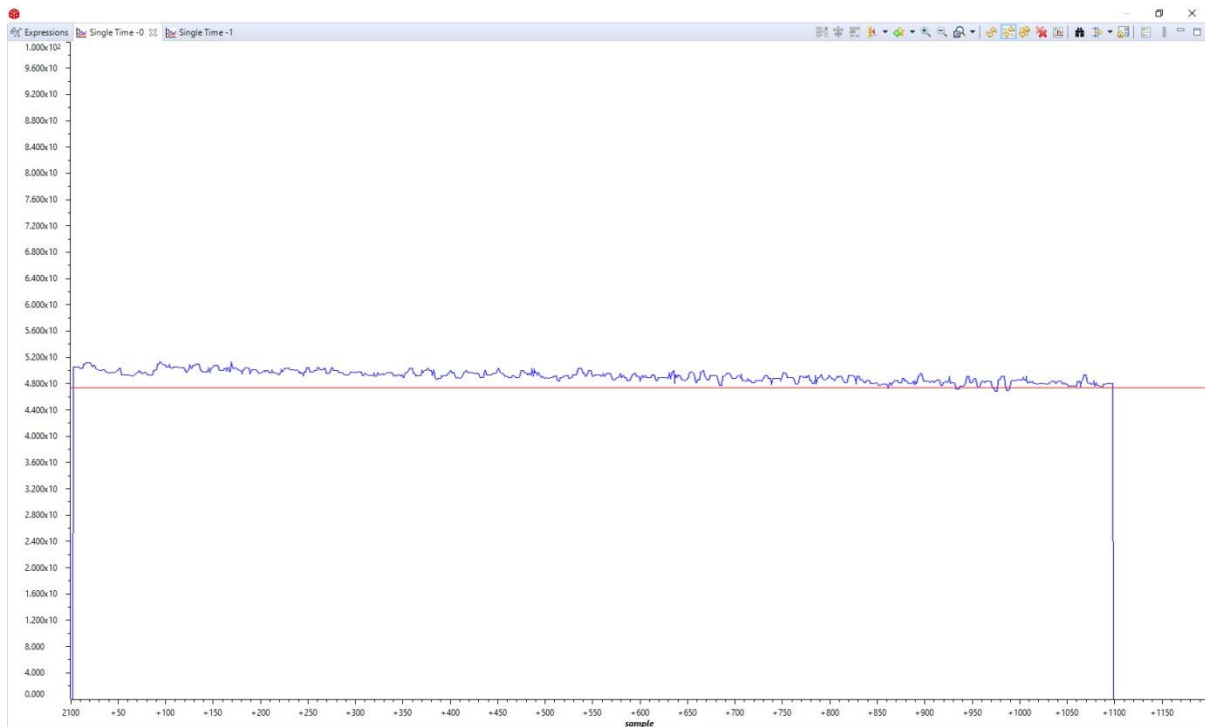
Σχ.93. Η απόκριση του σχ.76 αφού εφαρμοστεί το φίλτρο.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η εφαρμογή του φίλτρου δεν οδηγεί στην απώλεια των σωστών τιμών των παραμέτρων.

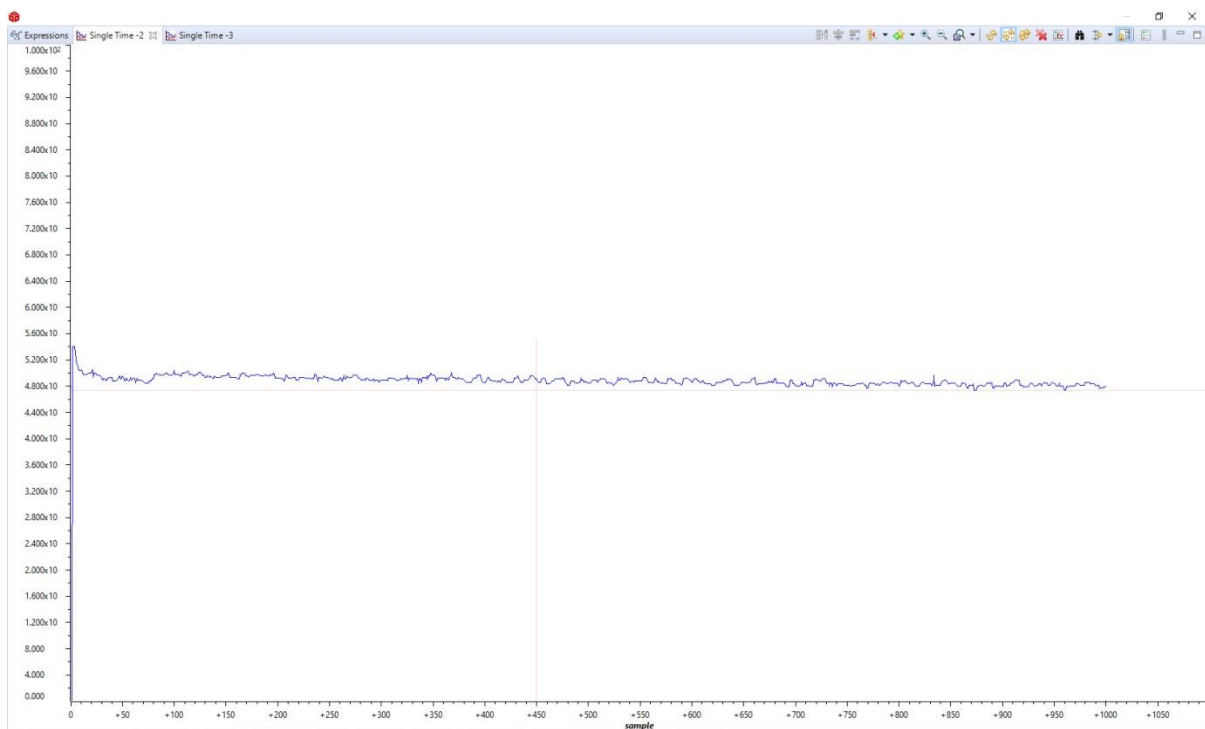
Ένα αρνητικό σημείο αυτής της προσέγγισης είναι ότι η εξομάλυνση προκαλεί απώλεια των διαφορών για γειτονικές συχνότητες, όπως ακριβώς το «θόλωμα» σε μία φωτογραφία που βρίσκεται εκτός εστίασης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο αντίκτυπος είναι ασήμαντος.

11. Σύγκριση αποκρίσεων ημιτόνου, τετραγώνου & τριγώνου.

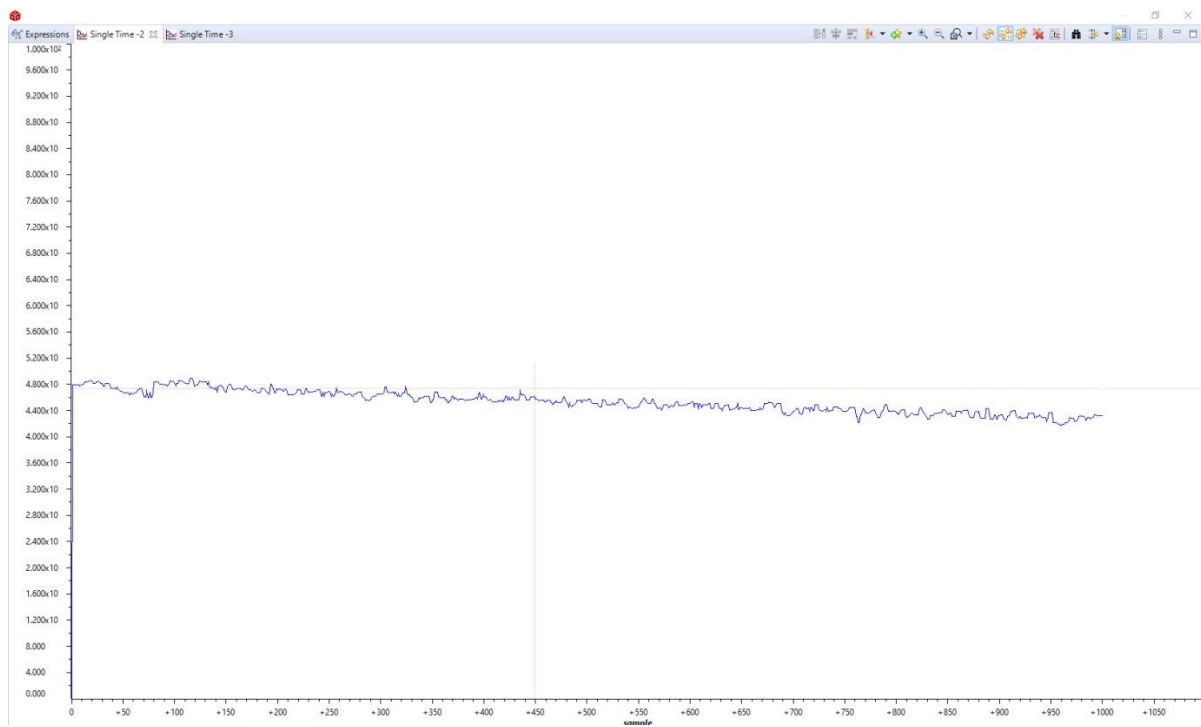
Πάρθηκαν αποκρίσεις συχνότητας και στις τρεις κυματομορφές για να διαπιστωθούν οι μεταξύ τους διαφορές. Χρησιμοποιήθηκε αντίσταση 47Ω. Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα.



Σχ.94. Απόκριση πλάτους σε είσοδο ημίτονο.

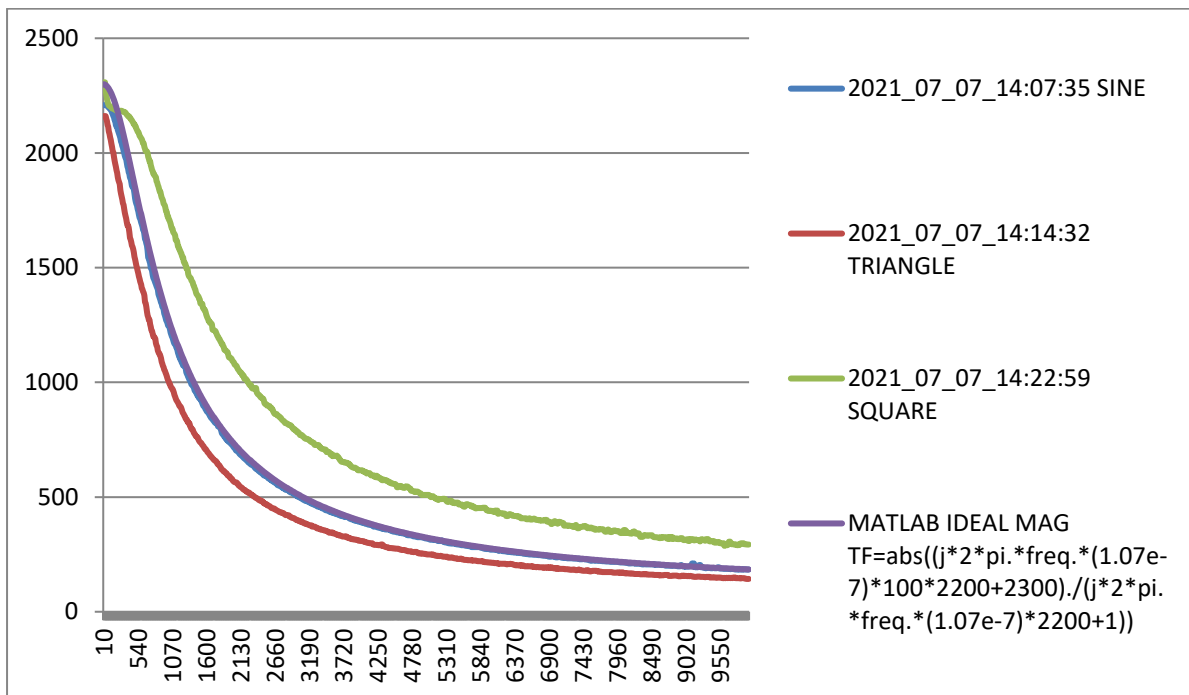


Σχ.95. Απόκριση πλάτους σε είσοδο τετράγωνο. Η απόκριση είναι σχεδόν πανομοιότυπη εκτός της τιμής των 10Hz.



Σχ.96. Απόκριση πλάτους σε είσοδο τρίγωνο. Όπως φαίνεται η απόκριση είναι όμοια με μια σταθερή διαφορά της τάξης των 4Ω σε σχέση με τις ημιτονοειδείς και τετραγωνικές αποκρίσεις. Η αιτία γι' αυτό είναι ότι οι κορυφές στην τριγωνική κυματομορφή εξαρτώνται έντονα από ανώτερες αρμονικές οι οποίες αποσβένονται λόγω απώλειας εύρους ζώνης.

Για ωμικά φορτία οι τρεις μέθοδοι αποκρίσεων είναι όμοιες, όμως σε μιγαδικά φορτία παρατηρείται διαφοροποίηση λόγω των αρμονικών που περιέχουν οι τετραγωνικές και τριγωνικές κυματομορφές. Για παράδειγμα όσον αφορά το δικτύωμα Randles, ελήφθησαν αποκρίσεις μέτρου και με τις τρεις κυματομορφές, με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στο **σχ.97**. Η τελευταία απόκριση είναι η θεωρητική από το MATLAB και θεωρεί τον πυκνωτή C με τιμή 107nF . Καθώς ο πυκνωτής είναι ανοχής 20%, χρειάστηκε να λάβουμε την πραγματική τιμή του από μετρητή LCR που παρουσιάζεται στο **σχ.98**.



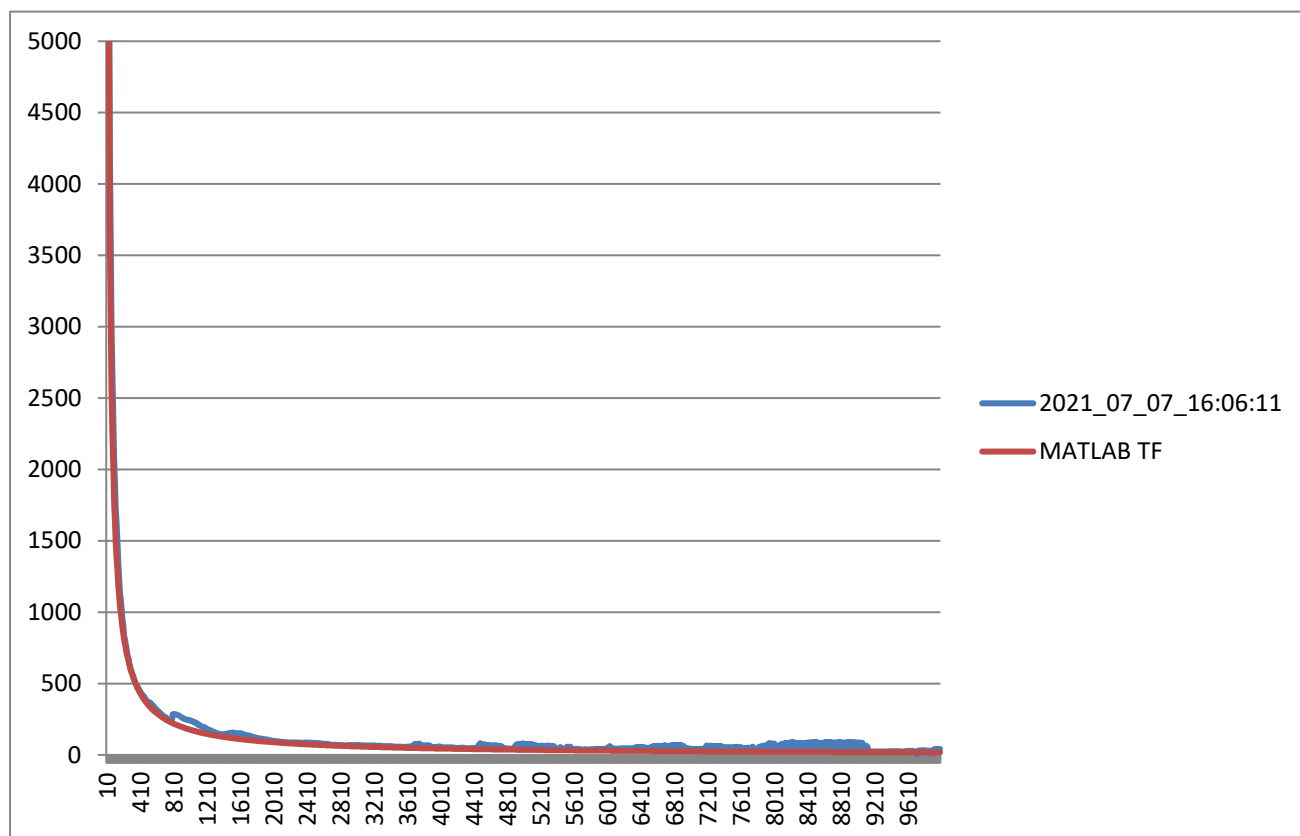
Σχ. 97. Οι αποκρίσεις RANGLES για τις τρεις κυματομορφές και τη θεωρητική συνάρτηση στο MATLAB. Όπως βλέπουμε η ημιτονοειδής απόκριση ταιριάζει απόλυτα με τη θεωρητική, εκτός από τις πολύ χαμηλές συχνότητες όπου υπάρχει κάποια απόκλιση.



Σχ.98. Μετρητής LCR της εταιρείας EXTECH.

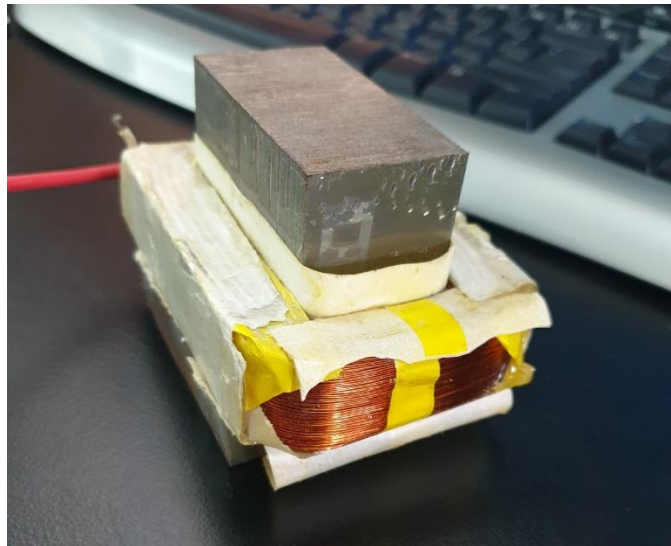
12. Απόκριση για πυκνωτή και πηνίο.

Για διακρίβωση του συστήματος με απλό κεραμικό πυκνωτή τιμής 820nF (πραγματική 893nF), η απόκριση βγάζει επίσης αρκετά καλά αποτελέσματα (σχ.99). Κάποιες περιοχές παρουσιάζουν θόρυβο στην καμπύλη.



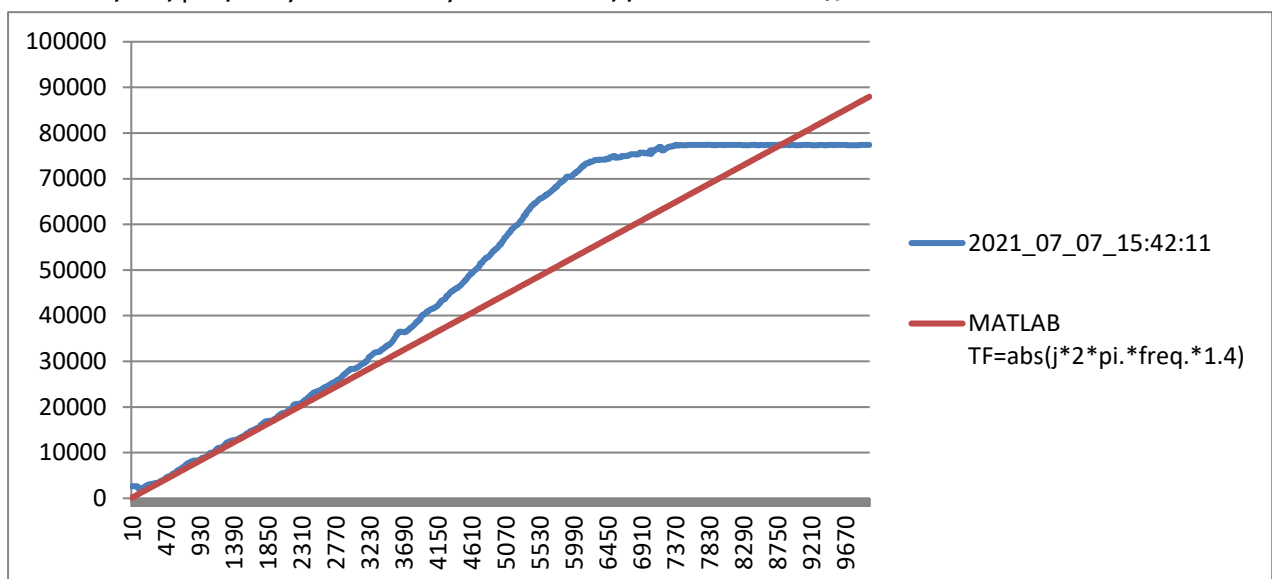
Σχ.99. Απόκριση μέτρου σε κεραμικό πυκνωτή 830nF.

Επιπλέον, για τις ανάγκες της εφαρμογής χρειάζεται η μέτρηση καθαρού επαγωγικού φορτίου με τη συσκευή. Όμως τα πηνία που χρησιμοποιούνται σε κυκλώματα (είναι της τάξης των μH) δεν εμφανίζουν σημαντική επαγωγική αντίδραση μέχρι να ξεπεραστεί το 1 MHz. Για τον λόγο αυτό χρειάστηκε να χρησιμοποιηθεί μετασχηματιστής από άλλη διάταξη (φούρνο μικροκυμάτων) και ειδικά το δευτερεύον του, το οποίο χαρακτηρίζεται από πολλές σπείρες (σχ.100).



Σχ.100. Μετασχηματιστής από φούρνο μικροκυμάτων, του οποίου το πρωτεύον (πάνω μέρος) έχει αφαιρεθεί. Οι σπείρες του κάτω μέρους του (δευτερεύον) είναι πολύ πυκνές και στα άκρα χαρακτηρίζονται από αυτεπαγωγή ≈ 1.4 H. Η αυτεπαγωγή μετρήθηκε με το όργανο LCR.

Η απόκριση μέτρου για το εν λόγω στοιχείο βρίσκεται στο **σχ.101**.

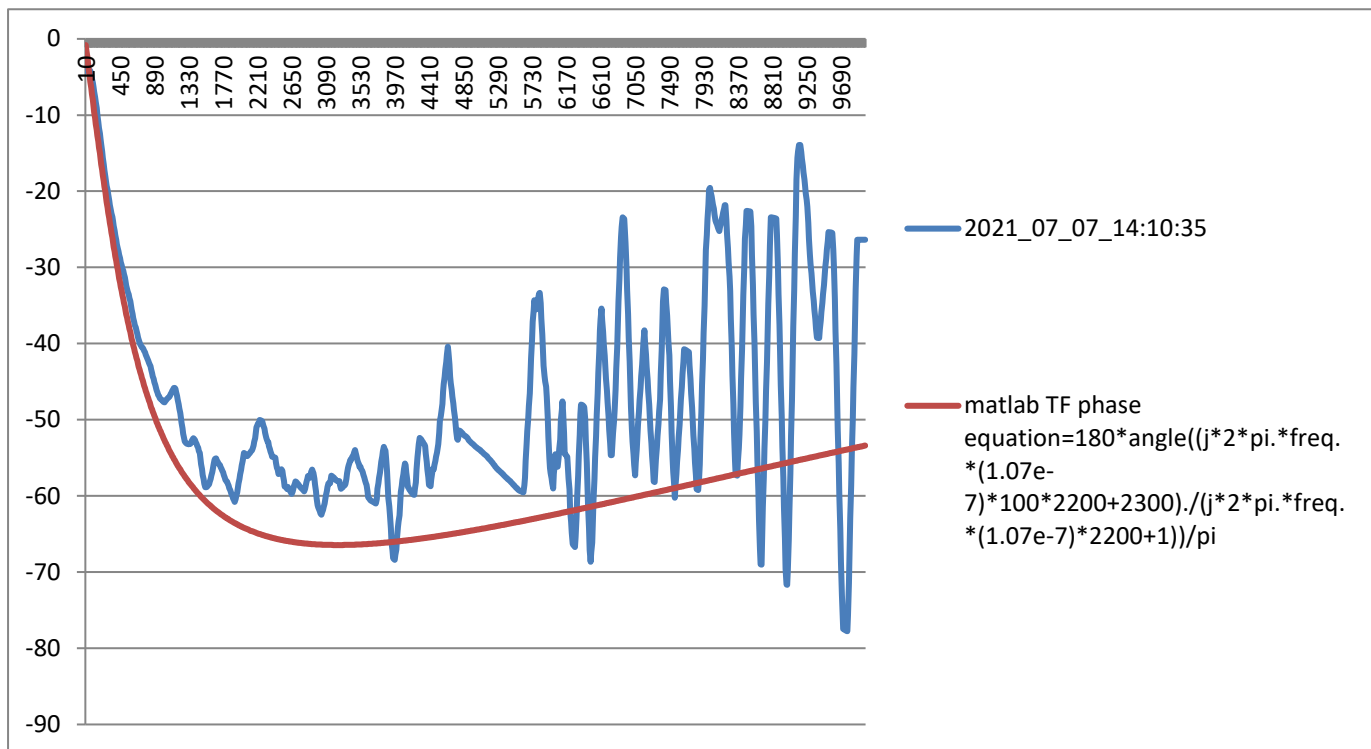


Σχ.101. Απόκριση μέτρου για τον μετασχηματιστή. Η απόκριση είναι σύμφωνη με τη θεωρητική (MATLAB) έως τα ~ 2 kHz, μετά όμως εκτρέπεται. Αυτό οφείλεται σε μη-ιδανικά χαρακτηριστικά, όπως παρασιτική χωρητικότητα, που έχει το στοιχείο και το οδηγεί σε συντονισμό.

Γενικά, η απόδοση του συστήματος για καθαρά χωρητικά φορτία δεν είναι βέλτιστη, όμως το σύστημα δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε τέτοια φορτία.

13. Απόκριση φάσης.

Χρησιμοποιώντας πάλι το δοκιμαστικό κύκλωμα Randles και τη θεωρητική του απόκριση στο MATLAB, συγκρίνουμε την απόκριση φάσης με τη συσκευή μας.

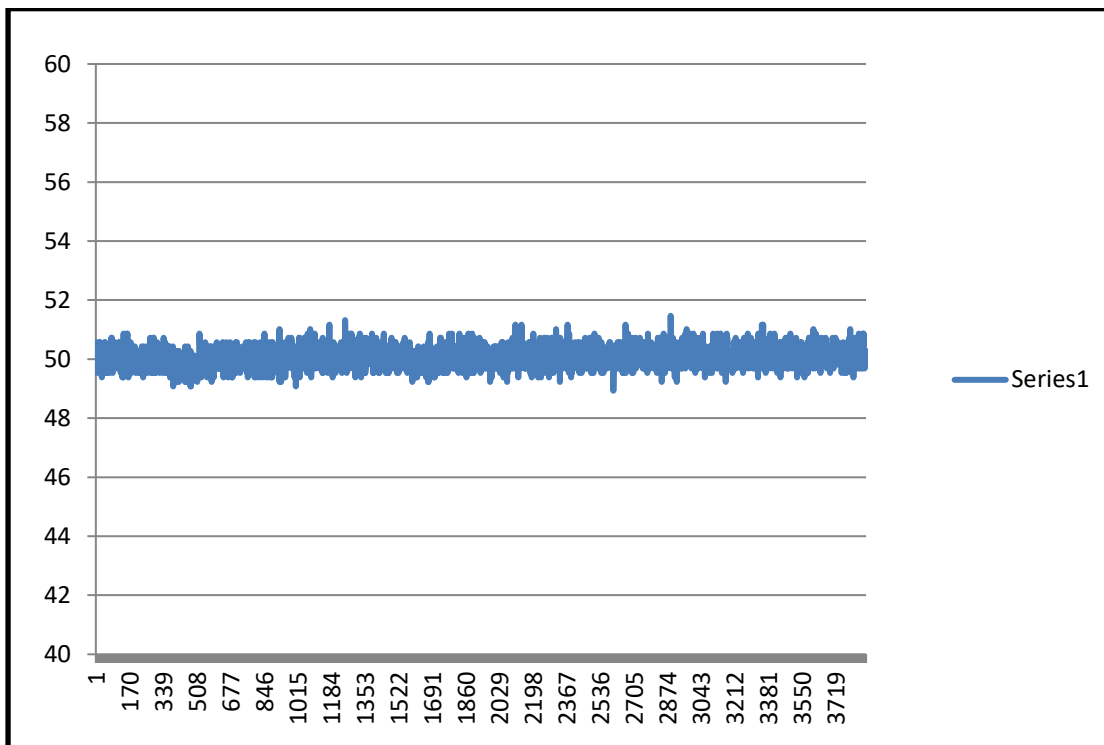


Σχ.102. Απόκριση φάσης του δοκιμαστικού κυκλώματος Randles (μπλε καμπύλη) και σύγκριση με τη θεωρητική.

Η συσκευή ξεκινά να χάνει ακρίβεια στη μέτρηση της φάσης περί τα $\sim 300\text{Hz}$. Ο λόγος για την αδυναμία ακριβούς ανάγνωσης φάσης σε υψηλότερες συχνότητες είναι η ανεπαρκής συχνότητα δειγματοληψίας ενός απλού μικροελεγκτή, που γίνεται εμφανής από τις ταλαντώσεις γύρω από τη σωστή τιμή που κάνει η μπλε καμπύλη, προσπαθώντας να την προσεγγίσει. Μπορούμε να δεχτούμε ότι, με μειωμένη ακρίβεια, είναι αναγνώσιμη η συμπεριφορά του δείγματος (χωρητική/επαγωγική) έως τα 1000Hz . Όμως σίγουρα δεν μπορεί να γίνει εξαγωγή παραμέτρων από την απόκριση φάσης όπως γίνεται από την απόκριση μέτρου.

14. Μακροχρόνια ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

Καθώς η συσκευή χρησιμοποιείται για μετρήσεις κάποιων ημερών, χρειάστηκε να διαπιστωθεί η μακροχρόνια ακρίβεια και σταθερότητα (long term stability) που έχει. Παρακάτω παρουσιάζεται γράφημα μέτρησης αντίστασης 47Ω σε μία συχνότητα (300Hz) για 3 ημέρες.

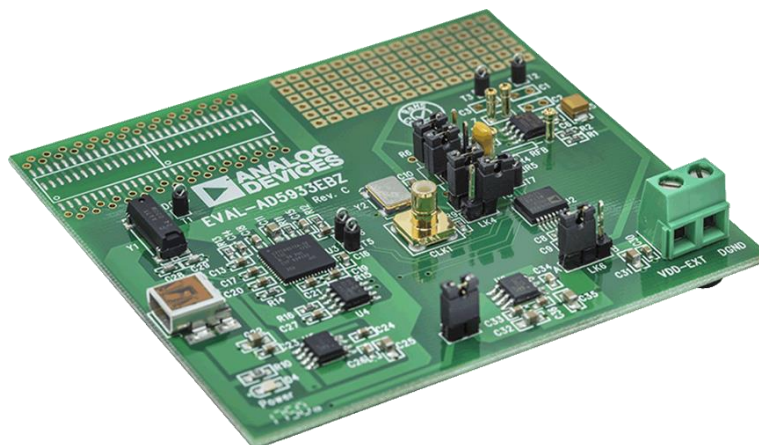


Σχ.103. Μακροχρόνια ακρίβεια για αντίσταση 47Ω. Ο οριζόντιος άξονας είναι ο αύξοντας αριθμός των μετρήσεων. Μετρήσεις λαμβάνονται κάθε 1 λεπτό.

Όπως βλέπουμε δεν υπάρχει αξιοσημείωτη ολίσθηση στη μέτρηση. Επίσης ως σημειωθεί ότι οι μετρήσεις συνολικά έχουν τυπική απόκλιση 0,322, δηλαδή 0,6%. Τα παραπάνω καταδεικνύουν την επαναληψιμότητα που χαρακτηρίζει το σύστημα.

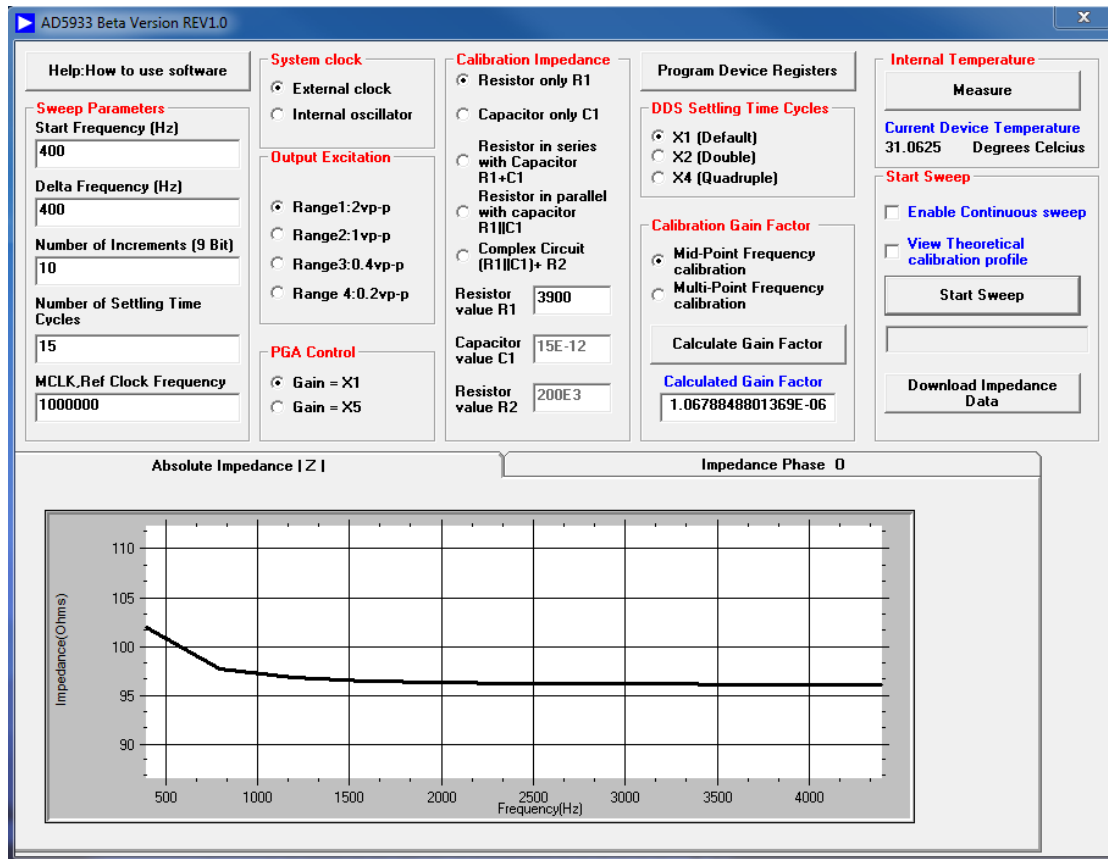
15. Σύγκριση με εμπορικό σύστημα AD5933

Το σύστημα συγκρίθηκε με το εμπορικό AD5933, του οποίου η αναπτυξιακή πλακέτα παρουσιάζεται στο **σχ.104**. Το εν λόγω σύστημα της Analog Devices ακολουθεί την προσέγγιση FTEIS που περιεγράφηκε στην εν.1.2. Μέγιστος αριθμός συχνοτήτων ανά μέτρηση φάσματος είναι οι 500.



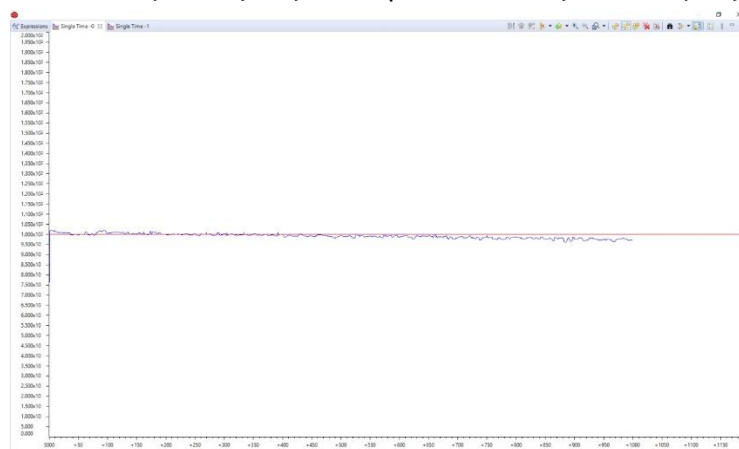
Σχ.104. Αναπτυξιακό AD5933 (Analog Devices).

Το σύστημα αυτό γενικά δεν δείχνει καλή συμπεριφορά. Συνήθως δίνει ανακριβείς μετρήσεις. Για παράδειγμα, η καλύτερη απόκριση μέτρου που επιτεύχθηκε με το συγκεκριμένο σύστημα για μια αντίσταση 100Ω παρουσιάζεται στο **σχ.105**. Για λόγους σύγκρισης, στο **σχ.106** παρατίθεται η απόκριση με το σύστημα που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας σε εύρος 10kHz.



Σχ.105. Η διεπαφή χρήστη του συστήματος EVAL-AD5933 σε περιβάλλον Windows όπου εισάγονται οι παράμετροι της μέτρησης και παρουσιάζονται τα αποτελέσματα. Κάτω μέρος: απόκριση μέτρου για αντίσταση 100Ω. Εύρος συχνοτήτων 400-4400Hz.

Πρόκειται για μια αποδεκτή απόκριση που όμως χάνει εύρος ζώνης αρκετά γρήγορα.



Σχ.106. Απόκριση μέτρου από το σύστημα που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, σε αντίσταση 100Ω. Εύρος συχνοτήτων 10-10000Hz.

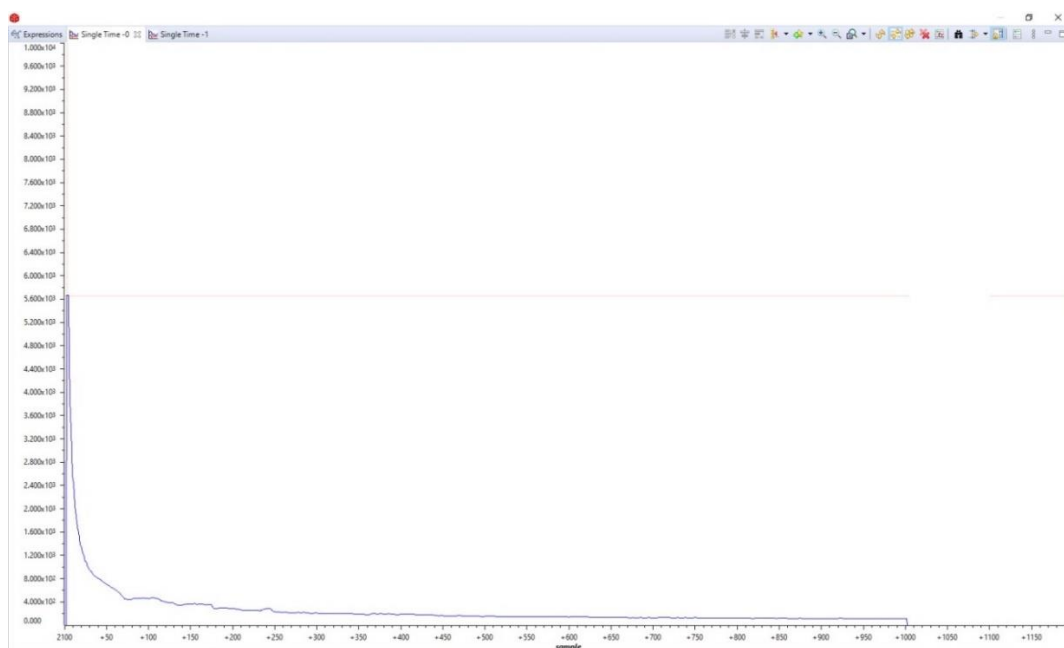
Τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι τα εξής:

- Το AD5933 έχει παρόμοια ακρίβεια με το προτεινόμενο σύστημα, όμως έχει αρκετά χειρότερη επαναληψιμότητα. Χρειάστηκαν πολλές μετρήσεις φάσματος για να επιτευχθεί το παραπάνω αποδεκτό αποτέλεσμα.
- Το AD5933 μπορεί να μετρήσει σε συχνότητες έως 1MHz θεωρητικά. Όμως τα πειράματα που προηγήθηκαν δείχνουν απώλεια εύρους ζώνης αρκετά νωρίς.
- Το AD5933 χρησιμοποιεί μέθοδο FTEIS μέσω DFT. Χαρακτηριστικό είναι ότι ο χρόνος που χρειάζεται είναι $\sim 30s$ για σάρωση σε 100 συχνότητες. (Το σύστημα που αναπτύχθηκε σε αυτή την εργασία σαρώνει 1000 συχνότητες σε $\sim 7s$ με τη μέθοδο σάρωσης μονού-ημιτόνου.) Απ' ότι φαίνεται ένας απλός μικροελεγκτής που είναι ενσωματωμένος σε αυτό το IC δεν αρκεί για να εκτελέσει τους απαραίτητους υπολογισμούς γρήγορα, και πιθανότατα αυτή η αρχιτεκτονική συστήματος απαιτεί λύσεις που περιλαμβάνουν DSP (ψηφιακούς επεξεργαστές σημάτων). Κάτι τέτοιο θα αύξανε ραγδαία την πολυπλοκότητα του συστήματος μας.

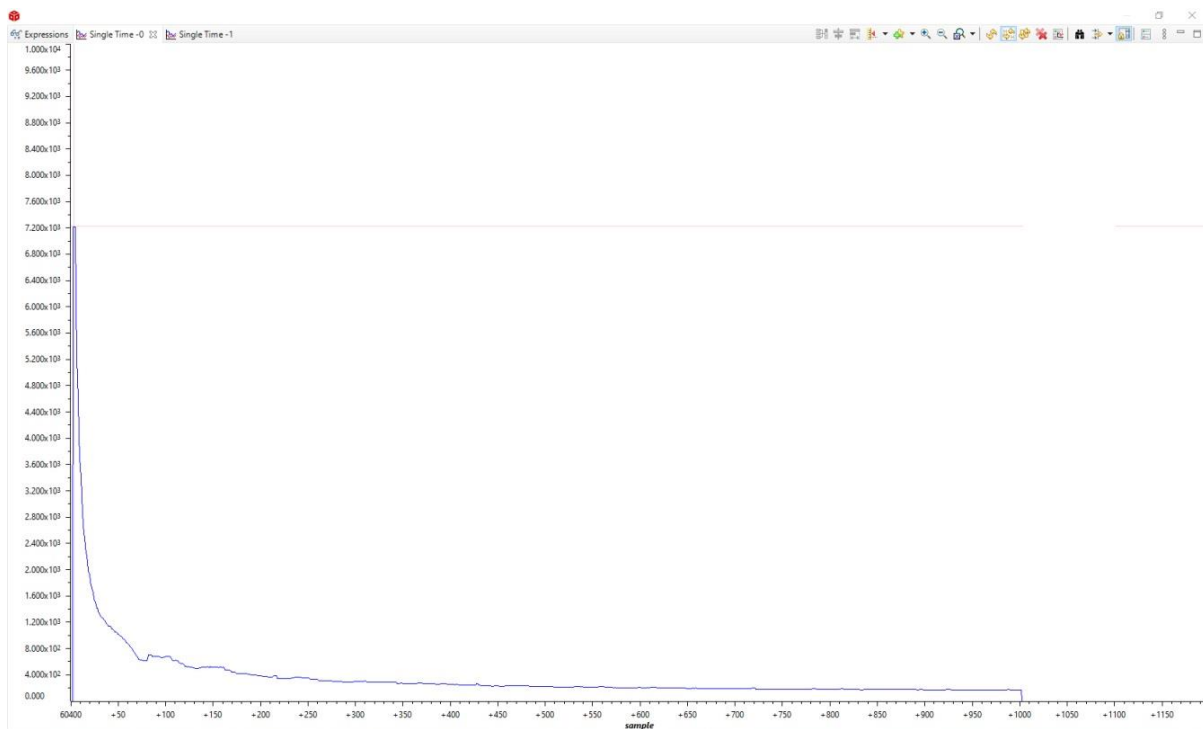
16. Προκαταρκτικές μετρήσεις με διάλυμα αλατόνευρου.

Κατά την περίοδο ανάπτυξης του προτεινόμενου κυκλώματος ελάμβαναν χώρα πειράματα λειτουργίας του όλου συστήματος με καλλιέργειες κυττάρων, ωστόσο ενδεικτικά πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε ηλεκτρολυτικό διάλυμα αλατόνευρου.

Χαρακτηριστική είναι η διαφορά μεταξύ μετρήσεων 2- και 4-σημείων, όπως αποτυπώνεται στις αποκρίσεις πλάτους των σχ.107 και 108. Εκεί φαίνεται η διαφορά της εμπέδησης, ειδικά στις χαμηλές συχνότητες όπου η εμπέδηση του ηλεκτροδίου παροχής ρεύματος υπεισέρχεται στη μέτρηση 2-σημείων (σχ.108). Ο αναγνώστης παραπέμπεται στα σχ.24,25 για την εξήγηση της περιοχής αυτής. Αντιθέτως η απόκριση του σχ.107 μένει ανεπηρέαστη από τη συγκεκριμένη επίδραση, σε συμφωνία με τη θεωρία.



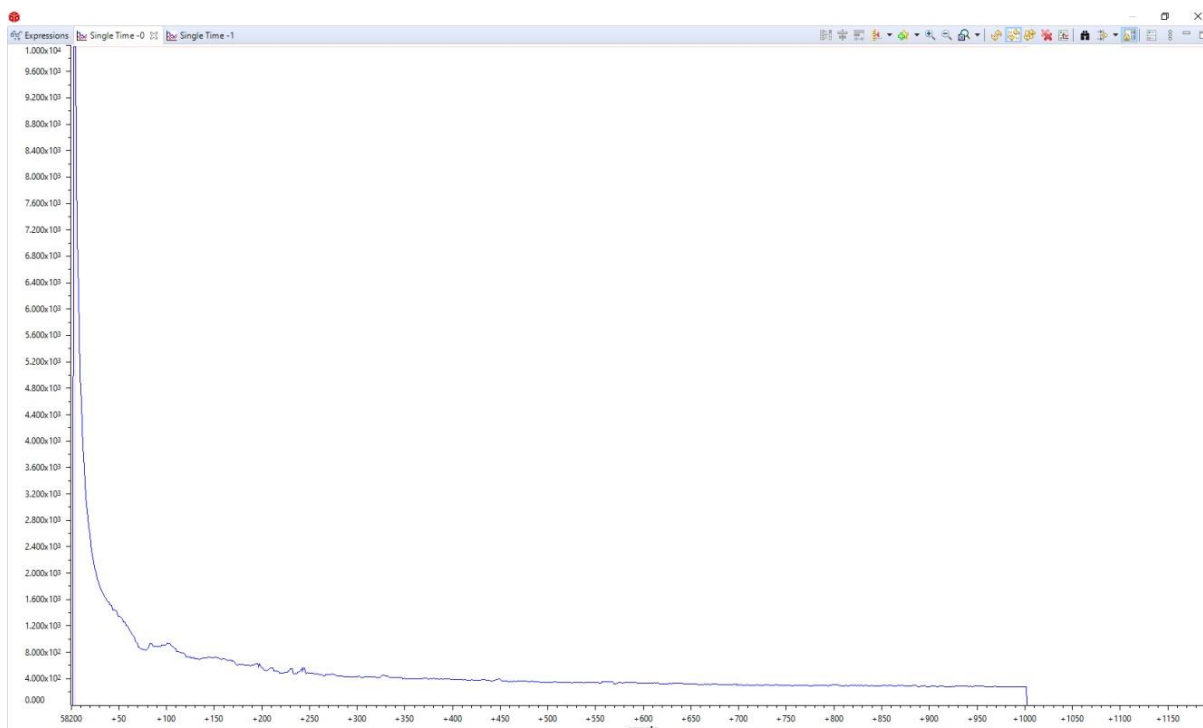
Σχ.107. Φάσμα πλάτους σε διάλυμα αλατόνευρου χρησιμοποιώντας 4-σημείων μέτρηση.



Σχ.108. Φάσμα πλάτους σε διάλυμα αλατόνευρου χρησιμοποιώντας 2-σημείων μέτρηση.

Μεταξύ των δύο αυτών μεθόδων, ειδικά στη συχνότητα των 10 Hz παρατηρείται διαφορά της τάξης των 1.6kΩ.

Συγκρίνοντας την απόκριση του σχ.108 με την απόκριση ενός πιο αραιού διαλύματος αλατόνευρου (σχ.109) μπορούμε να παρατηρήσουμε κάποιες διαφορές.

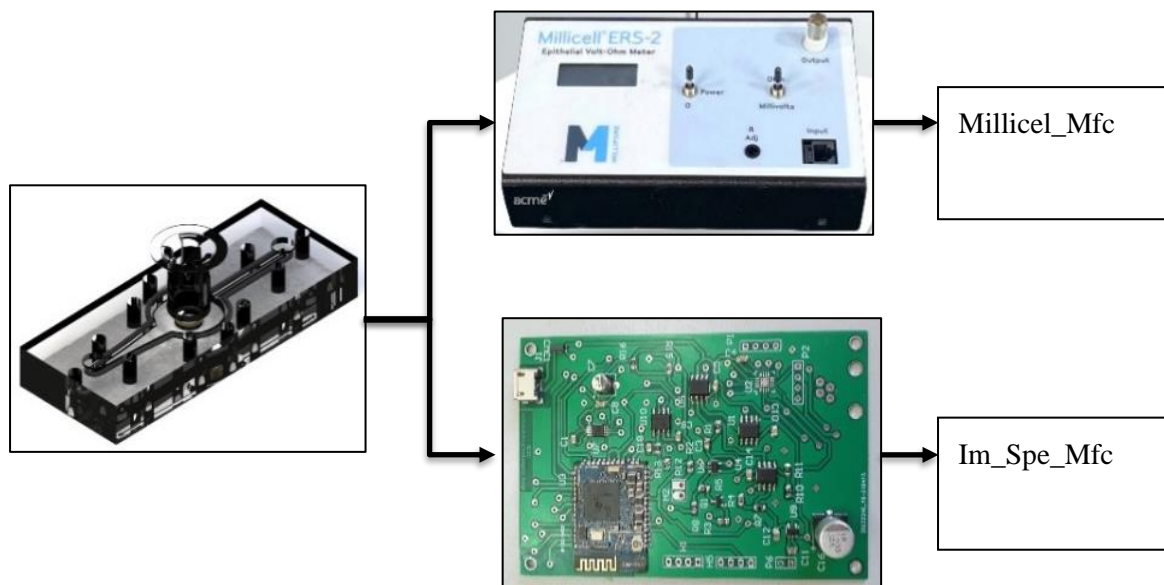


Σχ.109. Φάσμα πλάτους σε αραιό διάλυμα αλατόνευρου χρησιμοποιώντας 2-σημείων μέτρηση.

Στο αραιό διάλυμα του **σχ.109** η εμπέδηση στις χαμηλές συχνότητες ξεφεύγει εκτός κλίμακας μέτρησης. Αυτό συμβαίνει, διότι ο πυκνωτής της επιφάνειας του ηλεκτροδίου C_{EL} , που χαρακτηρίζεται από την C_{dl} , είναι αρκετά μικρότερος. Επίσης για την αυξημένη εμπέδηση σε όλο το φάσμα ευθύνεται η αυξημένη αντίσταση διαλύματος, R_{medium} , η οποία οφείλεται στη μειωμένη συγκέντρωση ιόντων ηλεκτρολύτη.

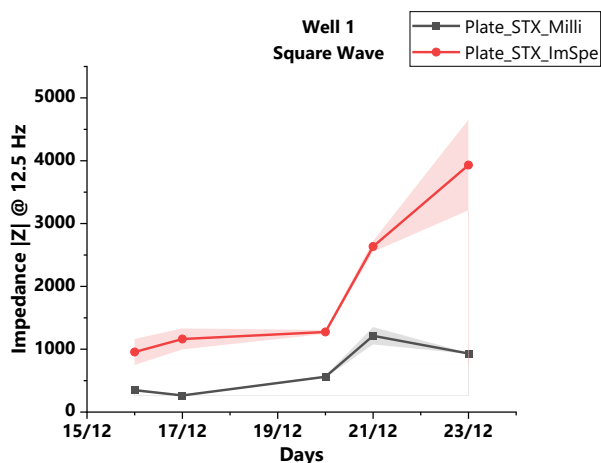
17. Προκαταρκτικές μετρήσεις σε καλλιέργειες κυττάρων

Η διάταξη που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσης εργασίας εφαρμόστηκε σε πειράματα που διεξήχθησαν σε πραγματικές καλλιέργειες κυττάρων σε συνεργασία με την Β' Παιδιατρική Κλινική του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι παρακάτω μετρήσεις έγιναν μέσα στον επωαστή κυττάρων, μεταφέροντας το transwell πηγάδι με τα κύτταρα, από το Plate στο μικρορευστομηχανικό σύστημα. Τα ηλεκτρόδια που χρησιμοποιήθηκαν εδώ είναι τα STX.



Σχ.110. Τα βασικά μέρη της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε για αξιολόγηση κυτταρικών καλλιεργειών τόσο με το εμπορικό TEER σύστημα της εταιρίας Millicell, όσο και με το σύστημα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο microSENSES

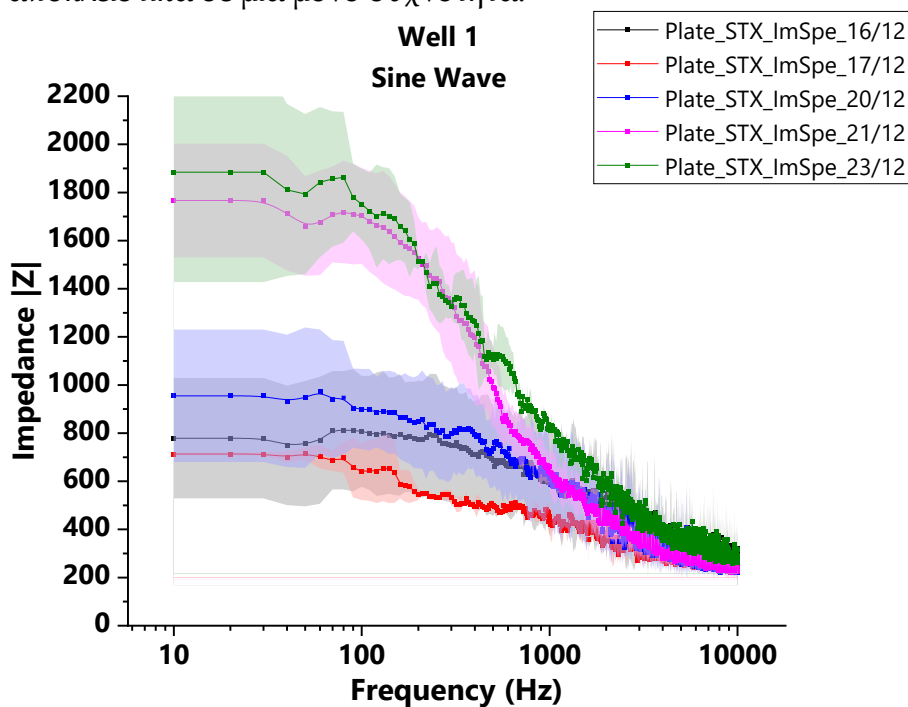
Στο 1^ο σετ μετρήσεων, υπήρχαν τρία πηγάδια με καλλιέργειες, τα οποία καλλιεργήθηκαν για επτά ημέρες.



Σχ.111. Σύγκριση μεταξύ του προτεινόμενου συστήματος ΒΙΟ-ΦΕ (κόκκινη καμπύλη) και του εμπορικού ΤΕΕΡ συστήματος της Millicell. Η σύγκριση γίνεται για το ίδιο τετραγωνικό σήμα ρεύματος 12,5Hz. Οι αποκλίσεις από τις καμπύλες του γραφήματος δείχνουν τις διαφορές των 3 καλλιέργειών, και οι ίδιες οι καμπύλες τους μέσους όρους.

Όπως διακρίνουμε στο παραπάνω σχήμα η «γενική τάση» (trend) και για τα 2 συστήματα μέτρησης είναι ίδια, δηλαδή μια άνοδος της ΤΕΕΡ από την 6^η μέρα. Αυτό καταδεικνύει έναν σταδιακό σχηματισμό πυκνού φραγμού στενοσυνδέσμων. Η διαφορά λόγω σφαλμάτων κέρδους μεταξύ των δυο συστημάτων πιθανότατα οφείλεται στον τρόπο μέτρησης για τετραγωνικούς παλμούς όπως εξηγείται στο εδ.1.4.4.

Στο σχήμα 112 παρουσιάζεται πειραματική ανάλυση ΒΙΟ-ΦΕ στις τρεις καλλιέργειες με χρήση του προτεινόμενου συστήματος. Σημειώνεται ότι η συγκεκριμένη μελέτη δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί με το εμπορικό σύστημα της Millicell καθώς αυτό λειτουργεί αποκλειστικά σε μία μόνο συχνότητα.



Σχ.112. Ανάλυση ΒΙΟ-ΦΕ όπου φαίνονται τα φάσματα για τις 3 καλλιέργειες. Για τα ημιτονικά αυτά σήματα παρατηρείται αρκετή διαφορά μεταξύ των καλλιέργειών, όπως φαίνεται και από τις αποκλίσεις από τον μέσο όρο στα γραφήματα.

9) Γενικότερα Σχόλια

Από τις παραπάνω μετρήσεις εξάγονται ορισμένα στοιχεία :

- Η TEER φαίνεται από το πλατώ στην περιοχή των 10Hz και οποιαδήποτε περαιτέρω αλλαγή της εμπέδησης ξεκινά από τα 13Hz. Επίσης στα 10kHz η εμπέδηση έχει σχεδόν φτάσει στο επόμενο πλατώ. Τα αναφερόμενα αποτελέσματα ενισχύουν την επιλογή μας για έναρξη της σάρωσης από τη συχνότητα των 10Hz και τερματισμό στα 10kHz, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία που αναφέρθηκε στις εν. 1.4.5.2, 1.4.5.3, 1.4.5.5.
- Η TEER αυξάνεται σταθερά κατά τις μέρες της επώασης, σε συμφωνία με το γεγονός του σταδιακού σχηματισμού των στενοσυνδέσμων.
- Στη συχνότητα των 10 kHz η εμπέδηση φαίνεται σταθερή κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, αποτελούμενη μόνο από την R_{medium} , φαινόμενο σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία που αναφέρθηκε στην εν. 1.4.5.2.
- Χρησιμοποιώντας τις μεθόδους μη-γραμμικής παλινδρόμησης στο Matlab, η χωρητικότητα δεν φαίνεται να αλλάζει σε αυτές τις συνθήκες των πειραμάτων. Ίσως η αλλαγή χωρητικότητας να αφορά αποπτωτικά κύτταρα, τα οποία δεν ήταν διαθέσιμα (βλ. εν.1.4.5.2). Περαιτέρω μελέτες ίσως δείξουν επίδραση στη χωρητικότητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Συμπεράσματα και προτάσεις.

Στην παρούσα φάση υλοποίησης της μεταπτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκαν οι εξής δραστηριότητες:

- Μελετήθηκε η Φασματοσκοπία Εμπέδησης (ΦΕ) σαν τεχνική και αναλύθηκαν οι προσεγγίσεις υλοποίησής της.
- Μελετήθηκαν τα πεδία εφαρμογών της ΦΕ με ειδική στόχευση στο πεδίο των βιολογικών εφαρμογών σε συνδυασμό με μικρορευστομηχανικά συστήματα.
- Έγινε εκτενής αναφορά σε παραδείγματα υλοποίησης της ΦΕ με διάφορες μεθοδολογίες και αναλύθηκαν τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της καθεμιάς.
- Μελετήθηκε, σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε μια νέα προσέγγιση συστήματος ΦΕ, βασισμένου στη φορητότητα, το μικρό κόστος, την ευελιξία εφαρμογής και την αξιοπιστία.
- Αναλύθηκαν και παρουσιάστηκαν όλα τα επιμέρους στοιχεία του προτεινόμενου συστήματος.
- Πραγματοποιήθηκε προσομοίωση του προτεινόμενου συστήματος.
- Το σύστημα αξιολογήθηκε και συγκρίθηκε με άλλα διαθέσιμα συστήματα.
- Το σύστημα ελέγχεται σε πραγματικές συνθήκες σε συνεργασία με το εργαστήριο της Β' παιδιατρικής κλινικής του ΕΚΠΑ. Τα αποτελέσματα μέχρι στιγμής είναι ικανοποιητικά. Πειράματα διεξάγονται στο εν λόγω εργαστήριο, ενώ γράφεται η παρούσα εργασία.

1) Μελλοντικοί Στόχοι:

- Όπως εξηγήθηκε στην εν. 2.8.10, ο θόρυβος του WIFI επηρεάζει ελαφρώς τη μέτρηση στις χαμηλές συχνότητες. Εάν αυτό στο μέλλον αποδειχθεί σημαντική παράμετρος για τα πειράματα, ίσως κριθεί απαραίτητη η προσθήκη εξωτερικού ADC που δεν θα επηρεάζεται από τον εν λόγω θόρυβο, ή Εναλλακτικά εξωτερικό WIFI PHY, όπως το TI CC3100.
- Λόγω της συνεχούς ενημέρωσης των κινητών εφαρμογών (android, IOS), στην περίπτωση που συνεχιστούν τα πειράματα, θα χρειαστεί υποστήριξη της εφαρμογής με αναβαθμίσεις για νέες εκδόσεις και ίσως χρησιμοποιηθούν services που θα τρέχουν στο παρασκήνιο αντί των threads. Επίσης, βελτιστοποίηση εμφανισιακά της εφαρμογής είναι δυνατή.

- Εάν συνεχίσει να χρησιμοποιείται το σύστημα, σκόπιμη θα είναι μια βελτίωσή του με ένα πιο εύχρηστο προστατευτικό περίβλημα και ίσως αδιάβροχο φέρνοντάς το σε εμπορικά standards.
- Με μικρή αλλαγή στο κύκλωμα και χωρίς αντίκτυπο στις επιδόσεις, είναι δυνατή η πολυπλεξία πολλών καναλιών μέτρησης, ώστε να σαρώνονται πολλά δείγματα ταυτόχρονα αντί του ενός μόνο καναλιού. Έτσι μπορούν να γίνουν μελέτες σε πολλές καλλιέργειες με μία μόνο ηλεκτρονική συσκευή.

Δημοσιεύσεις

Στη διάρκεια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας και για την απόκτηση του μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών, πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω επιστημονικές δημοσιεύσεις:

- G. Paivana, D. Barmpakos, S. Mavrikou, A. Kallergis, O. Tsakiridis, G. Kaltsas and S. Kintzios “Evaluation of cancer cells lines by four-point probe technique, by impedance measurements in various frequencies” *Biosensors* 2021, 11(9), 345; <https://doi.org/10.3390/bios11090345>
- T. Koutsis, A. Kallergis, S. Taka, N. G. Papadopoulos and G. Kaltsas, “A microfluidic system for evaluation of in vitro cell cultures through TEER and Electrical Impedance Spectroscopy”, *Micro Nano 2023, 10th International Conference on Micro-Nanoelectronics, Nanotechnology and MEMS*, Athens, Greece, Nov. 2-5, 2023.
- Kallergis, T. Koutsis, P. Tzani-Tzanopoulou, S. Taka, N. G. Papadopoulos, G. Kaltsas, “Development of an Impedance Spectroscopy System for Biomedical Applications”, *Micro Nano 2022, 9th International Conference on Micro-Nanoelectronics, Nanotechnology and MEMS*, Xanthi, Greece, Nov. 4-5, 2022.
- Τ. Κούτσης, Π. Τζανή-Τζανοπούλου, Α. Καλλέργης, Σ. Τάκα, Ν. Γ. Παπαδόπουλος, Γ. Καλτσάς «Μικρορευστομηχανικό σύστημα μέτρησης της εμπέδησης επιθηλιακών κυττάρων», *State of the Art 2023*, Αθήνα, 02-05 Φεβ. 2023 (Best Poster Award).

- [1] Kushner, Robert F. "Bioelectrical impedance analysis: a review of principles and applications." *Journal of the American College of Nutrition* 11 2 (1992): 199-209.
- [2] Open-Source Potentiostat for Wireless Electrochemical Detection with Smartphones Alar Ainla, Maral P. S. Mousavi, Maria-Nefeli Tsaloglou, Julia Redston, Jeffrey G. Bell, M. Teresa Fernández-Abedul, and George M. Whitesides, *Analytical Chemistry* 2018 90(10), 6240-6246
- [3] Valentinuzzi, Max. Principles of applied biomedical instrumentation (third edition) L. A. Geddes and L. E. Baker, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK; 1989, 987pp. *Journal of Biomedical Engineering - J BIOMED ENG.* 14. 86-86. 10.1016/0141-5425(92)90043-K.
- [4] Prodomidis, Mamas "Impedance spectroscopy principles", Presentation
- [5] Autolab Application Note EC08 Basic overview of the working principle of a potentiostat/galvanostat (PGSTAT) –Electrochemical cell setup
- [6] D. Biswas, K. Pal, U. Kumar and D. N. Tibrewala, "Development of low cost bioimpedance analyser for analysing various biological samples," 2012 International Conference on Communications, Devices and Intelligent Systems (CODIS), Kolkata, 2012, pp. 508-511.
- [7] Yuxiang Yang and Jue Wang, "A Design of Bioimpedance Spectrometer for Early Detection of Pressure Ulcer," 2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference, Shanghai, 2005, pp. 6602-6604.
- [8] Cheng, Kuo-Sheng, Cheng-yu Chen, Min-Wei Huang and Chien-Hung Chen. "A Multi-Frequency Current Source For Bioimpedance Application."
- [9] Analog devices, AD8226 Datasheet
- [10] Texas instruments, AN-1515 A Comprehensive Study of the Howland Current Pump
- [11] Macdonald, Digby. (2006). Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta.* 51. 1376-1388. 10.1016/j.electacta.2005.02.107.
- [12] Yoo JS, Park SM. 2000. An electrochemical impedance measurement technique employing Fourier transform. *Anal. Chem.* 72:2035–41
- [13] Electrochemical Impedance Spectroscopy, Byoung-Yong Chang and Su-Moon Park, *Annual Review of Analytical Chemistry* 2010 3:1, 207-229
- [14] Stoynov ZB, Savova-Stoynov BS. 1985. Impedance study of nonstationary systems: four-dimensional analysis. *J. Electroanal. Chem.* 183:133–44
- [15] Smith DE. 1976. The acquisition of electrochemical response spectra by on-line fast Fourier transform. Data processing in electrochemistry. *Anal. Chem.* 48:A221–40
- [16] Popkirov GS, Schindler RN. 1992. A new impedance spectrometer for the investigation of electrochemical systems. *Rev. Sci. Instrum.* 63:5366–72

- [17] Cai M, Park SM. 1996. Oxidation of zinc in alkaline solutions studied by electrochemical impedance spectroscopy. *J. Electrochem. Soc.* 143:3895–902
- [18] Sherif EM, Park SM. 2006. Effects of 1,4-naphthoquinone on aluminum corrosion in 0.50 M sodium chloride solutions. *Electrochim. Acta* 51:1313–21
- [19] Scully JR. 2000. Polarization resistance method for determination of instantaneous corrosion rates. *Corrosion* 56:199–218
- [20] Mansfeld F. 1995. Use of electrochemical impedance spectroscopy for the study of corrosion protection by polymer coatings. *J. Appl. Electrochem.* 25:187–202
- [21] Mansfeld F. 1995. Use spectroscopy for the study of corrosion protection by polymer coatings. *J. Appl. Electrochem.* 25:187–202
- [22] Scully JR. 2000. Polarization resistance method for determination of instantaneous corrosion rates. *Corrosion* 56:199–218
- [23] Johnson BJ, Park SM. 1996. Electrochemistry of conductive polymers. XIX. Oxidation of aniline at bare and polyaniline-modified electrodes studied by electrochemical impedance spectroscopy. *J. Electrochem. Soc.* 143:1269–76
- [24] Horvat-Radosevic V, Kvastek K. 2009. Three-electrode cell set-up electrical equivalent circuit applied to impedance analysis of thin polyaniline film modified electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 631:10–21
- [25] Fernandez-Sanchez C, McNeil CJ, Rawson K. 2005. Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development. *Trends Anal. Chem.* 24:37–48
- [26] Yoo JS, Song I, Lee JH, Park SM. 2003. Real-time impedance measurements during electrochemical experiments and their application to aniline oxidation. *Anal. Chem.* 75:3294–300
- [27] Han LY, Koide N, Chiba Y, Mitate T. 2004. Modeling of an equivalent circuit for dye-sensitized solar cells. *Appl. Phys. Lett.* 84:2433–35
- [28] Mani A, Huisman C, Goossens A, Schoonman J. 2008. Mott-Schottky analysis and impedance spectroscopy of TiO₂/6T and ZnO/6T devices. *J. Phys. Chem. B* 112:10086–91
- [29] Fabregat-Santiago F, Bisquert J, Palomares E, Otero L, Kuang DB, et al. 2007. Correlation between photovoltaic performance and impedance spectroscopy of dye-sensitized solar cells based on ionic liquids. *J. Phys. Chem. C* 111:6550–60
- [30] Lu DS, Li WS, Zuo XX, Yuan ZZ, Huang Q. 2007. Study on electrode kinetics of Li⁺ insertion in Li_xMn₂O₄ (0 ≤ x ≤ 1) by electrochemical impedance spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* 111:12067–74
- [31] Kato T, Nozaki K, Negishi A, Kato K, Monma A, et al. 2004. Impedance analysis of a disk-type SOFC using doped lanthanum gallate under power generation. *J. Power Sources* 133:169–74

- [32] Malevich D, Halliop E, Peppley BA, Pharoah JG, Karan K. 2009. Investigation of charge-transfer and mass-transport resistances in PEMFCs with microporous layer using electrochemical impedance spectroscopy. *J. Electrochem. Soc.* 156:B216–24
- [33] Ava Hedayatipour, Shaghayegh Aslanzadeh, Nicole McFarlane, CMOS based whole cell impedance sensing: Challenges and future outlook, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 143, 2019, 111600, ISSN 0956-5663,
- [34] Wegener, J., Keese, C.R., Giaever, I., 2000. *Exp. Cell Res.* 259 (1), 158–166.
- [35] Bondu, V., Schrader, R., Gawinowicz, M.A., McGuire, P., Lawrence, D.A., Hjelle, B., Buranda, T., 2015. *Viruses* 7 (2), 559–589
- [36] Yang, J.-M., Chen, S.-W., Yang, J.-H., Wang, J.-S., 2011. *Int. Conf. Biomed. Eng. Inf.* 938–941.
- [37] Holmes, D., Pettigrew, D., Reccius, C.H., Gwyer, J.D., van Berkel, C., Holloway, J., Davies, D.E., Morgan, H., 2009. *Lab Chip* 9 (20), 2881–2889.
- [38] Edmondson, R., Broglie, J.J., Adcock, A.F., Yang, L., 2014. *Assay Drug Dev. Technol.* 12 (4), 207–218.
- [39] Caselli, F., Bisegna, P., Maceri, F., 2010. *J. Microelectromech. Syst.* 19 (5), 1029–1040.
- [40] Luong, J.H., Habibi-Rezaei, M., Meghrous, J., Xiao, C., Male, K. B., Kamen, A., 2001. *Anal. Chem.* 73 (8), 1844–1848
- [41] Bagnaninchi, P.O., Drummond, N., 2011. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (16), 6462–6467.
- [42] Paio T, Park SM, Doh CH, Moon SI. 1999. Intercalation of lithium ions into graphite electrodes studied by ac impedance measurements. *J. Electrochem. Soc.* 146:2794–98
- [43] I. Giaever and C. R. Keese, "Use of Electric Fields to Monitor the Dynamical Aspect of Cell Behavior in Tissue Culture," in *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. BME-33, no. 2, pp. 242-247, Feb. 1986, doi: 10.1109/TBME.1986.325896.
- [44] <http://www-groups.dcs.st-and.ac.uk/~history/Mathematicians/Heaviside.html>.
- [45] P.I. Dolin, B.V. Ershler, *Acta Physicochem. URSS* 13 (1940) 747.
- [46] J.E.B. Randles, *Discuss. Faraday Soc.* 1 (1947) 11.
- [47] http://www.philbrickarchive.org/1964-1_v12_no1_the_lightning_empiricist.htm
- [48] Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom.* 2015 Apr;20(2):107-26.
- [49] Georg Linz, Suzana Djeljadini, Lea Steinbeck, Gurbet Köse, Fabian Kiessling, Matthias Wessling, Cell barrier characterization in transwell inserts by electrical impedance spectroscopy, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 165, 2020, 112345, ISSN 0956-5663, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112345>.
- [50] Hermanns, M.I., Unger, R.E., Kehe, K., Peters, K., Kirkpatrick, C.J., 2004. Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. *Lab. Invest.* 84 (6), 736.

- [65] Raut, B.; Chen, L.-J.; Hori, T.; Kaji, H. An Open-Source Add-On EVOM® Device for Real-Time Transepithelial/Endothelial Electrical Resistance Measurements in Multiple Transwell Samples. *Micromachines* 2021, 12, 282. <https://doi.org/10.3390/mi12030282>
- [66] Schwan, H., 1966. Alternating current electrode polarization. *Biophysik* 3 (2), 181–201
- [67] I. O. K'Owino and O. A. Sadik, "Impedance spectroscopy: A powerful tool for rapid biomolecular screening and cell culture monitoring," *Electroanalysis*, vol. 17, pp. 2101–2113, 2005.
- [68] A. Rothermel et al., "Real-time measurement of PMA-induced cellular alterations by microelectrode array-based impedance spectroscopy," *Biotechniques*, vol. 41, pp. 445–450, Oct. 2006.
- [69] Y. B. Li and M. Varshney, "Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, pp. 2951–2960, Jun. 2009.
- [70] S. M. Radke and E. C. Alocilja, "A high density microelectrode array biosensor for detection of E. coli O157:H7," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, pp. 1662–1667, Feb. 2005.
- [71] S. Suresh, "Biomechanics and biophysics of cancer cells," *Acta Biomater.*, vol. 3, pp. 413–38, Jul. 2007.
- [72] M. Abercrombie and E. J. Ambrose, "The surface properties of cancer cells: A review," *Cancer Res.*, vol. 22, pp. 525–548, Jun. 1962.
- [73] Guofeng Qiao, Wei Wang, Wei Duan, Fan Zheng, Sinclair AJ, Chatwin CR. Bioimpedance analysis for the characterization of breast cancer cells in suspension. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2012 Aug;59(8):2321-9. doi: 10.1109/TBME.2012.2202904. Epub 2012 Jun 6. PMID: 22692870.
- [74] Zhao, Y., X. T. Zhao, J. Chen. 2014. Tumor cell characterization and classification based on cellular specific membrane capacitance and cytoplasm conductivity. *Biosens. Bioelectron.* 57:245–253.
- [75] Wenfeng Liang, Yuliang Zhao, Lianqing Liu, Yuechao Wang, Wen Jung Li, Gwo-Bin Lee, Determination of Cell Membrane Capacitance and Conductance via Optically Induced Electrokinetics, *Biophysical Journal*, Volume 113, Issue 7, 2017, Pages 1531-1539, ISSN 0006-3495, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.08.006>.
- [76] Zhou, T., Y. Ming, S. Tatic-Lucic. 2016. Estimation of the physical properties of neurons and glial cells using dielectrophoresis crossover frequency. *J. Biol. Phys.* 42:571–586.
- [77] El-Gaddar, A., M. Frenea-Robin, L. Kr€ahenb€uhl. 2013. Assessment of 0.5 T static field exposure effect on yeast and HEK cells using electrorotation. *Biophys. J.* 104:1805–1811.
- [78] Scrosati B, Garche J. Lithium batteries: status, prospects and future. *J Power Sources* 2010;195:2419-30.

- [79] Takami N, Inakagi H, Tatebayashi Y, Saruwatari H, Honda K, Egusa S. Highpower and long-life lithium-ion batteries using lithium titanium oxide anode for automotive and stationary power applications. *J Power Sources* 2013;244:469-75.
- [80] Jiuchun Jiang, Zhisong Lin, Qun Ju, Zeyu Ma, Caihui Zheng, Zhanguo Wang, Electrochemical Impedance Spectra for Lithium-ion Battery Ageing Considering the Rate of Discharge Ability, *Energy Procedia*, Volume 105, 2017, Pages 844-849, ISSN 1876-6102, <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.399>.
- [81] Zhang, Y., Tang, Q., Zhang, Y. et al. Identifying degradation patterns of lithium ion batteries from impedance spectroscopy using machine learning. *Nat Commun* 11, 1706 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15235-7>
- [82] Carolina Vinado, Shanyu Wang, Yang He, Xingcheng Xiao, Yun Li, Chongmin Wang, Jihui Yang, Electrochemical and interfacial behavior of all solid state batteries using Li10SnP2S12 solid electrolyte, *Journal of Power Sources*, Volume 396, 2018, Pages 824-830, ISSN 0378-7753, <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2018.06.038>.
- [83] Yu, C., Ganapathy, S., Eck, E.R.H. et al. Accessing the bottleneck in all-solid state batteries, lithium-ion transport over the solid-electrolyte-electrode interface. *Nat Commun* 8, 1086 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01187-y>
- [84] Edgar, B. A., N. Zielke, and C. Gutierrez. 2014. Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15:197–210.
- [85] Jiang, Y., X. Li, Z. Lu. 2014. PKM2 regulates chromosome segregation and mitosis progression of tumor cells. *Mol. Cell.* 53:75–87.
- [86] Reffay, M., M. C. Parrini, P. Silberzan. 2014. Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. *Nat. Cell Biol.* 16:217–223.
- [87] Shi, H., R. T. K. Kwok, B. Liu. 2012. Real-time monitoring of cell apoptosis and drug screening using fluorescent light-up probe with aggregation-induced emission characteristics. *J. Am. Chem. Soc.* 134:17972–17981
- [88] Trachootham, D., J. Alexandre, and P. Huang. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* 8:579–591
- [89] Liang W, Zhao Y, Liu L, Wang Y, Li WJ, Lee GB. Determination of Cell Membrane Capacitance and Conductance via Optically Induced Electrokinetics. *Biophys J.* 2017 Oct 3;113(7):1531-1539. doi: 10.1016/j.bpj.2017.08.006. PMID: 28978446; PMCID: PMC5627184.
- [90] https://openwetware.org/wiki/Body_on_a_Chip
- [91] <https://en.wikipedia.org/wiki/Organ-on-a-chip>
- [92] Esch, M.; Sung, J.; Yang, J.; et al. On Chip Porous Polymer Membranes for Integration of Gastrointestinal Tract Epithelium with Microfluidic ‘Body-on-a-Chip’ Devices. *Biomed. Microdevices.* 2012, 14, 895–906.
- [93] Griep, L. M.; Wolbers, F.; de Wagenaar, B.; et al. BBB on Chip: Microfluidic Platform to Mechanically and Biochemically Modulate Blood-Brain Barrier Function. *Biomed. Microdevices.* 2013, 15, 145–150.

- [94] <https://www.ptglab.com/products/featured-products/cell-polarity-markers/>, Proteintech Group, Inc
- [95] Zucco, F.; Batto, A. F.; Bises, G.; et al. An Inter-Laboratory Study to Evaluate the Effects of Medium Composition on the Differentiation and Barrier Function of Caco-2 Cell Lines. *Atla- Altern. Lab. Anim.* 2005, 33, 603–618.
- [96] Ryan, U. S. *Endothelial Cells*; Taylor & Francis: New York, 1988.
- [97] Schwab, M. *Encyclopedia of Cancer*; 3rd ed.; Springer: Heidelberg, 2011
- [98] Matter, K.; Balda, M. S. Functional Analysis of Tight Junctions. *Methods.* 2003, 30, 228–234.
- [99] Groeber, F., Engelhardt, L., Egger, S., Werthmann, H., Monaghan, M., Walles, H., Hansmann, J., 2015. Impedance spectroscopy for the non-destructive evaluation of in vitro epidermal models. *Pharm. Res.* 32 (5), 1845–1854.
- [100] Kotnik, T., Miklavčič, D., 2000. Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells. *Biophys. J.* 79 (2), 670–679.
- [101] Cole, K.S., 1968. *Membranes, Ions and Impulses*. Cal. University of California Press.
- [102] Lo, C.-M., Keese, C.R., Giaever, I., 1995. Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing. *Biophys. J.* 69 (6), 2800–2807.
- [103] Van Driessche, W., De Vos, R., Jans, D., Simaels, J., De Smet, P., Raskin, G., 1999. Transepithelial capacitance decrease reveals closure of lateral interspace in A6 epithelia. *Pflügers Arch.* 437 (5), 680–690.
- [104] Benson, K.; Cramer, S.; Galla, H. J. Impedance-Based Cell Monitoring: Barrier Properties and Beyond. *Fluids Barriers CNS.* 2013, 10, 5.
- [105] Liang, X., K. A. Graham, ., F. H. Labeed. 2014. Human oral cancer cells with increasing tumorigenic abilities exhibit higher effective membrane capacitance. *Integr. Biol.* 6:545–554.
- [106] EndOhm Chamber. <http://www.wpi-europe.com/products/celland-tissue/teer-measurement/endohm-24snap.aspx> (accessed Nov 13, 2014).
- [107] Narai, A., Arai, S., Shimizu, M., 1997. Rapid decrease in transepithelial electrical resistance of human intestinal Caco-2 cell monolayers by cytotoxic membrane perturbants. *Toxicol. Vitro* 11 (4), 347–354.
- [108] Lohren, H., Bornhorst, J., Fitkau, R., Pohl, G., Galla, H.-J., Schwerdtle, T., 2016. Effects on and transfer across the blood-brain barrier in-vitro comparison of organic and inorganic mercury species. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 17 (1), 63.
- [109] Margo, C., 2013. A four-electrode low frequency impedance spectroscopy measurement system using the AD5933 measurement chip. *Physiol. Meas.* 34, 391–405. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/34/4/391>.
- [110] van der Helm M.W., Odijk M, Frimat JP, van der Meer AD, Eijkel JCT, van den Berg A, Segerink LI. Direct quantification of transendothelial electrical resistance in organs-on-chips. *Biosens Bioelectron.* 2016 Nov 15;85:924-929. doi: 10.1016/j.bios.2016.06.014. Epub 2016 Jun 8. PMID: 27315517.

- [111] Odijk, M., van der Meer, A.D., Levner, D., Kim, H.J., van der Helm, M.W., Segerink, L. I., Frimat, J.-P., Hamilton, G.A., Ingber, D.E., van den Berg, A., 2015. Measuring direct current trans-epithelial electrical resistance in organ-on-a-chip microsystems. *Lab Chip* 15 (3), 745–752.
- [112] Gerasimenko, Tatiana et al. “Impedance Spectroscopy as a Tool for Monitoring Performance in 3D Models of Epithelial Tissues.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7 (2019).
- [113] Franks W., Schenker I., Schmutz P., Hierlemann A. (2005). Impedance characterization and modeling of electrodes for biomedical applications. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 52, 1295–1302. 10.1109/TBME.2005.847523
- [114] Alexander F. J., Eggert S., Price D. (2019). Label-free monitoring of 3D tissue models via electrical impedance spectroscopy. *Biorev.* 2, 111–134. 10.1007/11663_2018_5
- [115] Decker D., Hempelmann R., Natter H., Pirrung M., Rabe H., Schäfer K. H., et al. (2018). 3D nanostructured multielectrode arrays: fabrication, electrochemical characterization, and evaluation of cell – electrode. *Adhesion.* 1800436, 1–10. 10.1002/admt.201800436
- [116] Huigen E., Peper A., Grimbergen C. A. (2002). Investigation into the origin of the noise of surface electrodes. *Med. Biol. Eng. Comput.* 40, 332–338. 10.1007/BF02344216
- [117] Blume, L. F.; Denker, M.; Gieseler, F.; et al. Temperature Corrected Transepithelial Electrical Resistance (TEER) Measurement to Quantify Rapid Changes in Paracellular Permeability. *Pharmazie.* 2010, 65, 19–24.
- [118] <https://www.gaussianwaves.com/2010/11/moving-average-filter-ma-filter-2/>
- [119] <https://statisticsbyjim.com/regression/r-squared-invalid-nonlinear-regression/>

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1:
ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΟ ΧΡΗΣΤΗ**

UNIWA spectrum measurement device & interface—USER MANUAL

MEASUREMENT DEVICE SPECIFICATIONS

- Bandwidth: 10-10000Hz for $|Z|$, 10-1000Hz for phase.
- Measurement Range: 10 Ω -50K Ω
- Time required for each full sweep: ~7s max.
- Sweep interval: 60s - 1 Day
- Available spectroscopy waveforms: sinusoid, triangle wave, square wave. Note: phase detection only available for sinusoid & triangle waveforms.
- Galvanostatic, 4-point mode. Current amplitude: ~ 10 μ A. (33K Ω precision resistor across P1)
- Confirmed working temperature range: 10 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C.
- Power consumption during use: ~80mA.
- No DC voltage applied to sample.
- Input voltage(PSU or battery***): 3.5 – 5.5V

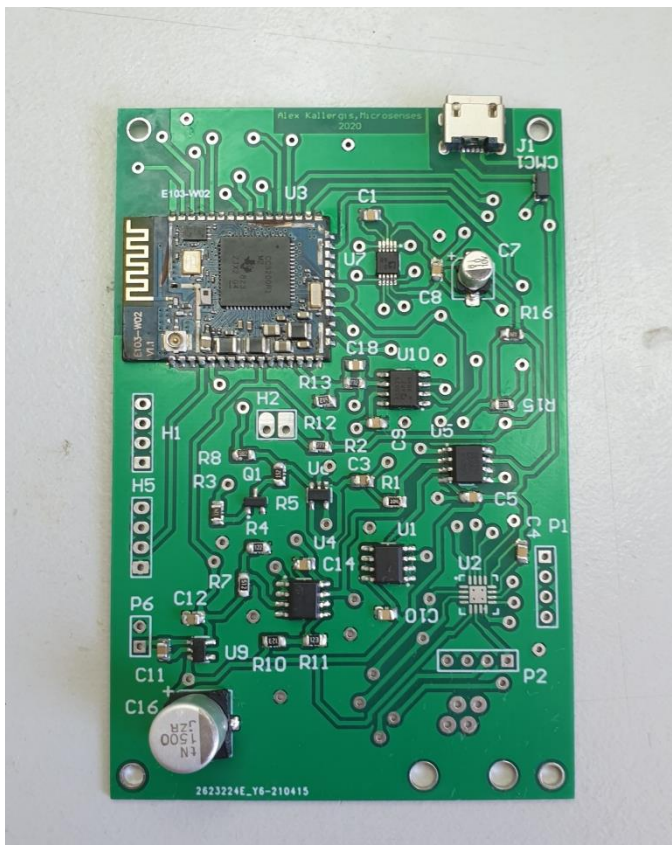


Figure 1. Measurement board prototype. P2 is the EIS header for I/O.

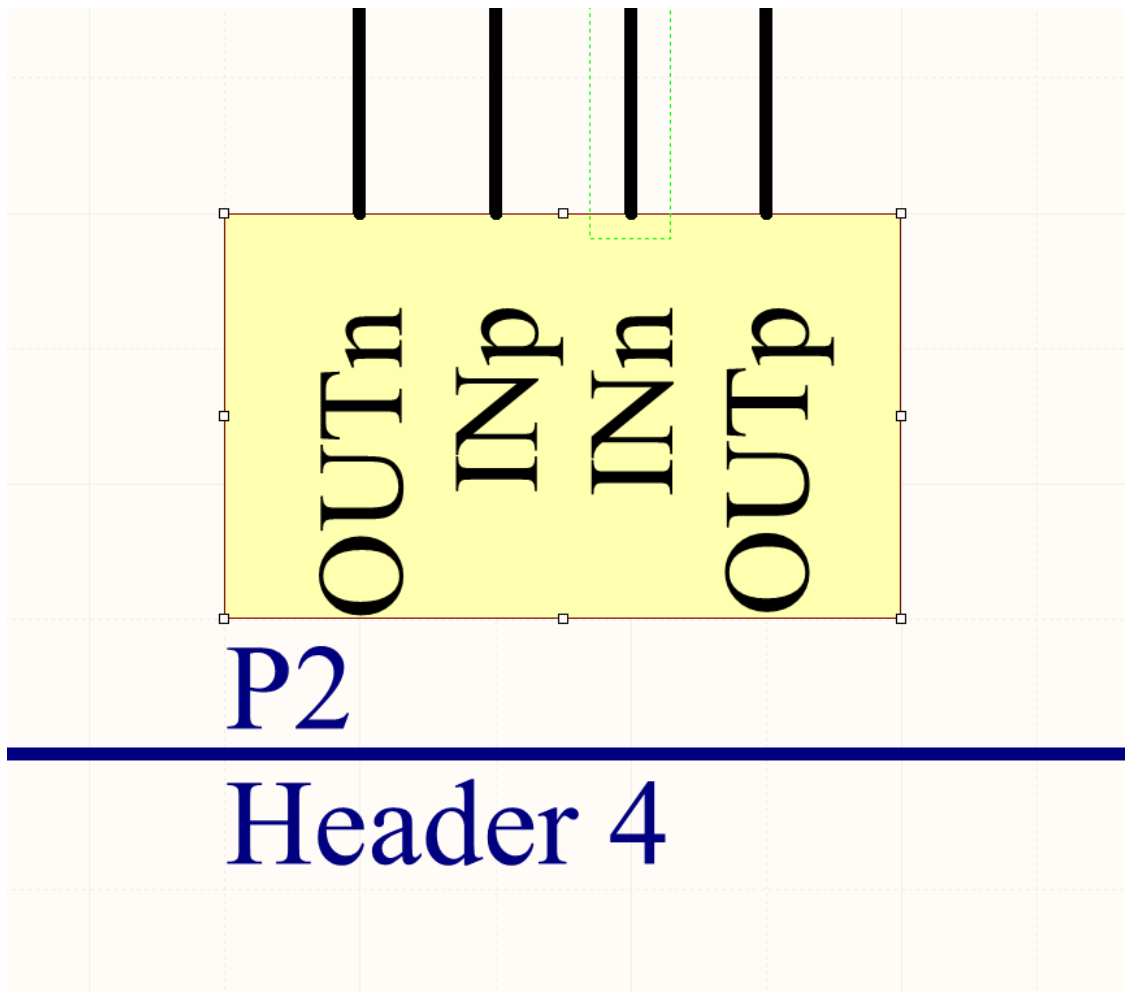


Figure 2. EIS header(P2) pinout and polarity. n=negative p=positive.

ANDROID APP SPECIFICATION & INSTALLATION

- The application is compatible with android versions from 4.4 up to android 10.
- Install UNIWA SPECTRUM MEASUREMENT APK.
- Open the client android application(UNIWA SPECTRUM MEASUREMENT)
- Accept permissions.
- Exit app by pressing STOP & RETRIEVE DATA button. This ensures the app doesn't run in the background.*
- Depending on client device, user may need to disable "battery optimization" and "put unused apps to sleep" options for the app.**

TAKING MEASUREMENTS

- 1) Make sure appropriate resistor is in place across P1. Connect the measurement device(/board) to the EIS fluidic setup.
- 2) Plug the measurement device into a micro-usb power supply or appropriate battery.***
- 3) Open the client android application. Ensure no other client device running the app has connected to the board. The board only supports 1 client. User can edit the sweep options any time before measurements have started.

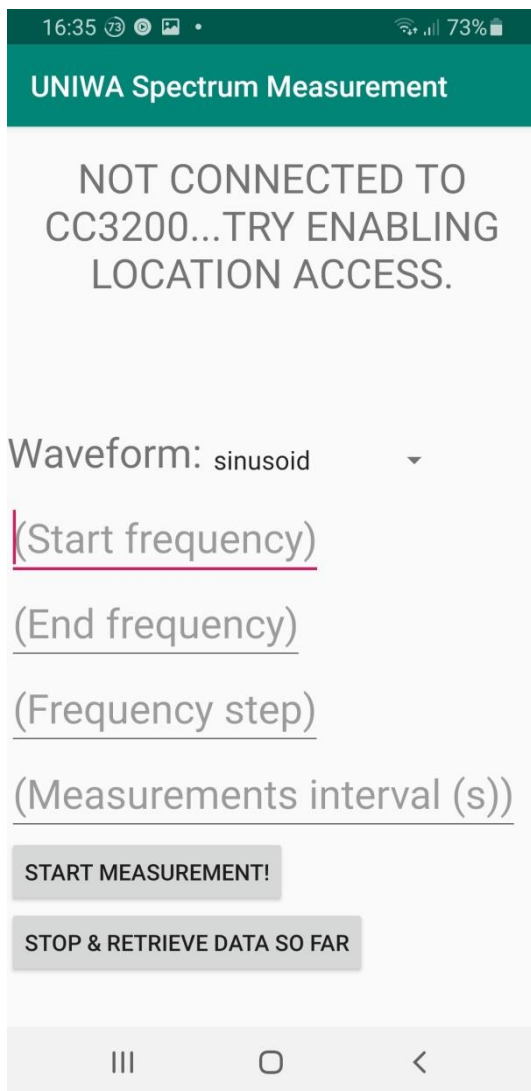


Figure 3. ANDROID app initial screen. Note: program shown here is in beta version.

- 4) Wait for client to automatically connect to the board. Select “spectrumAp” if prompted. Newer android versions require WIFI and Location access enabled by user.****
- 5) Once connected, the user will be notified in the top section. Press START MEASUREMENT to start the sweeps at desired settings. The client device may be locked and left to do the measurements. Using the client device for other tasks while measuring is discouraged, as this could lead to the app being killed by the system.

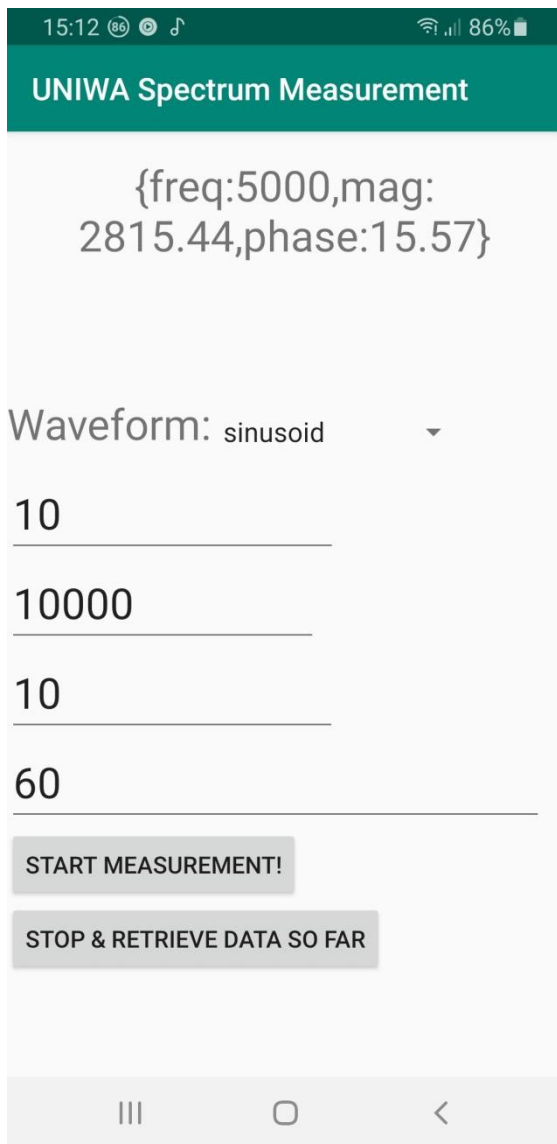


Figure 4. User is notified about the response during the sweep response transfer. Raw JSON messages are received. |Z| is in ohm, and phase in degrees.

6) To stop the measurements and exit the application user must press the STOP & RETRIEVE DATA button*. The .csv file name is displayed to the user. Files are stored in internal_storage/SpectrumMeasurements.

7)Remove the board from power.

8) Store board in a dry place. At least 24 Hours or more prior to next measurement, leave the fluidic device electrodes in equilibration by inserting the appropriate short-circuiting plug to P2 and immersing the electrodes in an electrolytic solution, such as PBS. If urgent measurements need to be taken without equilibration, half an hour seems sufficient.

TROUBLESHOOTING

- No power in measurement device.
 - A: Not all USB PSUs supply the 100mA without enumeration as per the USB specification. Please try another charger or port for supplying power, or use batteries.
 - See [here](#) for explanation.
- Measurement Files are visible in client device but not when transferred elsewhere.
 - A: There may be some problems when a PC tries to access the /SpectrumMeasurements folder directly. In that case:
 1. Kindly use the client device to copy the measurements folder to another client device folder, like download folder , and then
 2. Access them from the PC.
- Can't install app
 - A: Uninstall possible old app from client device. For the installation, user may need to enable "unknown sources".
- Can't connect to measurement device.
 - A: Please make sure there are no other clients connected to the measurement device.
 - Re-install android App if necessary.

NOTES

- *Exiting the app without pressing the STOP & RETRIEVE DATA button will result in the app running in the background, staying connected to the board, however it may be killed by the system. Preferably, kindly leave the app running in the foreground.
- **Apps that run on the background or while android device is locked, may be killed. The settings appropriate for each device can be found on websites such as <https://dontkillmyapp.com/>
Also, it is mandatory to disable "don't keep activities" dialog in developer options if user has enabled it.
- The frequency sweep itself takes ~7s. The 1 min minimum interval is a failsafe, due to some android phones that may crash during fast WIFI data transfer.
- ***Appropriate batteries are in the range of 3.5 – 5.5 V.
- ****Enabling Location access and the corresponding permission are required in newer android SDKs in order for device to be able to scan for the board. This happens because Google decided scanning for nearby wifi networks can reveal the user's location to the app.