Metode mjerenja koncentracije glukoze u krvi

Janić, Klaudija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:060238

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Klaudija Janić

Metode mjerenja glukoze u krvi

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Osijek, 2019.

SAŽETAK

Dijabetes je neizlječivi metabolički poremećaj. Razvija se zbog nedostatka inzulina u tijelu, neosjetljivost organizma na inzulin ili oboje. Uzrokuje povišene razine glukoze u krvi što se naziva hiperglikemija ili smanjene koncentracije glukoze koje znamo pod nazivom hipoglikemija. Cilj ovog rada je sažeto i organizirano opisati različite neinvazivne, minimalno invazivne i neinvazivne metode mjerenja razine glukoze u krvi sa njihovim prednostima i nedostacima. Kako bi se razvio pouzdan uređaj za kontinuirano praćenje glukoze u krvi koji je prenosiv, nenametljiv i lak za nošenje na koži, utrošeni su veliki napori u razna znanstvena istraživanja. Trenutno je veliki broj metoda već otkriven i opisan, ali samo ih se nekoliko koristi i u praksi.

Ključne riječi: dijabetes, praćenje glukoze u krvi, metode mjerenja glukoze

ABSTRACT

Diabetes mellitus is an incurable metabolic disorder that results in the human body due to insulin deficiency, insulin resistance or both. It causes elevated blood glucose levels called hyperglycemia or decreased glucose levels known as hypoglycemia. The aim of this study is to describe concise and organised information about different techniques of non-invasive, minimally invasive and invasive continuous blood glucose monitoring with its advantages and limitations. Many research groups have been working to develop wearable sensors for continuous blood glucose monitoring that may become predictable, selective, reliable and acceptable for patient use. In the present, many methods are already discovered and described, but only few are used in practice.

Keywords: diabetes mellitus, blood glucose measurement, glucose monitoring

Sadržaj:

1. Uvod 1

2. Praćenje razine glukoze u krvi 2

3. Neinvazivne metode 4

3.1. Optičke metode 4

3.1.1. Bliska infracrvena spektroskopija 4

3.1.2. Srednja infracrvena spektroskopija 5

3.1.3. Daleka infracrvena spektroskopija/ Spektroskopija termalne emisije 6

3.1.4. Fotoakustična (PA) spektroskopija 7

3.1.5. Okluzijska spektroskopija 8

3.1.6. Fluorescentne tehnike 9

3.1.7. Kromoskopija 10

3.1.8. Ramanova spektroskopija 10

3.2. Transdermalne metode 11

3.2.1. Bioimpedancijska spektroskopija 11

3.2.2. Sonoforeza 12

3.2.3. Obrnuta iontoforeza 13

4. Minimalno invazivne 14

4.1. Mikropore/Mikroigle 14

5. Invazivne metode 16

5.1. Bockanje prsta 16

6. Zaključak 17

7. Literatura 19

1. Uvod

Diabetes mellitus je neizlječiva bolest. Rezultat je nedostatka inzulina u organizmu. Uzrokuje povišene razine glukoze u krvi što se naziva hiperglikemija ili smanjene koncentracije glukoze koje znamo pod nazivom hipoglikemija [1,2,3].

Inzulin je hormon koji se sintetizira i izlučuje iz gušterače kako bi posredovao u metaboličkim reakcijama koje uključuju glukozu. Time, stanice u tijelu, započinju korištenje glukoze što smanjuje koncentracije glukoze u krvi [4].

Dijabetes se povezuje s mnogim zdravstvenim stanjima uključujući cističnu fibrozu, tuberkulozu i bolesti srca. Razne komplikacije mogu rezultirati retinopatijom koja vodi do sljepoće, nefropatijom koja može dovesti do otkazivanja bubrega, oštećenje perifernih živaca sa porastom rizika od ulkusa ekstremiteta, amputacija, kardiovaskularnih bolesti ili čak raka [4].

Dijabetes se opisuje kao „tiha epidemija“ te od njegovog otkrića mnogi su napori uloženi u postizanje učinkovite dijagnoze, praćenja i terapije. Mnoštvo biosenzora je razvijeno i istraženo kako bi se omogućilo što bolje prikupljanje dijagnostičkih podataka o bolesnikovu zdravstvenom statusu. Neki od njih su enzimski i neenzimski elektrokemijski pristupi za detekciju glukoze, spektroskopske metode za neinvazivnu detekciju glukoze (Ramanova i IR najčešće) i tako dalje, no pravi izazov ostaje izrada senzora za svakodnevnu uporabu pacijenata u osobnom praćenju bolesti [1].

2. Praćenje razine glukoze u krvi

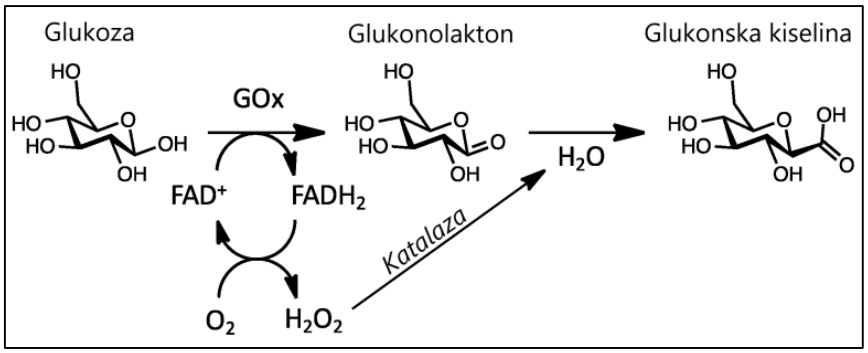
Kako za dijabetes nije pronađena preventivna terapija ni lijek, kontroliranje uvjeta ove bolesti je za sada najuspješniji način njezina održavanja. Nadziranje razina glukoze u krvi, kao markera za ovu bolest, dokazalo se kao dobar način produženja životnog vijeka omogućavajući dijabetičarima uspješno svladavanje epizoda hipoglikemije i hiperglikemije. Spomenutim se postiže bolja kontrola njihovog stanja i sprječavanje nekih iscrpljujućih nuspojava. Dodatno, nadziranje razine glukoze može se koristiti kako bi se optimizirale pacijentove terapijske strategije te pružio uvid u efekte lijekova, vježbi i dijete na pacijenta [5].

Premda je krv zlatni standard kao medij iz kojega se mjeri razina glukoze, mjerenja iz tog medija su invazivna. Koncentracije glukoze u krvi obično se nalaze u rasponu 4.9-6.9 mM kod zdravih pacijenata, a kod dijabetičara se može popeti i do 40 mM nakon unosa glukoze [1]. Clark i Lyon (1967) iz Dječje bolnice u Cincinnatiju predložili su prvu generaciju glukoznih biosenzora. Prvobitno su osnovani na elektrokemijskom pristupu koji je koristio enzim glukoza oksidaza (GOx) [13].

Elektrokemijski senzori su bili izabrani za mjerenja glukoze u krvi zbog svoje visoke osjetljivosti, od reda μM do mM, reproducibilnosti i jednostavnosti izrade po relativno niskoj cijeni [6].

GOx je korišten kao enzimska osnova za senzor zbog svoje visoke selektivnosti za glukozu. Manje uobičajeni enzimi kao što su heksokinaza i glukoza-1-dehidrogenaza su također bili korišteni u mjerenjima glukoze, no GOx može tolerirati ekstremne promijene u pH, temperaturi te ionskoj snazi u usporedbi sa drugim enzimima. Izdržavanje takvih uvieta može biti vrlo važno pri proizvodnji, čineći ga tako primarnim kandidatom za uređaje za mjerenje razine glukoze [1].

GOx katalizira oksidaciju β-D-glukoze u D-glukono-δ-lakton i H_2O_2 uz molekulu kisika kao akceptor elektrona. Ta se reakcija odvija u dva stupnja. U prvom, reduktivnom dijelu reakcije, GOx katalizira oksidaciju β-D-glukoze u D-glukono-δ-lakton koji se neenzimski hidrolizira u glukonsku kiselinu. Slijedom toga se FAD reducira u $FADH_2$. U drugom stupnju, koji se smatra oksidacijskim dijelom reakcije, reducirani GOx se reoksidira molekulskim kisikom uz nastajanje H_2O_2 , a regenerira se FAD^+ kofaktor. U toj reakciji količina potrošenog O_2, odnosno nastalog H_2O_2 proporcionalna je koncentraciji glukoze [7].



Slika 1. Pretvoba glukoze u glukonsku kiselinu uz enzim glukoza oksidazu (GOx).Izvor: [1]

Prvi komercijalno uspješan biosenzor za mjerenje razine glukoze, koristeći Clark-ovu tehnologiju, bio je *Yellow Springs Instrument Company* analitički instrument za direktno mjerenje glukoze 1975. godine temeljen na amperometrijskoj detekciji vodikova peroksida. Ovaj analitički instrument bio je gotovo isključivo korišten u kliničkim laboratorijima radi svoje visoke vrijednosti, odnosno skupe platinske elektrode što je naposljetku dovelo do razvoja druge generacije glukoznih biosenzora 1980. godine. Uz njihovu pomoć je minimizirano ometanje endogenih elektroaktivnih vrsta kao što su askorbinska kiselina, urinska kiselina i određeni lijekovi. Poboljšanja su postignuta zamjenom kisika sa nefiziološkim elektron-akceptorima zvanima redoks posrednici koji mogu prenositi elektrone od enzima do površine radne elektrode. Reducirani medijator je formiran umjesto vodikova peroksida, zatim reoksidiran na elektrodi, omogućujući amperometrijski signal i regenerirajući oksidiranu formu medijatora [5].

Razni elektronski medijatori korišteni su kako bi se poboljšale osobine senzora kao što su ferocen, fericijanid, kinoni, tetratialfulvalen (TTF), tetracijanokinodimetan (TCNQ), tionin, metilen plavo i metil viologen. Treća generacija glukoznih biosenzora je bez reagensa i temeljena na izravnom prijenosu između enzima i elektrode bez medijatora. Umjesto medijatora visoke toksičnosti, elektrode mogu izvesti direktan transfer elektrona koristeći organske vodičke materijale temeljene na kompleksima za transfer naboja. Stoga, treća generacija glukoznih biosenzora je dovela do implantabilnih tipova uređaja s iglom za kontinuirano *in vivo* praćenje razine glukoze u krvi. Vodičke organske soli, kao što su tetratiafulvalen-tetracijanokinodimetan (TTF-TCNQ), znane su kao medijatori elektrokemije pirol-kinolinekinonskih enzima (GDH-PQQ), kao i flavoproteini (GOx) [5].

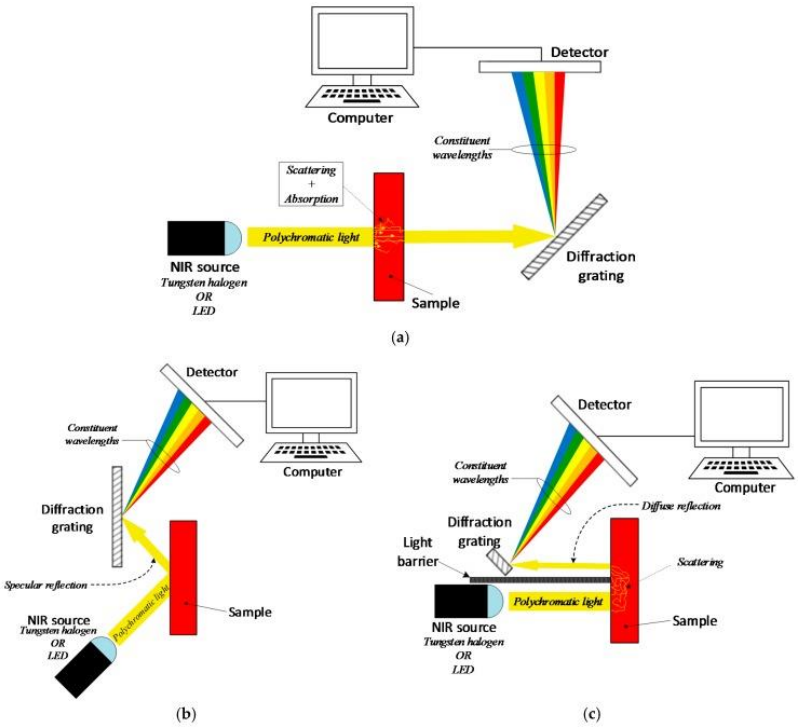
3. Neinvazivne metode

3.1. Optičke metode

3.1.1. Bliska infracrvena spektroskopija

Tehnologija bliske IR spektroskopije (NIRS) temelji se na apsorpciji i raspršenju valnih duljina između 780 nm i 2500 nm zbog molekularnih vibracija i rotacija veza unutar molekule. Za dobivanje rezultata koristi transmitanciju, refleksiju i interakciju. Ipak svi se načini rada oslanjaju na jednaku temeljnu tehnologiju - disperzivni spektrometar [8].

U transmitancijskom obliku (Slika 2.a.), izvor svjetlosti zrači polikromatsku svjetlost na uzorak, a difrakcijska pukotina na drugoj strani razdvaja transmitirano zračenje na svoje pripadne valne duljine prije nego ga prepozna i analizira detektor i računalo. U reflektirajućem obliku (Slika 2.b.), difrakcijska pukotina i detektor su na istoj strani izvora kako bi detektirali refleksiju na konačnom kutu, od uzorka. Slično tome, oblik interakcije (Slika 2.c.), također prepoznaje reflektirano svjetlo s uzorka, ali koristi svjetlosnu barijeru između upadnog i reflektiranog snopa kako bi se razdvojilo vidno polje detektora od osvijetljenog područja. Svi oblici su pogodni za mjerenje absorpcije/transmitancije i raspršenja u uzorku i preferencija za jedan od njih je temeljena samo na vrsti medija. Primjer, transmitancijski oblik ima prednost za analizu tekućina i vrlo tankih ili prozirnih uzoraka, dok su reflekija i interakcija preferirani oblici za guste ili čvrste uzorke [8].



Slika 2.: Shematski prikaz 3 oblika NIR spektroskopije. (**a**) oblik transmitancije. (**b**) oblik refleksije. (**c**) oblik interakcije. Izvor: [12]

Iako se u NIR području glukoza ne pokazuje snažne apsorpcijske uzorke u usporedbi sa ostalim područjima, kao MIR spektroskopija, voda također ne apsorbira mnogo NIR zračenja. Kao rezultat toga, do 95% svjetlosti može proći kroz epidermu kako bi došlo do regija s višom koncentracijom krvi bez utjecaja pigmentacije kože. Također, komponente i materijali za NIR spektroskopiju su dostupni na tržištu po pristupačnim cijenama. Zbog navedenih prednosti istraživači često gledaju tehnologiju baziranu na NIR-u kao prvu opciju za razvoj neinvazivnih uređaja u svrhu osobnog praćenja razine glukoze [9].

Nažalost, NIR tehnologija ima i neke nedostatke koji uključuju viši stupanj raspršenja u tkivima te interferenciju proteina i kiselina koje imaju slična apsorpcijska obilježja kao molekule glukoze. Time dolazi do veće kompleksnosti i nepouzdanosti prilikom analize detektiranih signala. Kao rezultat, alternativne tehnologije dobivaju više pažnje [10].

3.1.2. Srednja infracrvena spektroskopija

Srednja IR spektroskopija (MIRS) je vibracijska spektroskopska tehnika. Posjeduje identični sustav konfiguracije i apsorpcijske principe kao i NIR spektroskopija, ali koristi srednje infracrveno područje, otprilike između 2,5 μm i 10 μm. Zbog duljih valnih duljina u

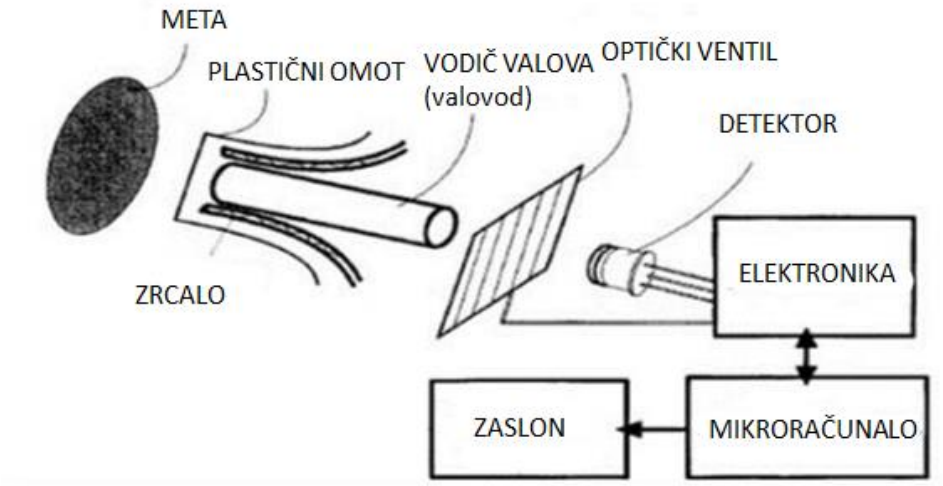
tkivu ima manje raspršenja MIR zračenja što dovodi do viših stopa apsorpcije i specifičnih oštrih apsorpcijskih linija u spektru, što je najviše izraženo u području 8-10 μm. Spomenuto označava karakteristični spektar molekula u MIR području, odnosno čini ih savršenima za identifikaciju molekula. Nažalost, snažna apsorpcija vode u ovom području ne dopušta MIR signalima prodiranje više od ~100 μm u tkivo čime korištenje snažnih MIR izvora i usporednih tehnologija, kao što je fotoakustična spektroskopija, postaje nužno za povišenje osjetljivosti u detekciji glukoze [8,11].

3.1.3. Daleka infracrvena spektroskopija/ Spektroskopija termalne emisije

Daleka infracrvena spektroskopija temeljena je na termalnom zračenju u rasponu 8000 – 14000 nm koje prirodno emitira ljudsko tijelo te ima spektralne informacije o analitima iz tkiva. Glukoza snažno apsorbira energiju valnih duljina oko 9400 nm. Predloženi sustav detektira prirodno emitirano zračenje ljudskog tijela,posebno od bubnjića. Informacija o toj membrani je važna jer dijeli zalihu krvi s hipotalamusom, centrom za temeljnu regulaciju tjelesne temperature [12].

Signali prikupljeni od ovog organa imaju manju duljinu puta u usporedbi s usnom mukozom ili mjestom na koži. Ima identičan princip selektivnosti kao apsorpcijska spektroskopija za mjerenja analita. Predloženi sustav, prikazan na Slici 3., sastoji se od ogledala koji se umetne u uho s plastičnom kapicom, sadržana zbog higijene. Za transmisiju IR zračenja, optički sustav sastoji se od vodiča IR valova s ventilom na kraju vodiča valova koji služi kao zatvarač. Sustav za detekciju sastoji se od optičkih filtera i detektora za beskontaktno mjerenje temperature, inače osjetljiv na IR regiju. Jedna od senzorskih komponenti je prekrivena s IR filterom osjetljivim na IR otisak glukoze. Odgovarajući filter koji nema spektralne vrpce karakteristične za izmjereni analit, prekriva drugi senzorski prostor. Spektralno izmijenjeno IR zračenje iz membrane osvjetljava svaku pukotinu. Razlika između intenziteta dva načina zračenja daje mjeru proporcionalnu koncentraciji analita. Informacije sa senzora tjelesne temperature, senzora vlažnosti okoline, senzora temperature okoline i koncentracije analita šalju se u elektronički sustav. Zatim se svi signali šalju u mikrokontroler na obradu, a na kraju se rezultati procijenjene koncentracije analita prikazuju na ekranu.

Jedna od prednosti ove tehnike je što nije potrebno svakodnevno kalibriranje, dok je s druge strane nedostatak ove tehnike činjenica da na intenzitet emitiranog zračenja s bubnjića utječe njegova temperatura i debljina.



Slika 3. Predloženi sustav za spektroskopiju termalne emisije. Izvor: [12]

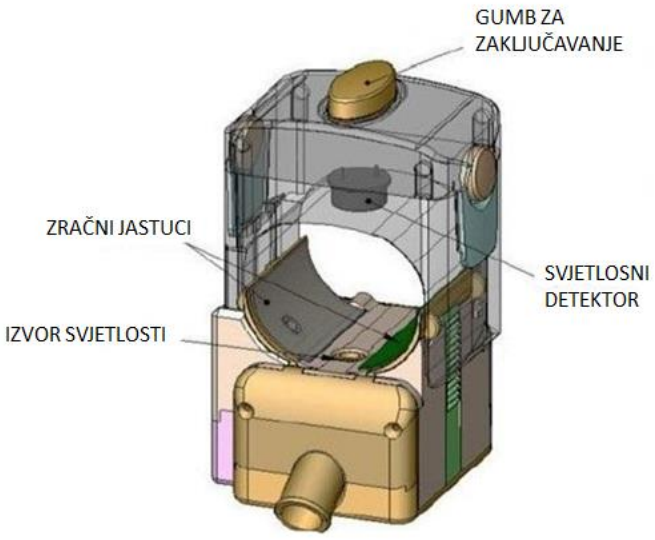
3.1.4. Fotoakustična (PA) spektroskopija

Predloženi sustav za ovu tehniku sastoji se od laserske diode, sustava za projekciju, pretvornika, optičkih vlakana, mikrokontrolera i zaslona. Ovim sustavom se glukoza iz krvi pobuđuje pomoću laserskih pulseva na vrlo kratke interval – nanosekunde, odnosno valnom duljinom koju je apsorbirala specifična molekula u fluidu kako bi se proizvelo lokalizirano zagrijavanje ovisno o specifičnom toplinskom kapacitetu tkiva koje se promatra. Apsorbirana toplina uzrokuje volumetrijsku ekspanziju medija te stvara ultrazvučni val koji može detektirati zvučni ili tlačni detektor. Generirani ultrazvučni val prolazi kroz zvučni rezonator, nazvan još i stanica, dolazi do detektora, koji se uglavnom sastoji od piezoelektričnog pretvornika kao što je mikrofon. Električni signal je na izlazu s detektora značajno pojačan, digitaliziran i poslan u računalo na analizu. Prateći varijacije detektiranog signala od pika do pika, moguće je povezati te varijacije s razinama glukoze u krvi. Mjerenjem zvučnog vala moguće je dobiti informaciju ne samo o količini glukoze u krvi, nego o ukupnoj ulaznoj energiji [8, 12].

Alternativa ovoj metodi je korištenje dva laserska izvora. Jedan koji bi pokrivao valne duljine snažne apsorpcije glukoze, a drugi koji bi pokrivao regije neosjetljive na glukozu kako bi omjer između dva mjerenja bio što veći. Najbolje mjesto na ljudskome tijelu za mjerenje glukoze fotoakustičnom spektroskopijom je oko. Druga mjesta su podlaktica i prst, no glukomeri bazirani na fotoakustičnoj spektroskopiji nisu još testirani na ljudima oboljelima od dijabetesa. Prednosti ove metode su svakako visoka osjetljivost pri detekciji i široki raspon valnih duljina lasera, od ultraljubičastih do bliskih infracrvenih koje su pogodne za PA spektroskopiju. Nedostatak metode je veoma visoka cijena, kao I činjenica da kemijske interferencije vrlo lako utječu na nju, a osjetljiva je i na okolišne promjene poput tlaka, temperature i vlažnosti [12].

3.1.5. Okluzijska spektroskopija

Okluzijska spektroskopija je temeljena na fenomenu raspršenja svjetla. Tu postoji inverzna veza između koncentracije glukoze i raspršenja koja vodi do kraćeg optičkog puta i manje apsorpcije. Na Slici 4. prikazan je dijagram neinvazivne sonde za praćenje glukoze.



Slika 4. Shematski dijagram neinvazivne sonde za praćenje glukoze. Izvor: [12]

U ovoj metodi, pneumatski prsten nanosi pritisak kako bi zaustavio krvotok na nekoliko sekundi. Opisani pritisak inducira puls u krvi ili promjenu volumena krvi. U isto vrijeme, svjetlost prolazi kroz uzorak i transmitiranu svjetlost detektira detektor koji

procjenjuje koncentraciju glukoze. Ova privremena obustava krvotoka u ljudskom tijelu (jagodica prsta) osnažuje generirani signal time izravno povećavajući omjer signala i šuma. Navedeni, dinamični, signal pospješuje osjetljivost na glukozu i robusnost interferencija, odnosno mjerenje glukoze postaje preciznije. Najbolje mjesto na ljudskome tijelu za okluzijsku spektroskopiju je jagodica prsta. Najvažnija prednost spomenute metode je veliki omjer signala i šuma što je neophodno za precizno mjerenje glukoze u krvi. Također, jedna od prednosti je mogućnost mjerenja arterijske glukoze, no ona je osjetljiva na mnoge intravaskularne varijable - liječenje lijekovima, koncentracija slobodnih masnih kiselina i hilomikroni. Osim toga, jedan od nedostataka je što su za kompenzaciju pomaka signala potrebne prikladne metode [9, 12].

3.1.6. Fluorescentne tehnike

Metoda temeljenih na fluorescenciji nije mnogo, ali se razlikuju po izvoru fluorescencije. Poenta ovog fenomena je emisija svjetlosti optički aktivnog materijala nakon što je ozračenje svjetla završilo. Drugi pristup je korištenje fluorescentnog rezonantnog prijenosa energije (FRET) za mjerenje koncentracije glukoze. Temelj ove metode je prijenos energije između dvije fluoroforne molekule ako su one bliže nego Försterov radijus. Kada ultraljubičasta svjetlost, valne duljine od 380nm padne na ljudsko tkivo, tada ljudsko tkivo generira fluorescenciju. Reflektirana svjetlost se sastoji od inducirane emisije svjetlosti nastale zbog interakcija između molekula glukoze i vode prisutne u uzorku i pobuđene svjetlosti. Detektor prepoznaje tu reflektiranu svjetlost i generira signal koji nosi informaciju o intenzitetu reflektirane svjetlosti povezane s karakteristikama koncentracije glukoze u emisijskom zračenju [12, 13].

Kontaktne leće temeljene na fluorescenciji građene su od polimerne opne, a razvijene su za detekciju koncentracije glukoze u suzama. Ova tehnologija je zaprimila veliku količinu pažnje jer je uređaj prenosiv i lako dostupan. Ove kontaktne leće mogu mijenjati boju ovisno o koncentraciji glukoze. Također, meke leće bazirane na hidro-gelu su sigurne za svakodnevnu uporabu kod pacijenata dijabetičara, ali metoda je iznimno osjetljiva. Fluorescencijskom metodom se može postići detekcija samo jedne molekule, a oštećenje ljudskog tkiva je minimalno ili ne postoji. Osim toga, prisutni su i određeni nedostaci - jako

veliko raspršenje ultraljubičastog zračenja. Isto tako, fluorescencija ovisi o nekoliko parametara kože kao što je crvenilo, pigmentacija i debljina [12,13].

3.1.7. Kromoskopija

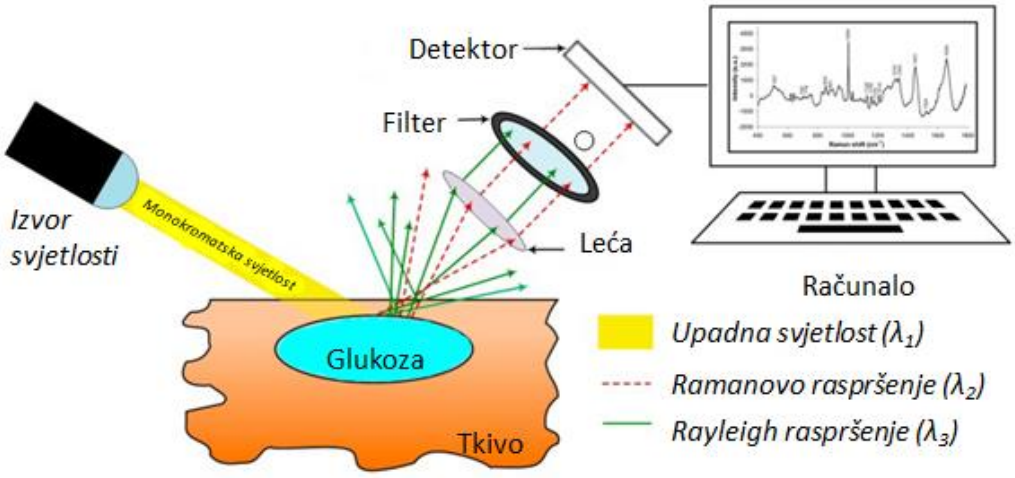
Kromoskopija je metoda u kojoj se bijela svjetlost propušta kroz željeni uzorak i rezultantna propuštena svjetlost je jednako razdijeljena na 4 kanala za detekciju. Svaki detektorski kanal odgovara na dio od cijelog spektralnog pojasa upadnog zračenja. Optički filter smješten odmah ispred detektorskog elementa definira spektralni odziv svakog pojedinog kanala i filteri su odabrani kako bi pružili odgovor preklapanja funkcije za kanale. Visoka propusnost ove optičke konfiguracije pruža veliki omjer signala i smetnji. Podudaranje izmjerenih optičkih signala nadalje pojačava taj omjer [14].

Kako bi se izmjerio ciljni analit kao što je glukoza, od interferencija, korištena je složena vektorska analiza. U smjesi glukoze i uree, glukoza i urea se jasno razlikuju. Prednost metode je što ima viši omjer signala i smetnji, a nedostatak što ima premalo teoretskih temelja za poboljšanje osjetljivosti iste [12].

3.1.8. Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija je temeljena na neelastičnom raspršenju monokromatskog svjetla. Neelastično raspršenje znači da je frekvencija fotona promijenjena nakon interakcije s uzorkom. Kada jednovalna svjetlost padne na metu, ta svjetlost se raspršti i putuje u svim smjerovima. Većina ovog zračenja, nazvano elastično ili Rayleighovo raspršenje, ima jednaku valnu duljinu kao i upadna svjetlost, dok je ostatak samo mala količina raspršenog zračenja s drugačijom valnom duljinom nazvano neelastično raspršenje ili Ramanovo raspršenje. Taj pomak u valnoj duljini naziva se Ramanov pomak i predstavlja razliku između početnog i konačnog vibracijskog stanja molekule koja se proučava. Kao takva, Ramanova spektroskopija je ovisna o rotacijskim i vibracijskim stanjima unutar molekule i može se koristiti za detektiranje specifičnih apsorpcijskih pojasa te može kvantificirati odgovarajuće molekule, što znači da pikovi u Ramanovom spektru prikazuju vibracije svake funkcijske skupine unutar molekule. Stoga, Ramanov pomak (izražen u cm^{-1}) će biti jednak bez obzira na valnu duljinu upadnog svjetla. U slučaju glukoze, najizraženije vibracije su C-H, oko 2900

cm^{-1}, te C-O i C-C između 800 i 1300 cm^{-1} . Predloženi sustav se sastoji od 4 glavne komponente: izvor lasera, uzorak, spektrometar i detektor. Slika 5. Prikazuje shemu Ramanove spektroskopije. Laserski snop prolazi kroz filter, leće i zrcala, zatim se fokusira na uzorak. Pozadinska raspršena svjetlost iz tijela prolazi kroz mrežni filter kako bi se odbila od spekularne komponente svjetlosti, nakon čega filtrirana svjetlost odlazi u spektrometar i spektar se prikazuje na detektoru [8,12].



Slika 5. Shematski prikaz Ramanove spektroskopije. Izvor: [8]

Prednosti ove metode su što su pikovi oštriji jer je utjecaj vode manji. Također, spektri se manje preklapaju. Nadalje, ova metoda posjeduje određena ograničenja kao što je nestabilnost intenziteta lasera, valne duljine i interferencija s drugim biološkim komponentama [8,12].

3.2. Transdermalne metode

3.2.1. Bioimpedancijska spektroskopija

Bioimpedancija je mjera otpornosti električnoj struji koja teče kroz tkiva živog organizma. Mjera bioelektričke impedancije se pokazala korisnom kao neinvazivna metoda za mjerenje sastava tijela. Impedancijski spektar ili dielektrički spektar, se mjeri u opsegu frekvencije od 0.1 do 100 MHz. Varijacije u koncentraciji glukoze potiču, u crvenim krvnim

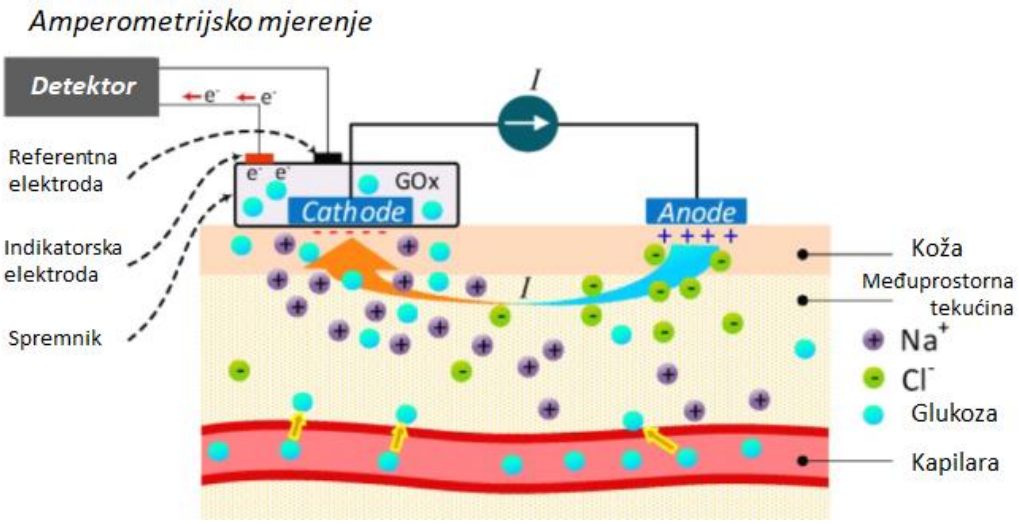
stanicama, smanjenje u koncentraciji natrijevih iona i povećanje u koncentraciji kalijevih iona. Spomenute varijacije uzrokuju promjene u potencijalu membrane crvenih krvnih stanica, što se može mjeriti određivanjem permitivnosti i konduktivnosti membrane stanice. Prednosti metode su jednostavnost aparature za korištenje i niska cijena u usporedbi s ostalim uređajima. Također, ova metoda ima potencijal za sposobnost razlikovanja između izvanstanične vode i unutarstanične vode, što uvelike pomaže procjeni mase stanice. S druge strane, nedostatak metode je obavezno mirovanje korisnika u trajanju od 60 minuta prije početka mjerenja. Također, problemi koji se još moraju riješiti su utjecaj na mjerenja koja imaju temperatura i količina vode u tijelu ili na tijelu, npr., vlažnost kože, znoj i cjelokupna hidratacija [16, 17].

3.2.2. Sonoforeza

Ova se tehnologija temelji na uzimanju uzorka međuprostorne tekućine za mjerenje glukoze enzimatskom metodom. Razlika je što sonoforeza koristi niskofrekvencijsk tlačne valove kako bi izvela molekule glukoze kroz kožu. Oslanja se na longitudinalnu prirodu ultrazvučnih valova, npr., što je smjer propagacije jednakog smjera kao smjer oscilacije, kako bi povećala permeabilnost kože i uzrokovala nastanak fenomena zvanog „kavitacija“. Radni princip kvitacije nije potpuno shvaćen, ali se sastoji od serije kompresijskih i ekspanzijskih pokreta dovoljne magnitude kako bi se ekstrahirao plin iz tkiva, noseći na sebi, uz druge tvari, glukozu. Prednost metode je prvenstveno ta što nema niti kakav štetni učinak na kožu, a mjerenje glukoze je temeljeno na vrlo dobro poznatoj enzimatskoj metodi. Također, ova metoda ima bolju kontrolu nad količinom glukoze koja se može ekstrahirati za analizu. Neka od ograničenja ove tehnologije su podložnost temperaturnim varijacijama, interferencije drugih spojeva i promjene tlakova. Iako je opisana tehnologija teoretski ostvariva, većina studija se fokusira na njezinu sposobnost dostave lijekova, a ne na mjerenje glukoze.

3.2.3. Obrnuta iontoforeza

Obrnuta iontoforeza se temelji na toku male količine električne struje kroz kožu, između anode i katode smještene na površini kože kako bi one imale pristup maloj količini međuprostorne tekućine. Električni potencijal primijenjen između elektroda uzrokuje migraciju natrijevih i kloridnih iona od prostora ispod površine kože prema katodi i anodi. Struju primarno generiraju ioni natrija uzrokujući elektro-osmotski tok međuprostorne tekućine koja sa sobom nosi molekule glukoze prema katodi. Na katodi se nalazi standardni glukozni senzor koji mjeri koncentraciju glukoze direktno enzimatskom metodom, npr., oksidacijom s enzimom, kao što je glukoza oksidaza (GOx) (slika 6.) [8,17].



Slika 6. Princip obrnute iontoforeze za mjerenje glukoze. Izvor: [8]

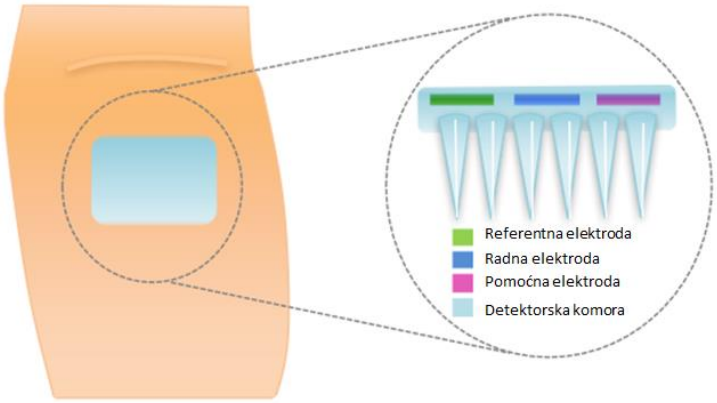
Prethodno spomenuti uređaj skuplja molekule glukoze kroz katodni disk i mjeri njihovu količinu sa senzorom koji sadrži enzim glukoza oksidazu. Koncentracija glukoze u krvi se može predvidjeti uspoređujući ranije izmjerenu vrijednost glukoze u krvi sa signalom generiranim glukoznim molekulama skupljenim na katodi. Prednost tehnologije je što se elektrode lako postavljaju na kožu i preko njih je relevantan uzorak fiziološke tekućine sakupljen. U njemu postoji korelacija između koncentracije glukoze u fiziološkoj otopini i koncentracije glukoze u krvi. Iako obrnuta iontoforeza ima veliki potencijal, jedini uređaj koji je ikada stavljen na tržište je imao određene mane u praksi pa je povučen s tržišta. Radilo se o

tome da je elektroda iritirala kožu te da su elektrode morale biti na mjestu uzorkovanja najmanje 60 minuta, što je prelazilo granice strpljenja kod većine korisnika. Štoviše, očitanja su bila netočna, posebno kada se korisnik znojio, a osim toga uređaj nije mogao prepoznati nagle promjene glukoze u krvi, zbog dugog vremena „buđenja“ sustava [8, 17].

4. Minimalno invazivne metode

4.1. Mikropore/Mikroigle

Ova je metoda zadnjih godina primila veliku količinu pažnje zbog pristupa koji je minimalno invazivan. Koncept je korišten u proizvodnji uređaja (Slika 7.). Uređaj je dizajniran na način da ima 2 odjeljka. Prvi sadrži mikroigle i senzore za glukozu, a drugi elektroniku. Štoviše, uređaj sadrži 200 šupljih mikroigala. Tri elektrode su korištene za kvantifikaciju koncentracije glukoze u međuprostornoj tekućini, uključujući Pt-C radnu elektrodu prekrivenu sa slojem goveđeg albuminskog seruma i glukoza oksidaze. Uređaj se lijepi na kožu pomoću ljepljivog sloja koji obilježava područje za provjeru glukoze. Detekcija se događa nakon difuzije glukoze u područje mikroigala gdje glukoza oksidaza može reagirati te proizvesti vodikov peroksid. Proizvodnja istoga, detektiranog radnom elektrodom, je proporcionalna koncentraciji glukoze [1].



Slika 7. Shematski prikaz flastera za detekciju glukoze mikroiglama na podlaktici. Izvor: [1]

Prva prednost uređaja temeljenih na ovoj metodi je što nosač mikroigala omogućuje uređajima stalni kontakt s kožom, omogućujući neprekidan pristup međuprostornoj tekućini i time uređaju konstantan rad. Također, kratka duljina mikroigala znači da je penetracija

optimalna za uzorkovanje međuprostorne tekućine, budući da mikroigle ne dodiruju sloj dermisa čime je maksimalno umanjeno bilo kakvo oštećenje kapilara i završetaka živaca koji se mogu naći u sloju dermisa. Nadalje, zbog činjenice da mikroigle prodiru u kožu, onečišćenje znojem je izbjegnuto. Shodno tome, testovi su pokazali kako uređaj može raditi uspješno do čak 72 sata s kašnjenjem od samo 17 minuta uzrokovano pasivnom difuzijom analita iz krvi u područje međuprostorne tekućine. Neki od nedostataka su što uređaj poput ovoga mora biti kalibriran svakodnevno metodom bockanja prsta. Također, začepljenje mikroigala i iskrivljenje njihova oblika pri penetraciji kože može narušiti dinamiku uzorkovanja [1].

5. Invazivne metode

5.1. Bockanje prsta

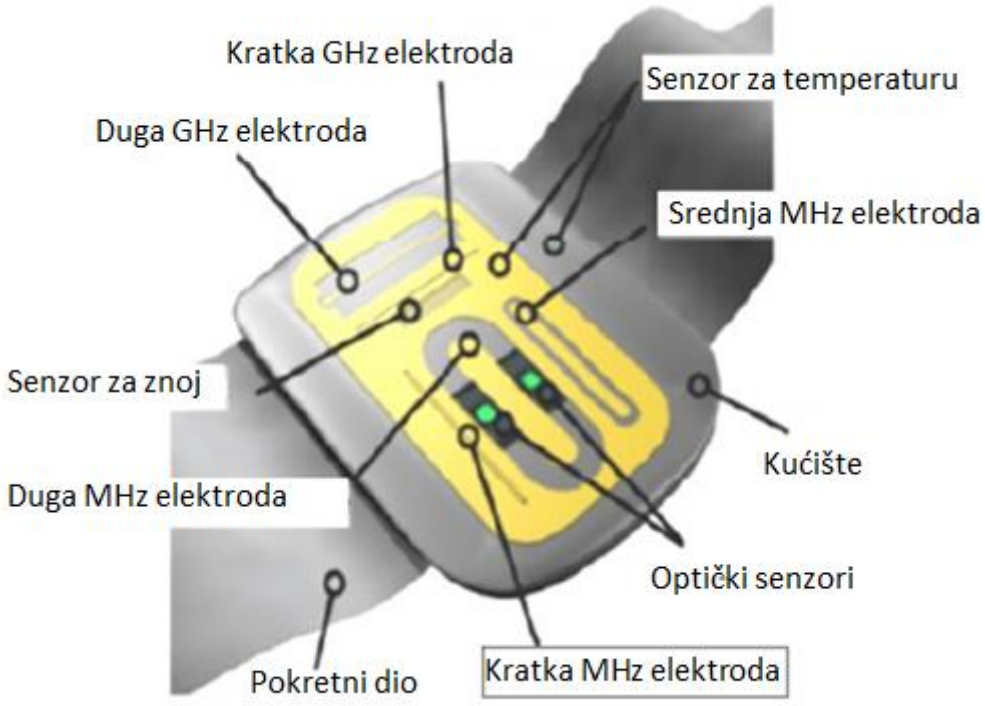
Ova metoda zahtijeva pristupanje kapilarnoj krvi, što činimo ubodom jagodice prsta lancetom. Metoda mjerenja glukoze je u principu jednaka kao i kod elektrokemijskih tehnika opisanih prethodno u radu, a glavna razlika je što se cijela reakcija i detekcija događaju na testnom senzoru povezanom na glukometar. Nakon što se kap uzorka krvi stavi na test senzor, glukoza oksidira u prisutnosti enzima kako bi se proizvela određena količina struje proporcionalna razini glukoze. Elektroni zatim putuju do glukometra koji sadrži pretvarač struje u napon čime se osigurava napon proporcionalan razini glukoze. Testni senzor sadrži enzim i tri elektrode: radnu, referentnu i pomoćnu elektrodu. Radna elektroda detektira stvarnu struju reakcije, referentna elektroda sadržava uvijek prisutan napon s obzirom na radnu elektrodu kako bi pomogla s kemijskom reakcijom, dok pomoćna elektroda opskrbljuje radnu elektrodu strujom, ali novim dizajnima su potrebne samo radna i referentna elektroda. Nadalje, ovisno o modelu, neki uređaji koriste glukoza oksidazu kao enzim, dok drugi koriste glukoza dehidrogenazu vezanu za koenzim pirolokinolin-kinon ili flavin adenin dinukleotid [1].

Prednost spomenute metode je stroga usklađenost, a glavni nedostatak je nekontinuirano mjerenje glukoze, već se ono odvija samo u određeno doba dana. Frekvencija tih mjerenja ovisi o tipu dijabetesa, dijeti, dozama lijeka i kliničkom stanju osobe [1].

6. Zaključak

U ovom radu opisana je većina neinvazivnih, minimalno invazivnih i invazivnih metoda za praćenje koncentracije glukoze u krvi. Dok su kod minimalno invazivnih i invazivnih metoda nedostaci uglavnom mehaničke prirode (začepljenje mikroigala i iskrivljenje njihova oblika zbog prodiranja u kožu), nekontinuiranost mjerenja glukoze (metoda bockanjem prsta) ili potreba svakodnevnog kalibriranja (uređaj za neinvazivno mjerenje glukoze mora se svakodnevno kalibrirati invazivnom metodom mjerenja glukoze u krvi), problemi kod većine neinvazivnih metoda su jednaki. A to su okolišne promjene (tlak, temperatura i vlažnost) i fiziološki procesi npr. varijacije temperature i znojenje. Niti jedan od uređaja u proizvodnji ne dostiže standarde idealnog senzora. Kako bi se razvio pouzdan uređaj za kontinuirano praćenje glukoze u krvi koji je prenosiv, nenametljiv i lak za nošenje na koži, utrošeni su veliki napori u razna znanstvena istraživanja. Kod takvih metoda najveći izazov je razlikovati slabe signale glukoze od pozadinskih spektralnih smetnju, tj. postići veliki omjer signala i šuma. No, kako niti jedna samostalna metoda nije toliko daleko razvijena, rješenje su znanstvenici pronašli u kombiniranju više metoda, gdje svaka metoda rješava neke od nedostataka drugih metoda. Uređaji s takvim načinom rada su tzv. multisenzori. Multisenzorna tehnologija se sastoji od kombinacije različitih metoda unutar jednog uređaja za detekciju i kompenzacija nedostataka koji su odgovorni za nedosljednosti i neispravnosti pojedinih metoda.

Kako bi dobili multisenzornu tehnologiju, jedan primjer je spajanje dvije tehnike kao što su bioimpedancijska spektroskopija i apsorpcijska spektroskopija. Bioimpedancijska mjerenja uključuju elektrode različitih geometrija i oblika, različitih frekvencijskih raspona, primjer od KHz do GHz, kao i optičke module (srednja infracrvena spektroskopija), senzore za vlažnost i temperaturu i akcelerometar. Ti senzori omogućuju mjerenje egzogenih i endogenih procesa tijela. Slika 8. prikazuje shematsku ilustraciju multisenzornog sustava koji ima elektrode dielektričnog senzora i optički senzor difuzne refleksije. Dva identična senzora difuzne refleksije su korištena za mjerenje optičkih svojstava kože. Dielektrična svojstva kože su proučavana u tri frekvencijske regije: nisko frekvencijski (kHz) senzori, visoko frekvencijski (MHz) senzori i još više frekvencije, mikrovalni (GHz) senzori. Dielektrični senzori mjere dielektrični naboj kože i potkožnog tkiva unutar frekvencijske regije [12].



Slika 8. Shematsku ilustraciju multisenzornog sustava. Izvor: [12]

Kako je već ranije spomenuto i u opisu svake metode posebno napomenuto, svaka od metoda ima svoje prednosti, no i svoje nedostatke. Najveći nedostatak je mala pouzdanost mjerenih vrijednosti, ali ako istovremeno vršimo mjerenje sa više neinvazivnih metoda, koje imaju malu pouzdanost, presjekom rezultata možemo dobiti mjerni rezultat sa odgovarajućom pouzdanosti.

Daljnjim razvijanjem neinvazivnih metoda može se pokušati doći do metode koja bi imala najminimalnije nedostatke. No, metoda već ima velik broj, stoga kao daljnji napredak, odnosno smjer u kojem bi rješavanje ovog problema trebao ići, želim pokazati da nije samo daljnje razvijanje metoda, nego upravo kombinacija više, već postojećih metoda i senzora, u jedan uređaj. Jer, kombinacija različitih metoda smanjuje greške koje svaka metoda posebno ima, čime se povećava točnost konačnog rezultata. Jedini nedostatak tog postupka je u praksi, a to je da se povećanjem broja metoda ili senzora, povećava i kompleksnost i cijena samog uređaja.

7. Literatura

1. D. Bruen, C. Delaney i sur., *Sensors.* **17** (2017), 1866.
2. M. Sabokdast i sur., *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.* **23** (2015), 42.
3. S. Coster, M.C. Gulliford, P.T. Seed, J.K. Powrie, R. Swaminathan, *Health Technol. Assess*. **4** (2000), 1–93.
4. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* **27** (2004), 5–10.
5. E.H. Yoo, S.J. Lee, *Sensors.* **10** (2010), 4558-4576.
6. P. Makaram, D. Owens, J. Aceros, *Diagnostics.* **4** (2014), 27-46.
7. I. Bebek, P. Šaler, *Uporaba površinski modificiranih titanatnih nanocjevčica u amperometrijskim biosenzorima*. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2010.
8. W.V. Gonzales, A.T. Mobashsher, A. Abbosh, *Sensors.* **19** (2019), 800.
9. N.S. Oliver, C.Toumazou, A.E.G. Cass, D.G. Johnston, *Diabetic Medicine*. **26** (2009), 197-210.
10. K. Maruo i sur., *Applied spectroscopy.* **60** (2006), 441-449.
11. H.A. MacKenzie i sur., *Clinical chemistry.* **45** (1999), 1587-1595.
12. A. Nawaz i sur., *Journal of Bioinformatics and Diabetes.* **1** (2016), 1-27.
13. G. Eigner, P. I. Sas, L. Kovács, *2014 IEEE 9th IEEE International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics (SACI*) (2014) 117 - 122
14. A.M. Helwig, M.A. Arnold, G.W. Small, *Applied Optics*. **39** (2000), 4715-4720.
15. J. Shao, M. Lin, Y. Li, X. Li, J. Liu, J. Liang, H. Yao, *PloS one*. **7** (2012), e48127.
16. M.H. Jun i sur., *Scientific reports.* **8** (2018), 648.
17. C.F. So i sur., *Medical Devices (Auckland, NZ)*. **5** (2012), 45.