

Introduzione

In questo elaborato, è stato analizzato il principio di funzionamento di un biosensore ottico basato sulla glucosio ossidasi, con l'obiettivo di permettere la rivelazione della concentrazione di glucosio dal film lacrimale, che è stato pensato come un potenziale surrogato del sangue. Successivamente è stata poi considerata la possibilità di integrare il sistema sensibile al glucosio, all'interno di una matrice sol-gel con il compito di simulare le caratteristiche e il comportamento di una lente a contatto, sfruttando il fatto che durante tutto il periodo di porto, si trova costantemente immersa nel film lacrimale, che la circonda sia nella sua parte anteriore che posteriore. L'obiettivo è quindi quello di provare a esplorare un metodo alternativo per il monitoraggio della glicemia e che soprattutto garantisca un monitoraggio continuo e non invasivo rispetto ai metodi classici tradizionali. Il monitoraggio del glucosio si configura come una procedura di primaria importanza per la corretta gestione delle disfunzioni metaboliche legate alle costanti variazioni della sua concentrazione nel sangue, parametro fondamentale per il corretto funzionamento di tutto l'organismo. La condizione patologica caratterizzata da tali alterazioni prende il nome di diabete mellito. Attualmente, a causa del crescente impatto epidemiologico e alle conseguenze associate a tale condizione, dal punto di vista clinico, il diabete si configura come una vera e propria sfida sanitaria a livello globale. L'esposizione cronica a elevati livelli di glucosio, condizione nota come iperglicemia, può portare nel tempo ad importanti complicanze a carico di numerosi distretti corporei, partendo dai danni microvascolari fino al coinvolgimento di diversi organi. L'occhio appare come una delle sedi maggiormente colpite da questi possibili danni, motivo per il quale il monitoraggio glicemico risulta di particolare interesse anche nell'ambito optometrico. In particolare nella retinopatia diabetica, una microangiopatia che va a colpire e a danneggiare i capillari retinici, con conseguente compromissione e perdita di funzionalità del tessuto, che porta a perdita della vista irreversibile. Inoltre le alterazioni biochimiche del glucosio possono influenzare l'equilibrio osmotico dei tessuti oculari impattando forma, trasparenza e caratteristiche ottiche, è ben nota l'associazione tra il diabete e l'aumento di probabilità di sviluppare una cataratta in età giovanile, oltre al fatto che si potrebbero avere variazioni refrattive transitorie, che rendono dal punto di vista optometrico più difficile effettuare la misurazione. Oggi, la ricerca scientifica mira a sviluppare nuove metodologie di rivelazione che siano sempre meno invasive e che soprattutto garantiscano una valutazione continua del parametro in questione. Di conseguenza, per garantire la lettura, si pensa anche all'utilizzo di fluidi corporei alternativi

al sangue, ma altrettanto validi. In questo studio si è pensato di utilizzare il film lacrimale, le lacrime potrebbero prestarsi a tale rivelazione, al loro interno è contenuto anche il glucosio che arriva attraverso meccanismi di diffusione capillare e studi hanno dimostrato una correlazione tra la concentrazione di glucosio ematica e quella nel film lacrimale stesso, seppure quest'ultima sia inferiore.

È stato utilizzato come elemento di riconoscimento l'enzima glucosio ossidasi. L'interazione tra l'enzima e il glucosio dà luogo a una reazione di ossidoriduzione, che interessa il proprio cofattore FAD (flavin adenin dinucleotide), determinando variazioni nelle proprietà ottiche della molecola, in particolare nell'assorbimento e nella fluorescenza. La conversione di questo evento chimico in un segnale fisico misurabile, più precisamente ottico, è stata impiegata per consentire la rivelazione e la quantificazione della concentrazione di glucosio con cui il sistema ha interagito. In primo luogo, si sono andate ad osservare le proprietà spettroscopiche dell'enzima in soluzione, osservando lo spettro di assorbimento e registrandone le modificazioni indotte dalla presenza di concentrazioni crescenti di glucosio. Successivamente le stesse caratteristiche sono state analizzate nel caso in cui si prova ad immobilizzare l'enzima all'interno della matrice di sol-gel, il cui compito è quello di simulare la lente a contatto flessibile, dispositivo già ampiamente utilizzato in campo optometrico.

Materiali e metodi

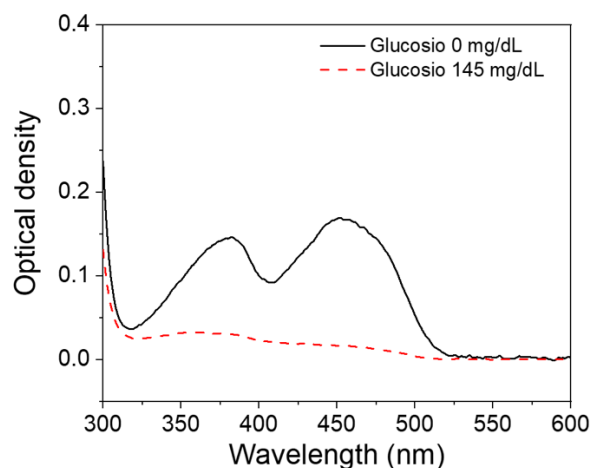
Come sistema di riconoscimento selettivo del glucosio è stata utilizzata la glucosio ossidasi (GOD) da *Aspergillus niger*, scelta per la sua elevata specificità e selettività nei confronti del β -D-glucosio. Sono stati utilizzati inoltre β -D-glucosio come substrato e tampone PBS (pH 7,4) per garantire condizioni fisiologiche controllate nelle soluzioni realizzate. Le misurazioni sono state effettuate mediante uno spettrofotometro UV/Vis, nell'intervallo 270–900 nm, comprendente le lunghezze d'onda caratteristiche dell'enzima. L'enzima catalizza l'ossidazione del glucosio ad acido gluconico, con la contemporanea riduzione dell'ossigeno molecolare a perossido di idrogeno. Dal punto di vista strutturale, si tratta di una flavoproteina, che contiene nel proprio sito attivo un cofattore flavinico chiamato FAD (flavina adenina dinucleotide). Il FAD è un cofattore redox, gioca un ruolo fondamentale nel meccanismo catalitico, ed è responsabile delle proprietà ottiche dell'enzim. Il FAD può esistere in due stati: forma ossidata (FAD) e forma ridotta (FADH₂). È proprio il passaggio tra queste due forme che

permette all'enzima di catalizzare la reazione. Durante l'interazione tra il glucosio e la glucosio ossidasi, il substrato viene ossidato, convertito in D-glucono- δ -lattone, e successivamente in ambiente acquoso in acido gluconico. Gli elettroni ceduti dal glucosio vengono accettati dal FAD, che si riduce passando da FAD a FADH₂. Successivamente il FADH₂ viene riossidato dall'ossigeno molecolare, che accetta gli elettroni formando perossido di idrogeno (H₂O₂). In questo modo il FAD ritorna nella sua forma iniziale e l'enzima può ripetere nuovamente il ciclo catalitico.

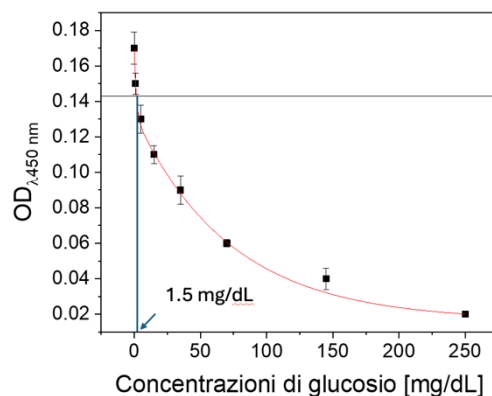
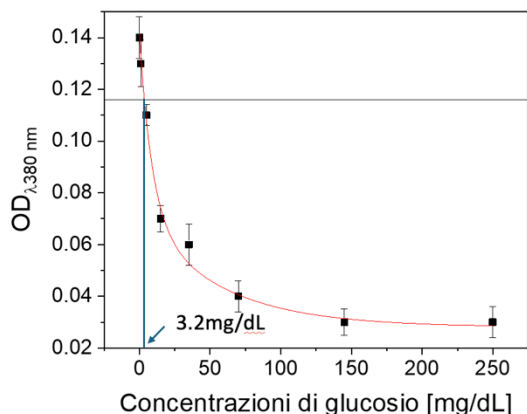
È stata inizialmente preparata una soluzione di glucosio ossidasi (GOD) con concentrazione pari a 1 mg/mL, sciogliendo l'enzima in tampone fosfato salino (PBS). Successivamente è stata ottenuta una soluzione madre di glucosio, dalla quale sono state ricavate soluzioni a concentrazione variabile mediante diluizioni seriali, nell'intervallo compreso tra 1 e 250 mg/dL, utilizzate per la costruzione della curva di calibrazione. Le misure sono state eseguite in duplicato e successivamente mediate per ridurre l'errore sperimentale. I risultati ottenuti con l'enzima in soluzione hanno evidenziato una chiara dipendenza tra concentrazione di glucosio e variazione dell'assorbimento nei picchi caratteristici, dovuti al cofattore FAD, permettendo la costruzione delle curve di calibrazione e la determinazione del limite di rivelazione del sistema. Poiché l'enzima in soluzione non è compatibile con applicazioni indossabili, il lavoro si è concentrato sull'immobilizzazione della glucosio ossidasi in una matrice solida. A tal fine è stato utilizzato il metodo sol-gel, che consente di ottenere matrici trasparenti e porose in grado di intrappolare l'enzima mantenendone l'attività. La matrice sol-gel permette la diffusione del glucosio e dell'ossigeno, necessari per la reazione enzimatica, garantendo al contempo il confinamento dell'enzima e la stabilità del sistema. Dal punto di vista ottico, la sua elevata trasparenza la rende idonea per applicazioni spettrofotometriche. L'immobilizzazione della glucosio ossidasi è avvenuta per intrappolamento fisico all'interno della matrice sol-gel, ottenuta in seguito a reazioni di idrolisi e condensazione partendo da opportuni precursori della silice, evitando la formazione di legami chimici diretti e preservando le proprietà ottiche dell'enzima. L'obiettivo è stato verificare se le variazioni di assorbimento osservate in soluzione fossero mantenute anche nel sistema immobilizzato, in vista dell'applicazione in una lente a contatto sensorizzata.

Presentazione dei risultati

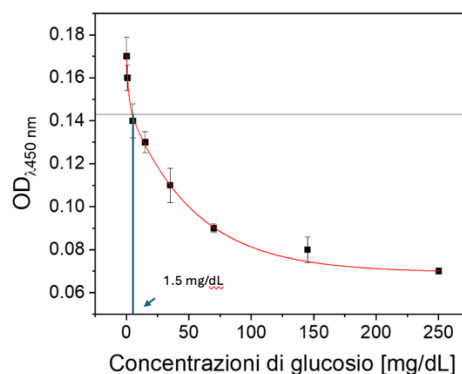
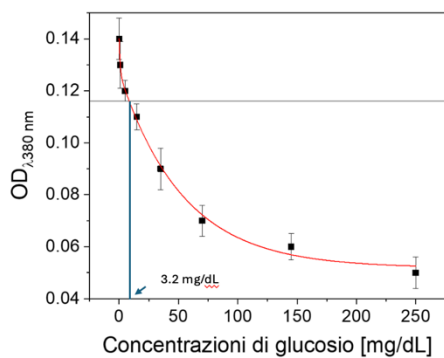
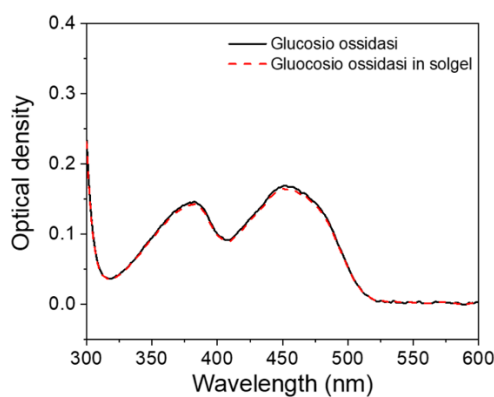
L'analisi spettrofotometrica della glucosio ossidasi in soluzione libera ha permesso di evidenziare il comportamento ottico caratteristico dell'enzima, in particolare la presenza dei picchi di assorbimento nella regione del visibile associati al cofattore FAD, a 380nm e a 450nm. I risultati sperimentali hanno mostrato come tali proprietà ottiche risultino influenzate dalla concentrazione di glucosio presente nel campione. In particolare, all'aumentare della concentrazione di glucosio si osserva una progressiva diminuzione dell'intensità dei picchi di assorbimento, coerente con il meccanismo di riduzione del cofattore durante la reazione enzimatica. Questo visivamente è accompagnato dal cambio di colorazione dell'enzima, che passa dal giallo, quando non c'è glucosio, all'incolore non appena interagisce con quest'ultimo. Questo comportamento è evidenziato nel grafico di confronto tra lo spettro della sola glucosio ossidasi e quello ottenuto in presenza di glucosio, in cui si osserva una riduzione significativa dell'assorbanza alle lunghezze d'onda caratteristiche.



Sulla base dei dati ottenuti sono state costruite le curve di calibrazione, mettendo in relazione l'assorbanza con la concentrazione di glucosio, per entrambi i picchi di assorbimento. Tali curve rappresentano uno strumento fondamentale per la quantificazione dell'analita e hanno permesso di determinare il **limite di rivelazione (LOD)** del sistema, parametro che indica la minima concentrazione di glucosio rivelabile dal biosensore.



Successivamente, le stesse caratteristiche sono state analizzate nel caso di glucosio ossidasi immobilizzata all'interno della matrice sol-gel. I risultati hanno evidenziato che il comportamento spettrofotometrico dell'enzima viene mantenuto anche nella forma immobilizzata. In particolare, gli spettri di assorbimento ottenuti risultano sovrapponibili a quelli osservati per l'enzima in soluzione libera, indicando che l'immobilizzazione non altera in modo significativo le proprietà ottiche del sistema. Comportamento analogo anche per il limite di rivelazione ottenuto, che risulta essere invariato rispetto al caso precedente.



Nel complesso, i risultati dimostrano che le variazioni di assorbimento della glucosio ossidasi sono strettamente dipendenti dalla concentrazione di glucosio e che tali proprietà risultano conservate anche nel sistema immobilizzato. L'integrazione del sistema nella sola regione periferica di una lente a contatto consentirebbe di preservare la qualità visiva, evitando interferenze con l'asse ottico centrale, e di sfruttare il contatto continuo con il film lacrimale per il monitoraggio del glucosio in modo non invasivo. Sebbene ulteriori studi siano necessari per ottimizzare la stabilità meccanica e l'attività enzimatica nel lungo periodo, i risultati preliminari ottenuti indicano che la matrice sol-gel rappresenta un valido modello per la simulazione di una lente a contatto sensorizzata, aprendo la strada allo sviluppo di dispositivi innovativi per il monitoraggio continuo del glucosio in ambito ottico e optometrico. Quello che emerge infine tra i risultati ottenuti nei due sistemi, permette di ricavare un'informazione molto importante. Le pendenze delle curve di calibrazione ottenute per entrambi i picchi di assorbimento sono leggermente diverse, per il tratto iniziale, dove l'andamento può essere considerato approssimativamente lineare, è possibile in questa regione andare a definire la sensibilità per il dispositivo, che risulta quindi nel secondo caso essere leggermente inferiore, a causa del tempo di diffusione del glucosio e dell'ossigeno nella matrice sol-gel, prima interagire con l'enzima. Questo permette di dimostrare, che per il sistema immobilizzato sarebbe possibile modulare le prestazioni del sensore, agendo su alcuni parametri, come la concentrazione dell'enzima immobilizzato nella regione periferica di questa ipotetica lente a contatto, oppure sulla porosità del gel, permettendo di definire una soglia di risposta per il dispositivo, rendendo possibile per l'utilizzatore un primo controllo immediato basato sulla variazione di colore dell'enzima osservando il cambiamento visivo nella lente, quando la concentrazione di glucosio supera la soglia di allarme. Da tenere in considerazione è che per il caso analizzato, in cui si è valutato il solo principio di funzionamento, per avere il valore esatto si dovrebbe togliere la lente e misurarlo, in prospettiva di una possibile applicazione si dovrebbe pensare quindi a un sistema che consenta di farlo magari integrabile nella stessa lente e che non sia troppo invasivo per l'occhio.

Conclusioni

Nel presente lavoro si è voluto analizzare il principio di funzionamento di un dispositivo basato sulla glucosio ossidasi per la rivelazione della concentrazione di glucosio nel sangue attraverso il film lacrimale, servendosi della diretta correlazione esistente tra i due fluidi biologici. I risultati ricavati mediante l'analisi spettrofotometrica della glucosio ossidasi hanno dimostrato la dipendenza delle variazioni ottiche negli spettri di assorbimento del cofattore FAD in seguito all'interazione con il glucosio e in funzione della sua concentrazione. L'attenuazione dei picchi di assorbimento nella regione del visibile, attraverso la valutazione del comportamento dell'enzima in soluzioni a concentrazioni crescenti di glucosio, ha permesso di ricavare le curve di calibrazione e la determinazione del limite di rivelazione (LOD), mostrando la relazione tra il segnale misurato e la quantità dell'analita. In particolare, il picco a 450 nm ha dimostrato una affidabilità maggiore, essendo in grado di dare letture affidabili partendo da concentrazioni pari a 1,5 mg/dL. Questo risultato è utile nel caso di una possibile applicazione, su campioni a concentrazione inizialmente sconosciuta, come il film lacrimale stesso, per permettere la rivelazione, il LOD ottenuto rientra nell'intervallo possibile di concentrazione di glucosio che si potrebbe avere nel film lacrimale. A tale scopo, l'enzima è stato successivamente immobilizzato all'interno di una matrice sol-gel il cui compito è quello di simulare il comportamento della lente a contatto. Anche per la forma immobilizzata, i risultati ottenuti hanno dimostrato che il sistema non influenza le caratteristiche dell'enzima che restano quindi conservate. In conclusione si potrebbe affermare che il sistema proposto, presenti quindi le caratteristiche di un possibile biosensore ottico, in cui la glucosio ossidasi costituisce l'elemento di riconoscimento specifico per l'analita (il glucosio, in particolare nella sua forma β -D-glucosio) e la variazione dell'assorbimento legata allo stato redox del FAD rappresenta l'elemento di trasduzione del segnale chimico in un segnale ottico registrabile in cui la lettura è stata ricavata mediante l'analisi allo spettrofotometro. In ambito ottico e optometrico, l'interesse consiste nella possibile integrazione di tale sistema all'interno di una lente a contatto, in cui la collocazione dovrebbe limitarsi lungo la sola regione periferica. Questo consentirebbe di preservare l'asse visivo centrale e la qualità della visione oltre a garantire la trasparenza. La lente a contatto è già un dispositivo ampiamente utilizzato, essendo durante il periodo di porto, costantemente immersa nel film lacrimale che la circonda sia nella sua parte anteriore che posteriore potrebbe evolversi da dispositivo correttivo ed essere in grado di monitorare anche la concentrazione del glucosio in modo non invasivo. Naturalmente la

fattibilità di un'ipotetica realizzazione dovrebbe poi essere valutata nel tempo e nelle reali condizioni fisiologiche. Anche se il principio analizzato potrebbe essere teoricamente possibile e impiegato per la rivelazione in modo rapido anche di qualsiasi altro marcatore indicatore di patologia oculare.