



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

**Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale “Gino Patrassi”**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E
SPERIMENTALI. INDIRIZZO: SCIENZE DIABETOLOGICHE
CICLO XXIV**

Tesi di Dottorato

**APPROCCI TECNOLOGICI *IN VITRO* PER LA MISURA NON INVASIVA DELLA
GLICEMIA.**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Angelo Avogaro

Supervisore: Ch.mo Prof. Paolo Tessari

Dottorando: Dott. Stefano Sbrignadello

Gennaio 2012

A mio padre



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



Tesi di Dottorato

**APPROCCI TECNOLOGICI *IN VITRO* PER LA MISURA NON INVASIVA DELLA
GLICEMIA.**

Dottorando: Dott. Stefano Sbrignadello

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Angelo Avogaro

Supervisore: Ch.mo Prof. Paolo Tessari

Correlatore: Ing. Andrea Tura

Questa tesi è stata svolta in parte presso l'Unità Metabolica (diretta dal Dr. Ing. Giovanni Pacini) dell'Istituto di Ingegneria Biomedica (ISIB) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Padova

INDICE

Riassunto del lavoro svolto.....	4
Summary.....	5
1.INTRODUZIONE.....	6
1.1.1 Misura della Glicemia.....	6
1.1.2 L'emoglobina glicata.....	7
1.1.3 L'automonitoraggio del glucosio ematico.....	8
1.1.4 Monitoraggio continuo.....	9
1.2 Sensoristica del glucosio.....	10
1.2.1 Storia.....	10
1.2.2 La prima generazione di sensori per il glucosio.....	10
1.2.3 La seconda generazione di sensori per il glucosio.....	11
1.2.4 la terza generazione di sensori per il glucosio.....	12
1.3 Sistemi di monitoraggio continuo del glucosio (CGMS).....	14
1.4 Verifica e convalida delle prestazioni analitiche dei biosensori per il glucosio.....	14
1.5 Il monitoraggio non invasivo della glicemia.....	14
1.5.1 Spettroscopia nel vicino infrarosso.....	17
1.5.2 Spettroscopia nel medio infrarosso.....	20
1.5.3 Tomografia ottica a radiazione coerente.....	20
1.5.4 Riflettanza localizzata temperatura-mediata.....	22
1.5.5 Spettroscopia Raman.....	23
1.5.6 Polarimetria.....	23
1.5.7 Ultrasuoni.....	24
1.5.8 Fluorescenza.....	26
1.5.9 Spettroscopia termica.....	26
1.5.10 Spettroscopia oculare.....	27
1.5.11 Spettroscopia di impedenza.....	27
1.5.12 Rilevamento elettromagnetico.....	28
1.5.13 Sonoforesi.....	30
1.5.14 Ionoforesi.....	30
1.5.15 Microonde.....	31
1.6 Dispositivi e prototipi per il monitoraggio non invasivo.....	32
1.7 la misura della glicemia nel paziente in dialisi.....	34

2. MATERIALI E METODI.....	37
2.1.1 Impedenza.....	37
2.1.2 Tecniche di spettroscopia dielettrica o di impedenza.....	37
2.2 Spettroscopia dielettrica per la misura di soluzioni di NaCl e glucosio.....	39
2.3 Spettroscopia dielettrica di soluzioni di acqua, NaCl e sangue, con aggiunta di glucosio.....	43
2.4 Misura indiretta del glucosio con un sensore elettromagnetico.....	45
2.5 Valutazione di conducibilità tramite spettroscopia dielettrica e resine a scambio ionico.....	49
2.6 Applicazione di tecniche FT-NIR per la misura del glucosio in soluzioni conduttive.....	53
3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	58
3.1 Proprietà dielettriche dei materiali biologici.....	58
3.2 Metodi impedenziometrici per l'approccio alla misura non invasiva della glicemia.....	58
3.2.1 Risultati.....	58
3.2.2 Discussione.....	65
3.3 Misura indiretta del glucosio con un sensore elettromagnetico.....	71
3.3.1 Risultati.....	71
3.3.2 Discussione.....	73
3.4 Valutazione di conducibilità tramite spettroscopia dielettrica e resine a scambio ionico.....	76
3.4.1 Risultati.....	76
3.4.2 Discussione.....	83
3.5 Applicazione di tecniche FT-NIR per la misura del glucosio in soluzioni conduttive.....	84
3.5.1 Risultati.....	84
3.5.2 Discussione.....	88
4. CONCLUSIONI.....	89
ABBREVIAZIONI.....	91
BIBLIOGRAFIA.....	92
ATTIVITA' DI RICERCA E PUBBLICAZIONI.....	109
RINGRAZIAMENTI.....	112

RIASSUNTO DEL LAVORO SVOLTO

Questo studio ha riguardato l'analisi di alcune tecnologie di possibile interesse per chiarificare l'annoso problema del monitoraggio non invasivo della glicemia.

Lo sviluppo di un metodo affidabile per il monitoraggio non invasivo della glicemia sarebbe di enorme impatto medico e sociale nella gestione del diabete; è davvero un argomento di grande interesse, e in rapida evoluzione.

In questo studio abbiamo per prima cosa analizzato le variazioni di l'impedenza in diversi tipi di soluzioni: glucosio e acqua, glucosio e cloruro di sodio e glucosio e sangue bovino; per valori crescenti di glucosio (da concentrazioni fisiologiche fino a 5000 mg/dl). In tutta la gamma di frequenze studiata i campioni hanno mostrato un aumento del modulo di impedenza per i valori di glucosio crescenti (fino al 135%) anche se con andamenti diversi a seconda della tipologia della sostanza analizzata. Abbiamo anche messo a punto e proposto un sensore non-contact a campi elettromagnetici, con il quale abbiamo analizzato soluzioni di NaCl e Ringer lattato. Il sensore è stato in grado di rilevare l'effetto delle variazioni di glucosio in un ampio *range* di concentrazioni (~78-5,000 mg/dl), con una sensibilità di ~0,22 mV/(mg/dL). I nostri sistemi, qui proposti, possono quindi essere utili per un nuovo approccio alla misura non invasiva della glicemia, e chiarificano alcuni aspetti, poco indagati in letteratura, sulle proprietà dielettriche delle soluzioni contenenti glucosio.

Nella seconda parte ci siamo concentrati sullo sviluppo di un sistema per misurare i livelli di glucosio nei pazienti in terapia dialitica. A questo scopo abbiamo fatto prove con varie soluzioni a diverse conduttività, utilizzando resine a scambio ionico per isolare il contributo del sodio e del glucosio al segnale di impedenza; e valutando la possibilità di derivare la concentrazione di glucosio dal segnale del sodio.

Un altro approccio promettente, alla misura in dialisi, è stato utilizzare la spettroscopia FT-NIR, con cui abbiamo valutato le variazioni di concentrazioni di glucosio in soluzioni di Ringer lattato, utilizzando il Nicolet Antaris NIR-II™(Thermoscientific). I risultati sono stati incoraggianti, l'apparecchio si è dimostrato in grado di discriminare la presenza e la quantità di glucosio con buona precisione. I principali vantaggi di questo approccio sono: l'assenza di materiali di consumo, la possibilità di utilizzo da parte di personale anche non qualificato e la possibilità di gestire fino a 4 pazienti con un unico strumento.

SUMMARY

This study involved the analysis of some technologies that might be of interest to clarify the long standing problem of non-invasive blood glucose monitoring.

The development of a reliable method for noninvasive glycemia monitoring would have a tremendous medical and social impact for the management of diabetes, due to its high and increasing prevalence. This is indeed a topic of great interest, and one that is rapidly evolving.

We investigated the impedance variations in glucose–water, glucose–sodium chloride, and glucose–blood samples, for increasing glucose values (from physiological range up to 5000 mg/dl). On the whole frequency range studied, all samples showed impedance modulus increases for increasing glucose values (up to 135%), although with different trends depending on the type of substance being analyzed. We have also developed an electromagnetic sensor, and we tested *in vitro* its ability to estimate variations in glucose concentration of different solutions with similarities to blood (sodium chloride and Ringer-lactate solutions). The sensor was able to detect the effect of glucose variations over a wide range of concentrations (~78–5,000 mg/dL), with a sensitivity of ~0.22 mV/(mg/dL).

The systems proposed may thus be useful in a new approach for non-invasive and non-contact glucose monitoring, and also can help clarifying some aspects, not investigated in the literature, about the dielectric properties of solutions containing glucose. In the second part we focused on developing a system to measure glucose levels in patients on dialysis. To this end, we tests different solutions with different conductivity, using ion exchange resins to isolate the contribution of sodium and glucose in the impedance signal, and evaluating the possibility to derive the concentration of glucose from the sodium signal.

Another promising approach for continuous glycemia measurement during dialysis is the FT-NIR spectroscopy. We evaluated the changes in concentrations of glucose in Ringer's lactate solutions, using the Nicolet Antaris NIR-II™ (Thermoscientific). The results were encouraging, the device has proved able to discriminate the presence and amount of glucose with good accuracy. Main advantages of our approach are no need of consumables (solvents/reagents), and usability by unskilled personnel. Besides, the application of our system (handling up to 4 patients with a unique NIR instrument) may allow reduction of the personnel required to monitor the concomitant dialysis sessions of several patients.

1. INTRODUZIONE

Il Diabete Mellito rappresenta il più comune gruppo di disturbi a carico del metabolismo dei carboidrati; al giorno d'oggi risulta essere una delle principali cause di patologie e mortalità, nonché un importante problema sanitario, per la maggior parte delle società sviluppate.

L'incidenza del diabete continua ad aumentare a livello mondiale. La percentuale segnalata di adulti malati negli Stati Uniti (USA) è stata del 9,6% (20,4 milioni) nel periodo 2003-2006 [1]. Inoltre, è stimato che 48,3 milioni persone negli Stati Uniti avrà il diabete entro il 2050 [2]. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha fissato a circa 171 milioni il numero di persone con diabete in tutto il mondo nell'anno 2000, e questo dovrebbe aumentare a 366 milioni entro il 2030 [3]. Un recente studio ha stimato che la prevalenza mondiale del diabete tra gli adulti (20-79 anni) sia del 6,4%, colpendo quindi nel 2010 circa 285 milioni di adulti. E secondo le previsioni aumenterà al 7,7% entro il 2030 colpendo così 439 milioni di adulti [4].

1.1.1 Misura della Glicemia

La misurazione della glicemia nei pazienti diabetici è sempre stata una problematica fondamentale nell'evoluzione del trattamento della patologia attraverso gli anni.

Fino al 1910, i chiari sintomi dell'iperglicemia (poliuria, polidipsia, ecc.) erano gli unici parametri disponibili per il controllo diabetico. Lo sviluppo del test per la determinazione del glucosio urinario ha permesso di documentare episodi d'iperglicemia severa, ma era un test con forti limitazioni date dal fatto di avere solo valore retrospettivo e semiquantitativo, oltre a essere fortemente influenzato dalla concentrazione urinaria [5].

Un cambiamento importante nella gestione del paziente diabetico è avvenuto nel decennio tra il 1970 e il 1980 con la disponibilità di due nuovi test: l'automonitoraggio del glucosio ematico (*self-monitoring of blood glucose*, SMBG ovvero automisurazione della glicemia capillare da parte dei pazienti nel corso della vita quotidiana) e il test dell'emoglobina glicata (HbA1c). Questi test sono stati perfezionati nel tempo grazie ai progressi delle tecnologie analitiche e informatiche, e ad oggi costituiscono uno strumento insostituibile nella gestione quotidiana del diabete. [5-6].

L'informazione ottenuta da questi due test è profondamente diversa.

1.1.2 L'emoglobina glicata

La misura dell'emoglobina glicata (HbA1c) nel sangue è da anni il *gold-standard* per la valutazione del controllo glicemico nei soggetti malati di diabete. Infatti, è dalla pubblicazione dei risultati dello studio del Diabetes Complications Control Trial (DCCT) [7], che risulta noto come livelli elevati dell'HbA1c aumentano il rischio delle complicanze micro e macrovascolari; questo parametro quindi viene utilizzato come target per guidare le scelte terapeutiche. In particolare, dallo studio DCCT è emerso che ogni aumento dell'1% dell'HbA1c è associato a un peggioramento della glicemia media di circa 35 mg/dl e gli attuali target terapeutici raccomandati dall'ADA indicano come l'obiettivo primario della terapia deve portare a un valore di HbA1c non superiore al 7%; se, invece l'HbA1c è costantemente superiore all'8% è opportuno che il trattamento terapeutico debba essere prontamente rivalutato. Infine altri enti diversi dall'ADA, quali la International Diabetes Federation (IDF) raccomandano di raggiungere e mantenere valori di HbA1c inferiori a 6,5% per minimizzare il rischio delle complicanze [8]. Un altro utilizzo tipico dell'HbA1c è quello di fornire una misura del grado di qualità delle cure prestate ai pazienti con diabete, e i criteri dell'ADA indicano che la percentuale di pazienti con valori di HbA1c superiori al 9,0% non dovrebbe superare il 20% del totale dei pazienti adulti. Inoltre la quota dei diabetici con valori inferiori al 7% dovrebbe essere almeno pari al 40% del totale. La misura dell'HbA1c è anche molto importante per confermare la diagnosi di diabete e, recentissimamente, sono state pubblicate le prime raccomandazioni in tal senso, in particolare, valori $\geq 6,5\%$, se confermati in almeno due occasioni successive, permetterebbero di porre diagnosi di diabete [8]. La frequenza della misurazione dell'HbA1c è, teoricamente, legata alla vita media dei globuli rossi (4 mesi) e quindi dovrebbe essere di tre volte all'anno. Le raccomandazioni ADA consigliano di misurarla 2 volte all'anno in pazienti in controllo metabolico stabile e che abbiano raggiunto i target terapeutici, diversamente con un maggior numero di determinazioni per i pazienti in controllo instabile. Nel diabete gestazionale e in casi particolari le determinazioni possono essere fatte anche a distanza di due mesi. E' anche possibile a distanza di un mese osservare diminuzioni significative dell'HbA1c (tra 0,5 e 0,7%) in pazienti ospedalizzati e messi sotto stretto regime ipoglicemizzante [9].

Affinché il dato dell'HbA1c sia utilizzabile, occorre che le misure siano standardizzate e, in quest'ottica, dal 1995 la Federazione Internazionale di Chimica Clinica (IFCC) ha

promosso le attività di un gruppo di lavoro che affrontasse il problema (IFCC WG-HbA1c). Dopo circa 13 anni, il gruppo di lavoro è giunto al punto di avere un metodo ufficiale di riferimento [10], producendo e rendendo disponibili due materiali primari di riferimento [11]; si è implementata anche una rete internazionale di laboratori di riferimento [9-12-13].

1.1.3 L'automonitoraggio del glucosio ematico

La SMBG rivela il livello di glucosio ematico nel preciso momento della misura, che può variare, durante un giorno normale, fino al 50% nelle persone sane, ma fino a 10 volte nei pazienti affetti da diabete. L'efficacia terapeutica del SMBG, nella riduzione del rischio di sviluppare complicanze micro e macrovascolari, è stata dimostrata nel diabete di tipo 1 [7-14] e nel diabete di tipo 2 in terapia insulinica [15]. Il suo impiego è da tempo inserito in tutte le linee guida, comprese quelle dell'ADA [8].

Manca ancora invece una sicura evidenza per quanto riguarda il diabete di tipo 2 non trattato con insulina, soprattutto in relazione ai risultati controversi riportati in letteratura. Considerati i costi del SMBG, già significativi per i sistemi sanitari dei Paesi sviluppati e addirittura proibitivi per quelli in via di sviluppo di recente investiti dalla pandemia del diabete, il tema dell'efficacia del SMBG e, conseguentemente, della sua utilità di impiego anche nel diabete di tipo 2 è oggetto di acceso dibattito tra le comunità medica e dei pazienti da un lato, e gli Enti pubblici e privati erogatori di prestazioni, dall'altro [16]. A tale proposito, è da rimarcare che le recenti raccomandazioni IDF [17] suggeriscono che il SMBG possa essere uno strumento efficace nel diabete di tipo 2 non insulino-trattato, a condizione che venga inteso come parte integrante di un programma di educazione e terapia, utilizzato dal medico e dallo stesso paziente per modificare il trattamento complessivo del diabete attraverso azioni di cambiamento del comportamento e della terapia farmacologica e non farmacologica, per il raggiungimento degli obiettivi glicemici prestabiliti. Di qui la necessità di considerare il SMBG come strumento per l'ottimizzazione della terapia, sia per il paziente sia per il medico. Recentemente alcuni studi si sono posti come obiettivo la prova formale dell'efficacia del SMBG nel diabete di tipo 2 non insulino trattato [18]. Tuttavia, malgrado l'ufficializzazione e la diffusione di tali raccomandazioni, la progressiva semplificazione delle procedure di esecuzione e l'indubbia affidabilità dei risultati, il SMBG rimane uno strumento soltanto in parte applicato e largamente imperfetto: infatti, ancora oggi la maggioranza dei pazienti non effettua un numero congruo di controlli.

1.1.4 Monitoraggio continuo

L'insufficiente istruzione, il dolore associato alla puntura, nonché la frequente impreparazione nell'interpretazione dei risultati, sono tra le principali ragioni per le quali l'SMBG non viene ancora correttamente utilizzato. A questi limiti, si aggiunga la criticità intrinseca del SMBG, ossia la natura puntiforme delle misurazioni che impedisce il pieno riconoscimento delle escursioni, sia iper- sia ipoglicemiche, oltre che non essere in grado di leggere la tendenza glicemica in quel momento. Da qui, gli sforzi della ricerca per la messa a punto di tecnologie non invasive, attualmente non ancora disponibili, o minimamente invasive come quelle attualmente disponibili, che consentano di misurare la glicemia in modo continuo e con lettura in tempo reale, al fine di offrire una visione dinamica del profilo glicemico nelle 24 ore [19].

A questo proposito dopo i primi dati positivi, il monitoraggio continuo in tempo reale del glucosio (RT-CGM) è stato approfondito da alcuni recenti studi randomizzati e controllati che hanno offerto una prova in più a sostegno della sua efficacia e sicurezza nel diabete tipo 1 [20]. L'integrazione del CGM con le pompe di insulina offre poi un ulteriore vantaggio. Il bilancio generale di questi studi condotti è stato un miglioramento del controllo metabolico con riduzione significativa dell'emoglobina glicata insieme ad altri parametri di glicemia e senza un concomitante aumento di episodi di ipoglicemia, gli studi hanno riguardato diverse fasce d'età compresi bambini e adolescenti. Ridurre i casi di ipoglicemia con il CGM in pazienti T1D ben controllati resta da dimostrare, tuttavia, le prove di riduzione degli episodi d'ipoglicemia nei pazienti critici sembrano convincenti. Anche alcuni importanti aspetti del diabete tipo 2 (T2D) sono stati recentemente affrontati con il CGM. [21]. Nel corso degli ultimi tre anni, diversi dispositivi per la misurazione del liquido interstiziale intermittenza o in continuo, sono stati sviluppati e approvati in aggiunta al monitoraggio della glicemia nel sangue, per l'uso in soggetti con diabete di tipo 1. Studi originali utilizzando questi prototipi hanno prodotto dati promettenti nel ridurre l'HbA1c in individui selezionati con un controllo non ottimale. Il primo studio randomizzato e controllato con un sensore sottocutaneo continuo ha dimostrato una significativa diminuzione di HbA1c nei pazienti adulti e pediatrici con scarso controllo metabolico tramite la RT-CGM. Il dispositivo di misura in continuo è stato testato per 3 mesi in confronto con l'auto-monitoraggio della glicemia in un gruppo di controllo [22]. Molti passi avanti sono stati fatti, anche se per alcune categorie come il diabete gestazionale, i T2DM

e i pazienti con un'importante storia di ipoglicemie non vi sono ancora abbastanza dati e prove evidenti di efficacia [23].

1.2. Sensoristica del Glucosio

1.2.1 Storia

L'evoluzione dei dispositivi è un processo costante nella sensoristica del glucosio, anche se in realtà il principio non è variato di molto nel corso degli anni. Tuttavia, il primo misuratore di glucosio nel sangue non si può dire propriamente un biosensore, per la mancanza della componente biologica. L' Ames Reflectance Meter (ARM) (Laboratori Miles, Elkhart, IN, USA) si basava su un riflettometro accoppiato alla Dextrostix e introdotto nel 1971. La Dextrostix è stata la prima striscia per il glucosio ematico, già disponibile dal 1965 e, originariamente progettata per mostrare i cambiamenti di colore corrispondenti alla concentrazione misurata. Anche se l'ARM era costoso e non di facile utilizzo, si impose sul mercato. Le prime versioni dei dispositivi di rilevamento glicemico erano tutte basate sulla misura dell'indice di rifrazione per determinare il contenuto di glucosio [24-25].

1.2.2 La prima generazione di Sensori per il Glucosio

Il concetto di biosensore per misurare i livelli di glucosio è stato proposto per la prima volta nel 1962 da Clark e Lyons del Children's Hospital of Cincinnati. Questo biosensore per il glucosio era composto da un elettrodo ad ossigeno, una membrana interna semipermeabile all'ossigeno, un sottile strato di Gox (glucose oxidase enzyme-enzima glucosio ossidasi) e una membrana di dialisi esterna. Una diminuzione della concentrazione di ossigeno misurata risulta proporzionale alla concentrazione di glucosio. Updike e Hicks hanno poi notevolmente semplificato il test del glucosio, immobilizzando per la prima il GOX in un gel di poliacrilamide su un elettrodo a ossigeno rendendo più agevole la misura della concentrazione di glucosio nei fluidi biologici [26-27].

Il primo biosensore di successo commerciale, grazie alla tecnologia di Clark, è stato lo Yellow Springs Instrument Company analyzer (Model 23A YSI analyzer) nel 1975, basato sulla rilevazione amperometrica di perossido di idrogeno. Questo analizzatore è stato usato quasi esclusivamente nei laboratori clinici, a causa del suo costo elevato e a causa del prezzo dell'elettrodo di platino.

La prima generazione di biosensori glucosio si basava, quindi, sull'uso di ossigeno come substrato naturale e sulla rilevazione del perossido d'idrogeno prodotto avendo il vantaggio di essere più semplice, soprattutto quando i dispositivi devono essere miniaturizzati per essere resi portatili [28]. Tuttavia, il principale problema con la prima generazione di biosensori fu che la misura amperometrica di perossido di idrogeno richiedeva un alto potenziale operativo per dare una misura selettiva. Notevoli sforzi durante la fine degli anni '80 sono stati protratti per minimizzare l'interferenza di specie elettro attive endogene, come l'acido ascorbico, acido urico, e alcuni farmaci che interferivano con la misura. Un altro inconveniente era la limitata solubilità dell'ossigeno nei liquidi biologici, che produce fluttuazioni nella tensione di ossigeno, un effetto conosciuto come "oxygen deficit" [29].

1.2.3 La seconda generazione di Sensori per il Glucosio

I miglioramenti nei biosensori sono stati raggiunti sostituendo l'ossigeno con accettori di elettroni non fisiologici, chiamati mediatori redox, in grado di trasportare elettroni dall'enzima alla superficie attiva dell'elettrodo [29]. In questo modo, invece del perossido di idrogeno si forma un mediatore ridotto che viene poi riossidato all'elettrodo, fornendo un segnale amperometrico e rigenerando la forma ossidata del mediatore [28]. Una varietà di mediatori di elettroni, come ferricianuro, ferrocene, TetraTioFulvalene (TTF), TetraCianoChinodimetano (TCNQ), tionina (o "violetto di Lauth"), blu di metilene, e Metilviologeno dicloruro sono stati utilizzati per migliorare le prestazioni dei sensori [30-31]. La prima ricerca sulla determinazione amperometrica di glucosio nel sangue, usando una coppia redox, con una reazione catalizzata dal GOX è stata dimostrata nel 1970 [32]; tuttavia, questo studio non ha comportato l'applicazione rapida del metodo amperometrico nell'SMBG domiciliare.

Durante il 1980, i biosensori di seconda generazione sono stati ulteriormente sviluppati e implementati con l'introduzione sia di strisce serigrafate per il SMBG, sia con l'uso di elettrodi modificati e di membrane su misura per migliorare le prestazioni dei vari sensori [33]. Il primo apparecchio per l'automonitoraggio del glucosio nel sangue aveva le dimensioni di una penna ed è stato lanciato sul mercato nel 1987, con il nome di ExacTech by Medisense Inc.: il dispositivo utilizzava il GDH-PQQ (quinoprotein glucose dehydrogenase) come enzima accoppiato con un derivato del ferrocene [34]. Il suo successo ha portato ad una rivoluzione nella cura dei pazienti diabetici. Il funzionamento

attuale della maggior parte dei biosensori del glucosio commerciali non differisce significativamente da quella del contatore ExacTech (Vedi riquadro).

1.2.4 La terza generazione di Sensori per il Glucosio

La terza generazione di biosensori per il glucosio si basa su dispositivi *reagentless* basati quindi sul trasferimento diretto tra enzima e l'elettrodo senza mediatori.

Invece di utilizzare mediatori che possiedono elevata tossicità, l'elettrodo può effettuare trasferimenti di elettroni direttamente, utilizzando materiali organici come conduttori sulla base di trasferimenti di carica complessi; quindi l'assenza del mediatore, quindi, conferisce una selettività migliore, poiché il potenziale di lavoro è identico a quello dell'enzima e perciò meno propenso alle eventuali interferenze, anche perché non è più presente un intermediario tra l'enzima ed il sensore. Il maggior svantaggio dei biosensori di terza generazione risiede nel numero ridotto di enzimi capaci di trasferire elettroni direttamente all'elettrodo. Il trasferimento elettronico avviene anche quando l'enzima ed il mediatore sono co-immobilizzati sulla superficie dell'elettrodo, cosicché il componente biologico diventa parte integrante del trasduttore di segnale. [35]. La comunicazione diretta tra l'enzima e l'elettrodo avviene anche quando il sito attivo dell'enzima è cablato (*wired*) alla superficie del trasduttore di segnale, per mezzo di polimeri conduttori. Un tipico polimero utilizzato per tale scopo è l'osmio biperidile, che ha funzioni redox, legato alla polivinilpiridina; la struttura flessibile del polimero avvolge l'intero enzima e crea una rete tridimensionale elettrone-conduttrice, efficiente nel condurre il segnale elettronico [36]. Queste caratteristiche della terza generazione biosensori hanno portato allo sviluppo di dispositivi, impiantabili ad ago, per il monitoraggio continuo *in vivo* di glucosio nel sangue.

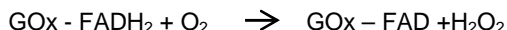
Principi generali di funzionamento dei Biosensori per la misura del glucosio

Un biosensore è un dispositivo analitico che incorpora un elemento di riconoscimento biologico (o di derivazione biologica) *integrato* o *intimamente associato* a un trasduttore di segnale chimico-fisico. Lo scopo del biosensore è di produrre un segnale digitale elettronico, discreto o continuo, proporzionale alla concentrazione di un singolo analita o gruppo di analiti. Il termine *biosensore* risale all'anno 1956, quando Leland Clark ne enunciò per primo il concetto. Agli inizi degli anni 1960, Clark e Lyons introdussero il principio di accoppiare la selettività data dall'elettrodo con la specificità caratteristica di un enzima, costruendo il primo elettrodo ad enzima per la misura del glucosio in soluzioni biologiche, utilizzando la glucosio ossidasi come elemento di riconoscimento biologico [26-37]. Generalmente, i biosensori sono stati classificati sia in base alla natura del mediatore biologico sia in funzione del tipo di trasduzione impiegata. Inizialmente, la componente biologica è quasi sempre stata rappresentata da un enzima. In seguito si è diversificata. Si è passato così ad utilizzare tessuti animali o vegetali, cellule intere o microrganismi, proteine come recettori, per finire ai giorni d'oggi con DNA, RNA e aptameri [38-39-40]. Generalmente, le misure di glucosio sono basate sulle interazioni con uno dei tre enzimi: esochinasi, glucosio ossidasi (GOX) o glicerolo deidrogenasi (GDH). Il saggio dell'esochinasi è il metodo di riferimento per la misurazione della glicemia mediante spettrofotometria in molti laboratori clinici. I biosensori per l' SMBG si basano generalmente su due famiglie di enzimi, GOX e GDH. queste enzimi differiscono in potenziali redox, cofattori, tasso di turnover e selettività per il glucosio [39].

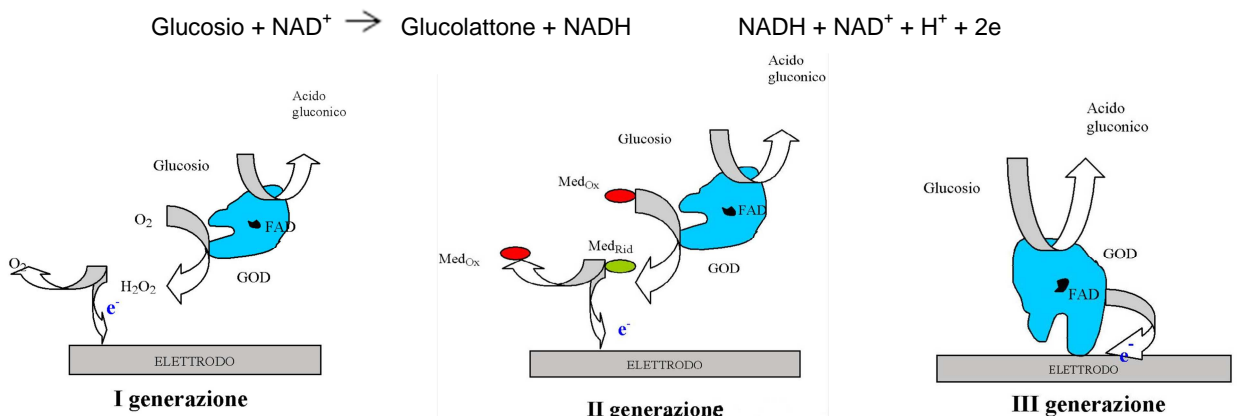
Il concetto di base del biosensore di glucosio si basa sul fatto che il GOX immobilizzato catalizza l'ossidazione del β -D-glucosio con l'ossigeno molecolare producendo acido gluconico e perossido di idrogeno [41]. Per lavorare come un catalizzatore, GOX richiede un cofattore redox- il FAD (flavina adenina dinucleotide). Il FAD funziona come accettore di elettroni iniziali e si riduce a FADH₂ [38].



Il cofattore viene rigenerato reagendo con l'ossigeno, portando alla formazione di perossidi di idrogeno.



Il perossido di idrogeno è ossidato ad un catalizzatore, di solito un anodo in platino (Pt). L'elettrodo riconosce il numero di trasferimenti di elettroni, e questo flusso misurato è proporzionale al numero di molecole di glucosio presenti nel sangue [42]. Tre strategie generali vengono utilizzate per la rilevazione elettrochimica del glucosio; misurando il consumo di ossigeno, misurando la quantità di perossido di idrogeno prodotto dalla reazione enzimatica o il ricorso a un mediatore diffusibile o immobilizzato per trasferire gli elettroni dal GOx all'elettrodo. Il numero di tipi di biosensori amperometrici basati sul GDH sono aumentati di recente: GDH-pirrolochinolino chinone (PQQ) e GDH-nicotinammide-adenina dinucleotide (NAD) [39]. Il GDH con NAD come cofattore produce NADH invece che H₂O₂. Il NAD è il principale accettore di elettroni nell'ossidazione del glucosio, durante il quale l'anello di nicotinammide di NAD⁺ accetta uno ione di idrogeno e due elettroni, equivalente a uno ione idruro. La forma ridotta di questo vettore generato in questa reazione è il NADH, che può essere ossidato elettrochimicamente [39].



1.3 Sistemi di monitoraggio continuo del glucosio (CGMS)

Sono attualmente in uso due tipi di sistemi di monitoraggio continuo del glucosio; uno sottocutaneo e uno nel sangue. Tuttavia, a causa sia della contaminazione della superficie degli elettrodi da parte di proteine e fattori della coagulazione sia del rischio di tromboembolie, la maggior parte dei CGMSs non misura la glicemia direttamente nel sangue.

Sono utilizzati, quindi, aghi-elettrodi impiantabili per via sottocutanea per la misurazione delle concentrazioni di glucosio nel fluido interstiziale, questi dati riflettono il livello di glucosio nel sangue [43-44].

Shichiri et al. hanno descritto il primo ago-elettrodo ad enzima per l'impianto sottocutaneo nel 1982 [45]. Il primo ago biosensore di glucosio è stato commercializzato da Minimed (Sylmar, CA, USA); tuttavia, non poteva fornire dati in tempo reale e i risultati del monitoraggio venivano scaricati in uno studio medico dopo 72 ore [46]. L'FDA ha approvato i dispositivi CGMS Guardian REAL-Time system della Medtronic (Minneapolis, MN, USA), SEVEN della Dexcom (San Diego, CA, USA) e Freestyle Navigator della Abbott (Abbott Park, IL, USA), che sono i più usati sul mercato e regolarmente approvati dall'FDA. Questi dispositivi visualizzano la glicemia, aggiornata in tempo reale, ogni 1-5 minuti. Il sensore usa e getta può essere utilizzato per 3-7 giorni [47]. Il monitoraggio continuo del glucosio sottocutaneo può essere ottenuto anche senza contatto diretto tra il liquido interstiziale e il trasduttore usando la tecnica della microdialisi [48]. Questo approccio fornisce sia maggiore precisione che accuratezza, e la deriva del segnale è inferiore ai dispositivi solo ad ago [49]. Tuttavia, i numerosi requisiti dei dispositivi CGMS *in vivo* includono biocompatibilità, calibrazione, stabilità a lungo termine, specificità, linearità e miniaturizzazione. La precisione di questi dispositivi innovativi è tuttavia inferiore a quella dei biosensori per il glucosio tradizionali, anche se possono esservi efficacemente associati in adulti e bambini con diabete di tipo 1 con un buon controllo glicemico [50].

1.4 Verifica e convalida delle prestazioni analitiche dei Biosensori per il glucosio

Gli attuali Biosensori in commercio come abbiamo visto sono facili da maneggiare, richiedono quantità minime di sangue, ed eseguono una rapida misurazione. La qualità della misura è però molto importante, può portare a una bassa accuratezza e a conseguenti ripercussioni sul controllo glicemico del paziente. Pertanto, sono stati stilati una serie di criteri per le prestazioni analitiche. Nel 1994, l'ADA rese disponibili le prime

linee guida per l'analisi delle prestazioni dei biosensori, suggerendo una soglia <10% come margine massimo consentito rispetto ai metodi di riferimento per le concentrazioni di glucosio comprese tra 1,6 e 22,2 mmol/L. Questo obiettivo analitico è stato ulteriormente ridotto al <5% nel 1996 [51]. Secondo le raccomandazioni dell' U.S. FDA, i sensori per il glucosio devono avere un errore inferiore al 20% per concentrazioni di glucosio tra 1,65 e 22 mmol / L rispetto alle misurazioni di laboratorio di riferimento. I criteri proposti dall'ISO (International Organization for Standardization) 15197:2003 sono suddivisi per i livelli di glicemia <75 o \geq 75 mg/dl. Inoltre, il 95% dei risultati sulle singole misure devono essere entro \pm 0,83 mmol/L (15 mg/dL) nelle procedure di misurazione del produttore a concentrazioni di glucosio <4,2 mmol /L (<75 mg/dL) ed entro \pm 20% per le concentrazioni di glucosio \geq 4,2 mmol/L (\geq 75 mg/ dL). Per la maggior parte dei dispositivi di monitoraggio del glucosio, le prestazioni analitiche devono essere convalidate da personale sanitario professionista in accordo con le linee guida del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Tuttavia, il comitato tecnico ISO / TC 212 ha pubblicato un protocollo per validare l'accuratezza e ripetibilità dei dispositivi di monitoraggio della glicemia da tre fino a cinque diversi livelli di glucosio nelle linee guida ISO 15197 [52]. Queste linee guida sottolineano la necessità di valutare i biosensori in situazioni di vita reale, e inoltre, le linee guida specificano i requisiti per sistemi di monitoraggio del glucosio *in vitro* che misurano le concentrazioni di glucosio nei campioni di sangue capillare e le procedure per la verifica e validazione delle prestazioni da parte degli utenti previsti [39].

1.5 Il monitoraggio non invasivo della glicemia

Il monitoraggio non invasivo della glicemia, per quanto concerne l'applicazione di principi scientifici che portino al progetto e allo sviluppo di un dispositivo che permetta al paziente di non dover subire il disagio di più punture al giorno per la misura diretta nel sangue, è attualmente una delle maggiori sfide tecnologiche dei nostri tempi,. Questa pratica tuttavia potrebbe essere realizzata solo attraverso la misurazione diretta dei tessuti del corpo, come pelle, cornea, mucosa orale, della lingua o della membrana timpanica [53]. Idealmente questo sensore per il glucosio dovrebbe essere in grado di rilevare deboli segnali di sangue attraverso i tessuti (ossa, grasso, pelle, muscoli, ecc) e in aggiunta, ricavare informazioni separate sul glucosio discriminandole da quelle di altri costituenti in maggiore concentrazione (proteine, urea, acido urico, emoglobina, acqua, ecc.). La misura potrebbe essere fatta mediante o un approccio diretto basato sulla struttura chimica della

molecola di glucosio, o indirettamente misurando gli effetti del glucosio nel sangue o nei tessuti su alcuni processi secondari, come ad esempio le variazioni di temperatura o di pH [54]. Indagini su approcci non invasivi sono state pubblicate utilizzando tecnologie come ionoforesi inversa, polarimetria, calore metabolico, ultrasuoni, emissione termica, elettromagnetica, fotoacustica, Raman, assorbimento della luce e spettroscopia di bioimpedenza. Parallelamente alla scelta della tecnica e della regione da usare come campione, si deve anche prestare attenzione a parametri dell'ambiente di misura. Per esempio, nel caso del monitoraggio transdermico, la sudorazione, il colore della pelle, la rugosità superficiale, lo spessore dei tessuti, i livelli di traspirazione, il flusso di sangue, i movimenti del corpo, temperatura dell'ambiente, durata della misura sono tutti fattori che potrebbero influenzare i risultati [55].

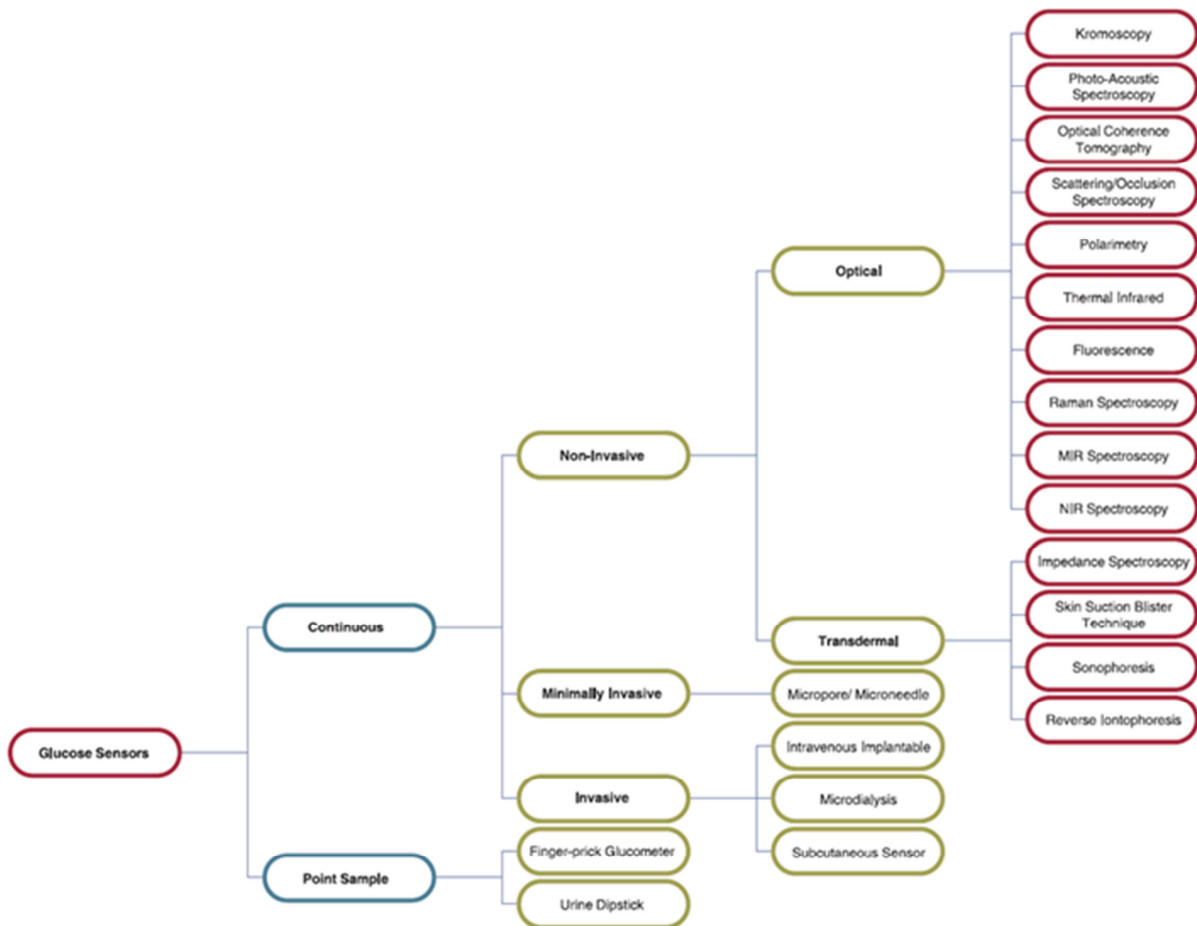


Figura 1: Tecnologie dei sensori per la misura di glucosio [56]

1.5.1 Spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR)

Principi

La spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) consiste nel concentrare sul corpo un fascio di luce con lunghezza d'onda di 750 -2500 nm. La spettroscopia IR è una tecnica analitica che si basa sull'interazione fra una radiazione elettromagnetica e la materia.

Più precisamente, però, questa è una spettroscopia di vibrazione ossia quando una molecola organica viene investita da una radiazione infrarossa la cui frequenza (espressa in termini di numeri d'onda, inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda) sia compresa fra 10.000 e 100 cm^{-1} , l'energia ceduta dalla radiazione stessa viene convertita in energia vibrazionale. Due sono i modi fondamentali in cui la molecola può vibrare: a) *vibrazione di stretching* (stiramento): dovuto a stiramento ritmico lungo l'asse di legame, b) *vibrazione di bending* (piegamento) dovuto a variazione dell'angolo di legame. Quando queste vibrazioni determinano una variazione del momento dipolare della molecola, allora si ha una vibrazione IR attiva, ossia la molecola, vibrando, produce un campo elettrico oscillante: ciò rende possibile lo scambio di energia con le onde elettromagnetiche.

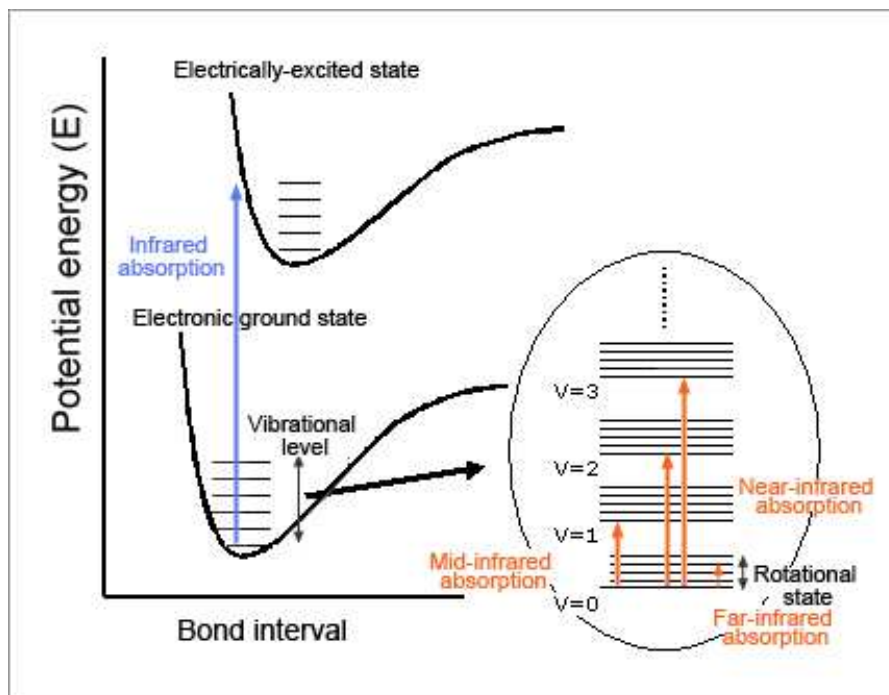


Figura 2: Relazione tra livello di energia molecolare e banda di assorbimento

La spettroscopia NIR permette misurazione del glucosio nei tessuti con 1 -100 mm di profondità, con una diminuzione della profondità di penetrazione per i valori di lunghezza d'onda crescente. La luce focalizzata sul il corpo è parzialmente assorbita e poi diffusa, a

causa della sua interazione con i componenti chimici presenti all'interno della tessuti. Attenuazione della luce nei tessuti viene descritta, secondo la teoria di trasporto leggero, dall'equazione:

$$I = I_0 e^{-\mu_{eff} d}$$

Dove I è l'intensità della luce riflessa, I_0 l'intensità della luce incidente, μ_{eff} l'effettivo coefficiente di attenuazione e d è la lunghezza del cammino ottico nel tessuto in esame [57-58]. D'altra parte, μ_{eff} può essere espressa come una funzione:

$$\mu_{eff} = f(\mu_a, \mu_s)$$

Dove μ_a è il coefficiente di assorbimento, e μ_s è il coefficiente di dispersione. Modifiche della concentrazione di glucosio possono influenzare μ_a di un tessuto attraverso variazioni di assorbimento corrispondenti allo spostamento di acqua o cambiamenti nel suo assorbimento intrinseco. Variazioni nella concentrazione di glucosio possono anche influenzare μ_s cioè l'intensità della luce dispersa dal tessuto. Questo coefficiente è funzione della densità dei centri di dispersione nel volume di tessuto esaminato, il diametro medio dei centri di dispersione, il loro indice di rifrazione e l'indice di rifrazione del fluido circostante. Nel caso del tessuto cutaneo, le fibre del tessuto connettivo sono i centri di dispersione e gli eritrociti sono i centri di dispersione nel sangue. In sintesi, la concentrazione di glucosio potrebbe essere stimata come variazioni di intensità della luce sia trasmessa che riflessa attraverso un tessuto contenete [59].

Limitazioni

Il coefficiente di assorbimento del glucosio nel NIR è basso ed è molto più piccolo di quello dell'acqua in virtù della grande disparità nelle rispettive concentrazioni. Così, nel NIR le bande dello spettro del glucosio sono deboli e si sovrappongono con le bande più forti dell' acqua, ma anche di emoglobina, proteine e grassi. Per quanto riguarda il coefficiente di dispersione, l'effetto di un soluto (Come il glucosio) non è specifico per l'indice di rifrazione di un mezzo, quindi è simile a quello di altri analiti. Infine, variazioni di parametri chimico-fisici, come la pressione sanguigna, la temperatura del corpo, l'idratazione della pelle, la concentrazione di trigliceridi e albumina può interferire con la misurazione del glucosio [60]. Gli errori possono verificarsi anche a causa di variazioni ambientali, come i cambiamenti di temperatura, umidità, anidride carbonica e pressione atmosferica. Anche le sole variazioni di glucosio possono introdurre altri fattori confondenti: per esempio, è stato dimostrato che l'iperglicemia, così come l'iperinsulinemia possono indurre

vasodilatazioni, che si traducono in un aumento della perfusione [61-62]. Questo fenomeno aumenta l'assorbimento della luce, e, quindi, di conseguenza può portare ad errori nella stima della concentrazione se non preso in considerazione e opportunamente corretto. Anche l'iperglicemia può avere effetti sulla proprietà strutturali della pelle, i soggetti diabetici, infatti, possono mostrare inspessimenti e pigmentazioni anomale (gialle), probabilmente a causa all'invecchiamento accelerato del collagene e dello sfilacciamento fibre elastiche [63-64]. Così, la luce riflessa dalla pelle dei soggetti diabetici può avere intensità diversa rispetto ai soggetti sani con pari livello di glicemia. Anche le proprietà termiche della pelle sono risultate diverse in soggetti con iperglicemia, con ripercussioni sulla riflessione della luce localizzata [65]. L'iperglicemia può anche causare differenze nell'indice di rifrazione dei globuli rossi, determinando in tal modo una diversa dispersione della luce [66-67]. Un altro fattore confondente è dovuto al fatto che le misure nel NIR spesso riflettono la somma della concentrazione di glucosio in compartimenti corporei diversi, cioè, non solo del sangue ma anche del liquido interstiziale e di altri tessuti [59].

Siti possibili di misura

La trasmissione e la riflessione della luce NIR è stata studiata attraverso il lobo dell'orecchio, la membrana interdigitale e il tessuto del dito, la pelle dell'avambraccio, la mucosa delle labbra, la mucosa orale, la lingua, il setto nasale, la guancia, il braccio. Misure NIR di riflettanza diffusa effettuate sul dito hanno mostrato una correlazione con la glicemia, ma le misure si sono rivelate spesso poco accurate per essere clinicamente accettabili [60]. La riflettanza diffusa misurata all'interno del labbro ha mostrato anch'essa una buona correlazione con il glucosio nel sangue anche se con un ritardo di alcuni minuti tra i livelli di glucosio e il segnale di misura [68]. L'analisi della saliva (un componente della misura sul labbro) non ha dato risultati. Queste posizioni sono state selezionate per alcuni vantaggi, come ad esempio l'alta vascolarizzazione, poco tessuto adiposo, composizione omogenea, variazioni di temperatura limitate. Secondo il sito in esame, sono stati considerati alcuni specifici intervalli nella banda NIR e la scelta di un sito specifico ha anche influenzato il tipo di luce utilizzata, cioè trasmessa o riflessa (localizzata o diffusa), o entrambi [59].

1.5 2 Spettroscopia nel medio infrarosso (Mid-IR)

Principi

La Spettroscopia nel medio infrarosso (Mid-IR) si basa sulla luce emessa nello spettro a 2500-10,000 nm. Il principio fisico è simile a quello della spettroscopia nel NIR. Rispetto al NIR, tuttavia, a causa della lunghezza d'onda maggiore, nel Mid-IR si apprezza una diminuzione dei fenomeni di diffusione, parallelamente ad un aumento di quelli di assorbimento. Per questo motivo, la penetrazione della luce nel tessuto può raggiungere solo pochi micrometri [69]: nel caso della pelle umana, questo corrisponde allo strato corneo. Quindi, solo il riflesso della luce diffusa può essere presa in esame: non c'è luce trasmessa attraverso il segmento del corpo. D'altra parte, un possibile vantaggio del Mid-IR rispetto al NIR è che nel Mid-IR le bande prodotte dal glucosio, così come di altri composti, sono più nette di quelli del NIR, che sono spesso larghe e deboli [59].

Limitazioni

Un forte limite è sicuramente la scarsa capacità di penetrazione. Inoltre, il Mid-IR è affetto da problemi e fattori confondenti simili a quelli del NIR, nonostante le bande glucosio potenzialmente migliorate. Per esempio, alcuni studi hanno dimostrato dipendenza significativa dello spettro Mid-IR della pelle dal suo contenuto d'acqua [69].

Siti possibili di misura

Il Mid-IR è una tecnica meno studiata rispetto al NIR per la misurazione del glucosio, probabilmente a causa della forte limitazione in penetrazione. Gli studi sono riportati relativamente alla pelle delle dita e della mucosa orale [70].

1.5.3 Tomografie Ottica a Radiazione Coerente

Principi

La tomografia ottica a radiazione coerente (OCT) è basata sull'uso di una luce a bassa coerenza, come quella emessa da un diodo superluminescente, un interferometro con un braccio di riferimento e uno per il campione, uno specchio mobile sul braccio di riferimento e un fotorecettore per misurare il segnale interferometrico. La tecnologia di *imaging* OCT è simile agli ultrasuoni e utilizza la luce infrarossa vicina alla parte visibile (*near infrared*) riflessa per generare un'immagine, invece che il suono riflesso. La sorgente *near infrared* (di norma 800-1300 nanometri) è divisa in due percorsi. Un percorso viene applicato al tessuto campione, l'altro allo specchio di riferimento. L'interferometria viene utilizzata per

un controllo coerente dei riflessi diffusi dal tessuto campione con la luce proveniente dal braccio di riferimento mentre il tessuto del braccio campione viene scansionato.

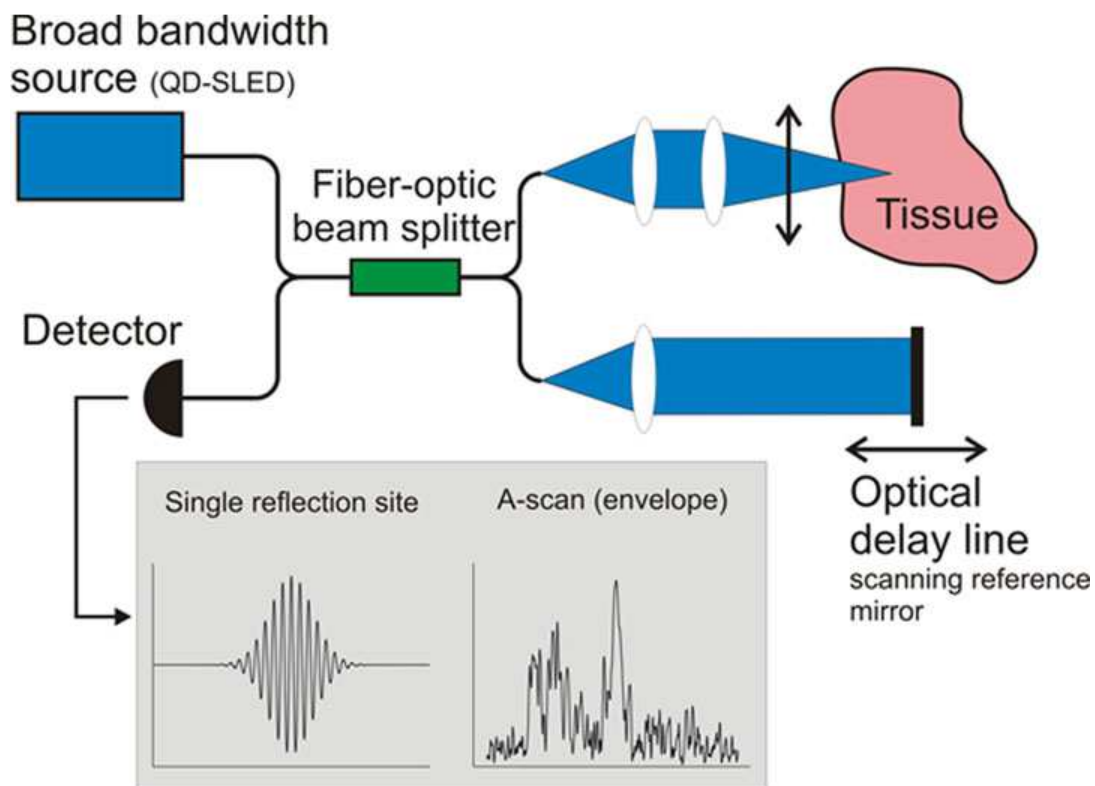


Figura 3: schema di funzionamento generico dell'OCT

Gli algoritmi di elaborazione dei segnali vengono eseguiti sulla luce controllata coerentemente per ottenere una scansione assiale a risoluzione profonda. Uno *stacking* di queste scansioni produce immagini 2D o 3D del tessuto [71]. L'OCT può di norma produrre un'immagine a una profondità di tessuto tra 3 e cinque millimetri con un'altissima risoluzione inferiore ai 10 micron. Un componente essenziale dei sistemi OCT è lo specchio di riferimento che nei sistemi di prima generazione era meccanico: conseguentemente, le macchine risultavano essere lente e la risoluzione delle immagini limitata; invece, sistemi OCT di seconda generazione hanno sostituito lo specchio meccanico di riferimento con uno specchio fisso, impiegando uno spettrometro e potenti tecniche di elaborazione dei segnali come le trasformate di Fourier veloci, la commutazione di ampiezza e la compressione del registro per risolvere le informazioni di profondità e combinarle con i dati della scansione laterale in tempo reale. Le proprietà di dispersione del tessuto sono altamente dipendenti dalla rapporto tra l'indice di rifrazione dei centri di diffusione (componenti cellulari, proteine, ecc) e quello del fluido interstiziale.

Un aumento della concentrazione di glucosio nel liquido interstiziale provoca un aumento del suo indice di rifrazione, determinando così una diminuzione del coefficiente di dispersione. Pertanto, a partire dai dati di OCT, generati dal luce retrodiffusa, è possibile ottenere una stima della concentrazione di glucosio nel fluido interstiziale [72].

Limitazioni

La tecnica OCT può essere sensibile agli artefatti di movimento. Inoltre, anche se piccoli cambiamenti nella temperatura della pelle hanno effetti trascurabili, cambiamenti di parecchi gradi hanno una significativa influenza sul segnale. Infine, come già detto, attualmente non vi è una chiara indicazione che questa tecnica presenti vantaggi rispetto alle altre tecniche basate sulla dispersione [72].

Siti di misura

Il sito per la misurazione è la pelle, tipicamente l'avambraccio. Più in particolare, la concentrazione di glucosio nel liquido interstiziale del derma superficiale della pelle [59].

1.5.4 Riflettanza localizzata temperatura-mediata

Principi

Anche questa tecnica si articola nel campo della dispersione della luce. Si basa sull'osservazione che variazioni di temperatura provocano variazioni dell'indice di rifrazione dei tessuti (che influenza la dispersione della luce), ma l'entità di questi cambiamenti dipende anche dalla concentrazione di glucosio [73], la quale è stimata con i segnali di riflettanza localizzati a 590 e 935 nm. In alcuni studi, una sonda è stata posta in contatto con la pelle e la temperatura della sonda è stata variata tra 22 e 38 8C. Dopo ogni variazione la pelle è stata riequilibrata per qualche minuto. Durante ciascuno di questi intervalli alcuni pacchetti-luce sono stati raccolti, e messi in relazione alla concentrazione di glucosio [74].

Limitazioni

Diversi parametri possono influenzare questo tipo di misure, sia fisiologici e tecnici (come la posizione della sonda). Anche uno stato di salute particolare, come ad esempio un stato infiammatorio con possibile febbre, può in infatti influenzare la misura [59].

Siti di misura

Le misure vengono di solito effettuate sulla pelle dell'avambraccio. In particolare è stimato in questo modo il glucosio nello strato del derma [59].

1.5.5 Spettroscopia Raman

Principi

La spettroscopia Raman è basata sull'uso di un luce laser, nel campo visibile, del vicino infrarosso o nel vicino ultravioletto, per indurre oscillazione e la rotazione in molecole di una soluzione. In questo modo è possibile infatti eccitare i livelli energetici vibro-rotazionali delle molecole, osservando nel relativo spettro transizioni che sottostanno alla regola di selezione $\Delta J=0, \pm 2$ per vibro-rotori lineari e $\Delta J=0, \pm 1, \pm 2$ per vibro-rotori simmetrici. [73-60]. L'emissione di luce diffusa è influenzata da questa vibrazione molecolare, che dipende dalla concentrazione dei soluti nella soluzione. Pertanto, è possibile ricavare una stima della concentrazione di glucosio nei fluidi umani in cui il glucosio è presente. Lo Spettro Raman è di solito considerato nell'intervallo 200-1800 cm^{-1} [75]. Nella banda in esame lo spettro Raman del glucosio è chiaramente differenziabile da quello di altri composti. La spettroscopia Raman di solito fornisce spettri più nitidi e meno sovrapposti a confronto, per esempio, con quelli NIR. Altri vantaggi sono le modeste interferenze di fenomeni di luminescenza e fluorescenza, oltre alla possibilità di usare il laser a lunghezza d'onda fissa relativamente a basso costo [59]. La spettroscopia Raman è stata utilizzata anche *in vivo* nei ratti con l'impianto di nanoparticelle di metallo [76]. Prove *in vitro* hanno dimostrato rilevamenti clinicamente accettabili di glucosio in soluzione, in presenza di urea, acido ascorbico e lattato [77]. In piccoli studi clinici, è stata trovata una buona correlazione ($r = 0,91$) [78].

Limitazioni

Le principali limitazioni sono legate all'instabilità della lunghezza d'onda, all'intensità del laser e ai lunghi tempi per l'acquisizione dello spettro. Inoltre, analogamente ad altre tecniche descritte prima, rimane il problema delle interferenze di altri composti [58].

Siti di misura

L'occhio è il sito più comune. La luce laser passa tangenzialmente attraverso la parte anteriore dell'occhio, un altro sito possibile è la pelle, anche se sono presenti più composti confondenti, come i lipidi [79].

1.5.6 Polarimetria

Principi

Si basa sul fenomeno che avviene quando la luce polarizzata attraversa una soluzione contenente soluti otticamente attivi, come le molecole chirali, capaci di deviare il piano

della luce polarizzata, linearmente attraverso questa reazione è possibile risalire alla concentrazione delle sostanze otticamente attive presenti in soluzione. Il glucosio è una molecola chirale e le sue proprietà ottiche sono note da molto tempo. Infatti, la misura dei cambiamenti indotti dalla polarizzazione del glucosio è stata la prima tecnica proposta per la misurazione non invasiva del glucosio negli esseri umani [80]. Un vantaggio di questa tecnica è che può fare uso di luce visibile, facilmente reperibile. Inoltre la componentistica ottica può essere facilmente miniaturizzata [81].

Limitazioni

Questa tecnica è sensibile alle proprietà di diffusione del tessuto poiché la dispersione depolarizza la luce. Da questo si conclude che la pelle può essere difficilmente indagata con la polarimetria, poiché mostra alte proprietà di diffusione, in particolare a causa dello strato corneo [81]. Inoltre, la specificità di questa tecnica è scarsa, dato che alcuni composti otticamente attivi sono presenti in fluidi umani contenenti anche glucosio, come ascorbato e albumina. Tuttavia, la specificità può essere parzialmente migliorata utilizzando lunghezze d'onda multiple. Altre fonti di errore più generali sono variazioni di temperatura e pH della soluzione [82].

Siti di misura

Il luogo di misura privilegiato per questa tecnica è l'occhio, e, più specificamente, l'umore acqueo sotto la cornea [83]. Quest'ultima, infatti, ha delle proprietà di diffusione molto basse, dal momento che non possiede lo strato corneo. Tuttavia, alcune fonti di errori sono dovute ai movimenti dell'occhio e alle rotazioni corneali [84]. La birifrangenza corneale, grazie alla sua struttura di collagene, è un'altra fonte di errore. Infine è stato osservato, un ritardo tra la concentrazione di glucosio nell'umore acqueo e quella nel sangue [85].

1.5.7 Ultrasuoni

Principi

La tecnologia più utilizzata basata sugli ultrasuoni è la spettroscopia fotoacustica, che si basa sull'uso di una luce laser per l'eccitazione di un fluido, per poi poter analizzare la conseguente risposta acustica [60]. Il fluido è eccitato da un breve impulso laser (pico o nanosecondi), con una lunghezza d'onda specifica per essere assorbita da una particolare specie molecolare presente nel fluido. L'assorbimento della luce causa un microscopico riscaldamento localizzato nel mezzo, che genera un'onda ultrasonica che verrà rilevata da

un microfono. In un mezzo chiaro (cioè otticamente sottile), il segnale fotoacustico è in funzione dell'energia della luce laser, del coefficiente volumetrico di espansione termica, della velocità del suono nel fluido, il calore specifico e il coefficiente di assorbimento della luce [84]. Questa tecnica può fornire maggiore sensibilità nella determinazione di glucosio rispetto ad altre tecniche spettroscopiche più tradizionali e questo è dovuto alla relativamente scarsa risposta fotoacustica dell'acqua, che rende più facile la determinazione di alcuni composti, come ad esempio glucosio e idrocarburi [36]. Le lunghezze d'onda della luce laser che possono essere utilizzate variano in un ampio intervallo (dai raggi ultravioletti a NIR). Un possibile approccio è l'uso di un trasduttore ultrasonico per individuare un bolo di sangue in un vaso e poi illuminarlo con l'impulso laser alla lunghezza d'onda di assorbimento del glucosio. Il trasduttore ad ultrasuoni rileva inoltre il segnale fotoacustico generato. Un altro approccio è la rilevazione del segnale ad ultrasuoni riflesso da un vaso sanguigno prima e dopo l'eccitazione fotoacustica. Il glucosio è poi determinato dalla differenza nell'intensità degli ultrasuoni riflessi. Un terzo approccio è eccitare un bolo di sangue tramite effetto fotoacustico: il cambiamento nelle dimensioni e velocità del bolo eccitati provoca un effetto Doppler in un fascio ultrasonico diretto verso il vaso sanguigno, il glucosio è determinato dalla grandezza e dal ritardo del picco di ultrasuoni dell'effetto Doppler [86-59].

Limitazioni

La tecnica è sensibile alle interferenze chimiche da parte di alcuni composti biologici e alle interferenze fisiche da variazioni di temperatura e pressione. Inoltre, quando la luce laser attraversa un mezzo denso, il contributo al segnale fotoacustico è dovuto non solo al coefficiente di assorbimento, ma anche al coefficiente di dispersione, in questo modo si possono verificare effetti confondenti da prendere in considerazione per eventuali correzioni. Infatti, lo spettro fotoacustico di un mezzo denso è più simile allo spettro della riflettanza piuttosto che a quello di assorbimento. D'altra parte, la dispersione può migliorare il segnale, e quindi fornire un vantaggio se adeguatamente presa in considerazione. Di contro un grosso svantaggio tecnologico è dato dal fatto che la strumentazione è ancora fatta su misura, costosa e molto sensibile ai parametri ambientali [59-87].

Siti di misura

Anche in questo caso un sito possibile per la misurazione è l'occhio, soprattutto la sclera. Altri siti sono le dita e l'avambraccio, con il contributo di determinazione del glucosio da parte dei vasi sanguigni della cute e dei tessuti insieme o separatamente [86].

1.5.8 Fluorescenza

Principi

Questa tecnica si basa sulla generazione di fluorescenza dei tessuti umani quando sono eccitati dalla luce a frequenze specifiche. Nel caso del glucosio, uno studio ha dimostrato che quando una soluzione di glucosio è eccitata da una luce laser ultravioletta a 308 nm, la fluorescenza può essere rilevata a 340, 380, 400 nm, con un massimo a 380 nm [59]. È stato dimostrato che l'intensità della fluorescenza dipende dalla concentrazione di glucosio nella soluzione. Anche la luce nello spettro visibile può essere utilizzata, ma è più adeguata allo studio della fluorescenza dei tessuti piuttosto che nelle soluzioni [57].

Limitazioni

Nei tessuti, l'uso di luce ultravioletta potrebbe portare a fenomeni di dispersione molto forti, oltre alla fluorescenza ricercata. Inoltre, anche quando si usano diverse lunghezze d'onda, il fenomeno della fluorescenza può non dipendere solo dal glucosio, ma da diversi parametri, come la pigmentazione della pelle, l'arrossamento, dallo spessore epidermico [88].

Siti di misura

Le stime della concentrazione di glucosio sono state testate sulla pelle mediante una brevettata tecnica a fluorescenza con luce blu [59].

1.5.9 Spettroscopia Termica

Principi

Questa tecnologia comprende diverse approcci. In spettroscopia a gradiente termico, è vagliato l'effetto di assorbimento del glucosio sulla radiazione infrarossa naturalmente emessa dal corpo [57]. Questo effetto di assorbimento del glucosio è ovviamente legato alla sua concentrazione. In alcuni studi, la pelle è stata raffreddata fino a circa 10 °C per ridurre, fino a sopprimerli, i suoi effetti di assorbimento [65].

Limitazioni

Ogni variazione di temperatura del corpo o del tessuto si rivela essere un forte effetto confondente. Diversi fattori possono indurre variazioni di temperatura, sia fisiologici (come la periodicità circadiana) che patologici (per esempio, uno stato febbrile) [74].

Siti di misura

Un sito tradizionale di questa tecnica è la pelle dell'avambraccio o il dito. Tuttavia, un altro sito possibile potrebbe essere l'orecchio: un sensore potrebbe essere inserito nel condotto uditivo per misurare la radiazione IR emessa dalla membrana timpanica [59].

1.5.10 Spettroscopia oculare

Principi

Questa tecnica si basa sull'uso di speciali lenti a contatto, alle quali è stato aggiunto uno speciale idrogel. Con la tecnica descritta in [89], è stato legato alla lente uno strato di idrogel con 7 μm di spessore sulla base di derivati dell'acido boronico. Alcuni derivati dell'acido boronico sono in grado di creare legami covalenti reversibili con glucosio, e il fenomeno è influenzato dalla concentrazione di glucosio nelle lacrime. Quando la lente è illuminata da una sorgente luminosa (una luce laser ad esempio), la luce riflessa cambia la sua lunghezza d'onda a seconda delle caratteristiche dei fenomeni di legame che si creano e che sono dipendenti alla concentrazione di glucosio. I cambiamenti di colore della luce possono essere così rilevati da un spettrometro.

Limitazioni

C'è un ritardo tra le variazioni di glucosio nel sangue e nelle lacrime. Inoltre, l'uso di lenti a contatto, anche se può essere considerato un approccio non invasivo, può essere scomodo per alcuni soggetti.

Siti di misura

Il sito è chiaramente solo l'occhio.

1.5.11 Spettroscopia di impedenza.

Principi

La Spettroscopia di impedenza è lo studio dell'interazione tra radiazione elettromagnetica e materia in funzione della lunghezza d'onda (λ). La spettroscopia ad impedenza può essere utilizzata per investigare le dinamiche della carica di legame o mobile nella massa nonché nelle regioni interfacciali di tutti i tipi di materiali solidi o liquidi di natura ionica,

semiconduttrice o isolante che siano [90]. l'impedenza di un tessuto può essere misurata da un flusso di corrente di intensità conosciuta attraverso di esso. Se l'esperimento viene ripetuto con correnti alternate a diverse lunghezze d'onda, si ottiene lo spettro di impedenza. Lo spettro dielettrico è misurato nella gamma di frequenza da 100 Hz a 100 MHz. Variazioni nella concentrazione di glucosio plasmatico inducono una diminuzione della concentrazione di ioni di sodio, e un aumento della concentrazione di ioni di potassio nel torrente sanguigno [91].

Limitazioni

Alcuni problemi rimangono ancora da chiarire, come l'effetto del contenuto d'acqua del corpo la disidratazione e l'effetto dei flussi osmolari che caratterizzano i tessuti [91-92]. Inoltre, alcune malattie che colpiscono le membrane cellulari possono avere un'influenza che deve essere valutata [59].

Siti di misura

Lo studio più noto è stato eseguito con un dispositivo simile ad un orologio, posizionato sul polso [93].

1.5.12 Rilevamento Elettromagnetico

Principi

Analogamente alla spettroscopia di impedenza, questa tecnica si basa sulle proprietà dielettriche del sangue. Tuttavia, nella prima viene utilizzata una corrente elettrica, mentre nella seconda è sfruttato l'accoppiamento elettromagnetico tra due induttori [94]. Gli induttori sono attivati in tutto il mezzo in fase di studio: in un contesto in vitro, il sistema può essere descritto dal disegno riportato in fig.4 dove i tubi simulano i vasi sanguigni.

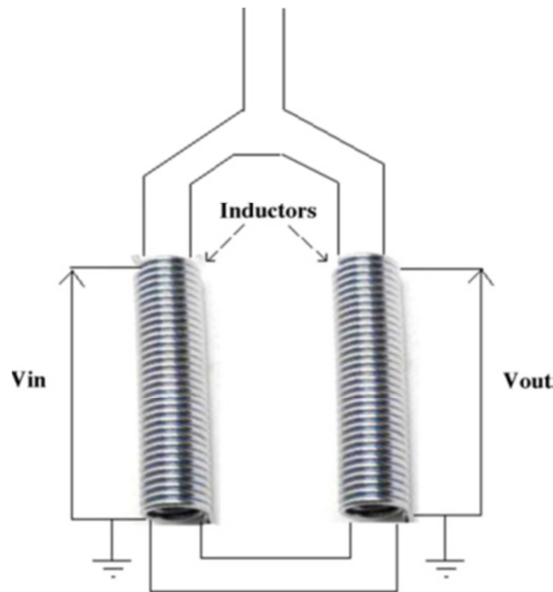


Fig.4 Schema degli induttori usati nella rilevazione elettromagnetica [59]

Per rendere l'esperimento più realistico, i tubi possono essere coperti da gelatina, che simula (anche se con scarsa precisione) i tessuti circostanti vasi sanguigni in un contesto *in vivo* [95]. L'accoppiamento elettromagnetico dei due induttori viene modificato dalle variazioni nei parametri dielettrici della soluzione in esame. Tali parametri sono influenzati dal glucosio, per cui una stima della sua concentrazione può essere ricavata in questo modo, il metodo si basa sull'applicazione di un segnale di tensione, V_{in} , con una determinata frequenza, all'induttore principale. Per creare l'accoppiamento elettromagnetico, un segnale, V_{out} , è generato all'induttore secondario. Il rapporto $V_{out_{RMS}} / V_{in_{RMS}}$, dove RMS indica il valore effettivo, dipende dalla concentrazione di glucosio. Le frequenze utilizzate in questa tecnica sono nel range dei 2,4-2,9 Mhz. Tuttavia, a seconda della temperatura dei mezzi indagati, esiste una frequenza ottimale, dove la sensibilità alle variazioni del glucosio raggiunge il massimo. Per esempio, a 24 °C la frequenza ottimale è di 2,664 MHz [94].

Limitazioni

La temperatura ha un effetto importante sulla misura, dal momento che influenza anche la frequenza ottimale di indagine. La misurazione della temperatura è sempre da eseguire e le informazioni tenute debitamente in conto. Inoltre, i parametri dielettrici del sangue dipendono da diversi componenti diversi dal glucosio [96].

Siti di misura

Al momento, non ci sono studi su pazienti con questa tecnica.

1.5.13 Sonoforesi

Principi

Questa tecnica si basa sull'uso degli ultrasuoni per creare un *array* di microscopici fori (micropori) sulla cute umana. Il fluido interstiziale, contenente glucosio, tende a migrare attraverso i micropori verso un sensore di glucosio (di tipo tradizionale), posto a contatto con la pelle in corrispondenza della sede di creazione dei micropori, in questo modo è possibile la misurazione diretta del glucosio [97].

Limitazioni

Nessuna limitazione o fattori di confondimento sono state descritti, salvo la possibile mancata corrispondenza tra il glucosio nel fluido interstiziale e quello nel sangue.

Siti di misura

La pelle e più in particolare il braccio.

1.5. 14 Ionoforesi

Principi

La Ionoforesi (o, più correttamente, ionoforesi inversa) si basa sul flusso di una bassa corrente elettrica attraverso la pelle, tra un anodo e un catodo posti sulla superficie della pelle. Un potenziale elettrico viene così applicato tra l'anodo e catodo, causando la migrazione degli ioni sodio e cloro da sotto la pelle verso il catodo e l'anodo, rispettivamente [98]. Nello specifico, sono gli ioni di sodio che principalmente migrando generano la corrente [99]. Molecole non cariche, come ad esempio il glucosio, vengono trasportate con gli ioni tramite un flusso convettivo (elettroosmosi). Questo flusso trasporta il glucosio interstiziale attraverso la pelle, fino al catodo, dove un sensore tradizionale effettua la misura diretta. Nel *range* tipico della densità di corrente ionoforetica ($<0,5 \text{ mA/cm}^2$), l'estrazione del glucosio è circa in relazione lineare con la densità e la durata della corrente ionoforetica.

Limitazioni

Lo svantaggio principale di questa tecnica è che essa tende a causare irritazione cutanea. Questo problema può essere evitato limitando l'intervallo di tempo del potenziale elettrico di applicazione. D'altra parte, la durata minima è necessaria per ottenere una sufficiente quantità di glucosio per misura. Inoltre, quest'approccio non può essere utilizzato se il soggetto sta sudando in modo significativo. C'è anche la discussione sul fatto che questa

tecnologia può essere in grado di rilevare i cambiamenti rapidi di glucosio nel sangue. Questo è, in realtà, un problema generale di qualsiasi misura di glucosio non nel sangue.

Siti di misura

La misura può essere ottenuta con un dispositivo simile ad un orologio posto sul polso.

1.5.15 Microonde

I processi che portano all'emissione e all'assorbimento sono vari e di natura diversa, ma, come visto finora ciascuno di essi può essere associato ad una radiazione avente un suo tipico intervallo di frequenza. Con una radiazione nel campo delle microonde, vengono modificate solo le energie rotazionali di una molecola e si possono così determinare i valori permessi delle energie rotazionali. La concentrazione di glucosio viene misurata con un sensore che si basa su un risonatore dielettrico a microonde con un. Il sensore usato consiste in un risonatore dielettrico accoppiato con una *microstrip*. I cambiamenti di permittività della soluzione di glucosio a causa della variazione di concentrazione dello stesso sono stati indagati attraverso la misurazione del coefficiente di riflessione S_{11} del risonatore. Il cambiamento della concentrazione di glucosio è direttamente correlata alla variazione del coefficiente di riflessione a causa della una interazione elettromagnetica tra il risonatore dielettrico e la soluzione di glucosio. E' possibile determinare la concentrazione di glucosio con una risoluzione minima di 5mg/dl nell'intervallo di concentrazione 100-600mg/dl a frequenze di funzionamento di circa 7.65GHz (per la soluzione di acqua e glucosio) e 7.77GHz (per i campioni di sangue di maiale). [100-101].

Limiti

Al momento la soluzione con le microonde è ancora poco esplorata, ma sembra molto promettente, forse altri zuccheri presenti nel sangue o nei fluidi interstiziali con energie rotazionali vicine al glucosio potrebbero dare un segnale di disturbo.

Siti di misura

Probabilmente le dita il lobo dell'orecchio o le labbra.

Studi applicativi e tecnologici con ognuna delle tecnologie sopradescritte continuano in pubblicazioni e brevetti a livello internazionale affiancati a nuovi approcci più pionieristici come l'analisi dei livelli di acetone nell'aria espirata, che sembra secondo gli autori avere una diretta corrispondenza con i livelli di glucosio nel sangue [102] . La via che molti gruppi di ricerca stanno percorrendo è quella del sensore multi tecnologico, ossia

l'applicazione di più tecnologie contemporaneamente, filtrando e interpretando i diversi risultati. Il vantaggio di questo approccio, che dai primi dati sembra promettente, porta con sé però il rischio di aumentare il rumore di fondo dato dalla somma degli eventuali errori derivanti dalle diverse tipologie di misura [103-104].

1.6 Dispositivi e prototipi per il monitoraggio non-invasivo.

Lo sviluppo di un metodo affidabile per il monitoraggio non invasivo della glicemia sarebbe di enorme impatto medico e sociale nella gestione del diabete. Questo è un argomento di grande interesse e in rapida evoluzione.

Alcuni dispositivi sono arrivati sul mercato, ma nessuno vi è rimasto abbastanza a lungo.

Il Diasensor, (BICO Inc) usa la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) e opera mettendo l'avambraccio del paziente sul vassoio del contatore. Le dimensioni dell'apparecchio sono rilevanti rispetto ad altri concorrenti, ma è ancora sufficientemente compatta per poter essere utilizzato in un ambiente domiciliare; il test del glucosio si ottiene in meno di 2 minuti. Tuttavia, non è utilizzabile come un sostituto per le misure: il suo scopo è quello di promuovere una maggiore attenzione per l'auto-monitoraggio, consentendo ai pazienti di eseguire la maggior parte dei loro monitoraggi quotidiano della glicemia con un misuratore non invasivo. Il Diasensor è stato commercializzato ad un prezzo di circa US \$9.000 (tra il 1998 e il 1999). Dal sito Web della società il Diasensor attualmente sembra non essere più in vendita [105].

Il Pendra (Pendragon Medical Ltd) si basa sulla spettroscopia d'impedenza. La forma è simile a un orologio da polso: l'apparecchio misura come i cambiamenti nella composizione del sangue influenzano i flussi d'impedenza della cute e dei tessuti sottostanti, questo avviene grazie a un circuito risonante aperto, che si trova a contatto con la pelle. Questo circuito genera piccole correnti in una specifica gamma di frequenze ed esegue la misurazione dell'impedenza. La sensibilità indicata è nel range di 20-60 mg / dL di glucosio per Ohm. Alcuni test clinici sono stati eseguiti su soggetti diabetici e non. Il Pendra è stato commercializzato in Europa nel settembre 2004, ad un prezzo di circa 2.500 euro. Tuttavia, pochi mesi dopo, la commercializzazione è stata interrotta perché c'erano ancora preoccupazioni circa le prestazioni effettive del contatore: un studio post-marketing ha mostrato un coefficiente di correlazione tra le misure Pendra e dei glucometri tradizionali pari solo al 35%. Nel febbraio 2005, l'impresa ha dichiarato fallimento. Recentemente si è affacciata sul mercato una nuova società, Solianis Monitoring AG, che

sembra continuare la precedente linea di approccio, anche se al momento nessun nuovo dispositivo è stato lanciato sul mercato [105].

Il GlucoWatch, (Cygnus Inc.) usa la ionoforesi inversa è anch'esso in un formato simil orologio da polso. Si misura il glucosio attraverso la pelle usando un tampone monouso, sul retro dello strumento. Si utilizza un adesivo da attaccare alla pelle permettendole di entrare in contatto con una piccola corrente elettrica, che permette la ionoforesi inversa, così da poter stimare i livelli di glucosio nel fluido interstiziale. Rispetto allo stik le misure del GlucoWatch sono 15 minuti in ritardo. Lo strumento è nato per essere utilizzato per integrare ma non sostituire le informazioni ottenute dai metodi invasivi standard. Diversi studi sono stati effettuati documentati in riviste scientifiche. Per motivi di brevità riportiamo un paio di riferimenti solo [106, 107]. L'apparecchio ha palesato però diversi limiti e le misure potrebbero non dare risultati o essere imprecise in particolari condizioni: sudorazione, sbalzi di temperatura, movimento eccessivo del sensore, esercizio fisico. Infine, la maggior parte degli utilizzatori ha riferito che la scarica elettrica che serve alla misura è abbastanza evidente durante il primo utilizzo del sensore, anche se diventa meno fastidiosa al successivo utilizzo. Dopo le approvazioni, lo strumento è stato venduto negli Stati Uniti (a un prezzo di circa US \$ 700). Tuttavia, nel 2005 Cygnus è andata fuori mercato e ha venduto tutte le sue attività ad un'altra società, Animas Corporation. Questa società ha iniziato la commercializzazione del GlucoWatch in Europa, ma successivamente nel 2007 l'ha interrotta con la promessa dello sviluppo di nuovi dispositivi [104].

Esistono allo stato attuale, alcuni prototipi che stando alle dichiarazioni delle ditte sviluppatrici sembrano promettenti anche se ancora non sul mercato, i prototipi elencati di seguito sono stati oggetto di sperimentazione clinica su esseri umani (compresi i pazienti diabetici), documentati in riviste scientifiche *peer reviewed* e (indicizzate su PubMed) negli ultimi anni (2007 -2012).

TANGTEST Blood Glucose Meter- basato su tecnologia ottica [109], RIGMD-basato sulla ionoforesi inversa [110], Aprise-basato sulla tecnologia fotoacustica [111], Sentris-100 basato sulla tomografia ottica a radiazione coerente [112], Multisensor system-proprietà ottiche e dielettriche combinate [113] NBM-OrSense basato su spettroscopia di occlusione [114]. Negli studi clinici riportati in letteratura, questi prototipi in genere hanno mostrato buone prestazioni in termini di precisione nella misurazione della glicemia, con una corrispondenza con le tecniche tradizionali di misurazione del glucosio fino al 99% (in

termini di *data pairs* che rientrano nelle Zone A e B della griglia di errore di Clarke). Numerosi altri prototipi sono segnalati nel web, ma senza dettagliati dati pubblicati su riviste *peer reviewed* non ritengo opportuno segnalarli [105-115].

1.7 La misura della glicemia nel paziente in dialisi

La nefropatia diabetica (ND) è una complicanza microvascolare, frequente sia nel diabete di tipo 1 sia in quello di tipo 2. Nel primo caso la prevalenza di nefropatia aumenta con la durata della malattia fino a superare il 30% dopo 20 anni [116-117]. Questa complicanza è una delle principali cause di insufficienza renale terminale con ricorso a dialisi e a trapianto di rene [118] ed è associata ad un aumentato rischio di malattia cardiovascolare e di morte prematura. Studi osservazionali suggeriscono che l'insorgenza di nefropatia sia più frequente in pazienti diabetici con inadeguato controllo glicometabolico. Gli effetti dell'iperglicemia sono mediati da diversi meccanismi patogenetici, tra i quali: aumento della pressione intraglomerulare e della glicosilazione di proteine plasmatiche e tissutali con formazione di AGEs [119-120], attivazione della via dei polioli [121], e del sistema della proteina fosfochinasi C [122-123]. La stabilizzazione del controllo glicemico diventa fondamentale anche dopo l'insorgenza della patologia per bloccare ulteriori peggioramenti delle condizioni dei pazienti.

E' importante monitorare la glicemia del paziente durante la procedura di dialisi soprattutto per scongiurare episodi di ipoglicemia nei pazienti diabetici di tipo 1, anche dietro correzione della terapia insulinica che accompagna solitamente il trattamento. Un recente studio [124] ha poi dimostrato come ottimizzare il controllo glicemico nei pazienti diabetici di tipo 2 sottoposti a emodialisi possa fornire dati clinici importanti, visto che i valori glicemici sono considerevolmente più bassi nei giorni di terapia dialitica rispetto a quelli normali, nonostante un'assunzione calorica pressoché identica. I risultati indicano che il rischio di ipoglicemia asintomatica è più alto entro le 24 ore di dialisi. Già in precedenza le crisi ipoglicemiche asintomatiche sono state oggetto di studio, verificando come in pazienti con insufficienza renale cronica di grado elevato sottoposti a dialisi, i sintomi della crisi ipoglicemica vengano talvolta erroneamente attribuiti alle gravi condizioni del paziente. L'ipoglicemia infatti, si accompagna facilmente ad acidosi ed iperlattacidemia [125-126].

Anche in altre tipologie di pazienti, non necessariamente diabetici, in terapia dialitica in fase acuta la misura della glicemia appare come un parametro importante e da prendere

in considerazione. L'insufficienza renale acuta (IRA) si riscontra in circa il 5% di tutti i pazienti ospedalizzati, mentre è presente nel 20% di tutti i pazienti degenti nelle unità di terapia intensiva, superando il 51% nei pazienti con shock settico e con emocoltura positiva [127]. Inoltre, la combinazione di IRA e di sepsi si associa a tassi di mortalità pari al 75%, nettamente superiori se confrontati con il 45% di mortalità che si riscontra nei pazienti affetti da sola IRA [128]. L'insorgenza di insulino-resistenza associata ad iperglicemia costituisce una delle manifestazioni che caratterizzano la risposta alla sepsi e ne peggiorano l'*outcome*: i pazienti che sviluppano questa sorta di "diabete da stress" hanno, infatti, un più elevato rischio di decesso. Recentemente è stato dimostrato come la terapia intensiva con insulina migliori la prognosi dei pazienti critici: il mantenimento dei livelli di glicemia tra 80 e 110 mg/dL, infatti, se paragonata alla terapia convenzionale (glicemia tra 180 e 200 mg/dL), riduce significativamente la mortalità e morbilità da sepsi [129]. La terapia con insulina, inoltre, diminuisce la frequenza di episodi di sepsi nel 46% dei casi e riduce il numero di decessi per danno multiorgano; tale risultato non sembra influenzato da un'anamnesi positiva per diabete [130-131]. Il meccanismo protettivo svolto dall'insulina in corso di sepsi è a tutt'oggi sconosciuto [132]. Da quanto riportato in letteratura, l'iperglicemia e l'aumento della concentrazione ematica del lattato, sono correlate ad un aumento di mortalità del paziente settico [129-130]. In questi pazienti è frequente il riscontro di iperglicemia e, contemporaneamente, di uno status di insulino-resistenza, anche quando in precedenza l'omeostasi glucidica era risultata normale [130]. I pazienti critici vanno incontro a variazioni metaboliche dovute a vari tipi di stress (trauma chirurgico, sepsi) che si manifestano con una secrezione di ormoni da stress (cortisolo, catecolamine), ormone della crescita e glucagone. Questo fenomeno determina anche un aumento della gluconeogenesi. A tutto ciò può associarsi un incremento dei processi di glicolisi anaerobia con conseguente aumento della produzione del lattato, a cui può seguire l'instaurarsi di uno stato di acidosi metabolica, pericoloso per la vita del paziente. Pertanto appare chiaro come il monitoraggio rapido del glucosio e del lattato sia essenziale per il management clinico e terapeutico dei pazienti critici. Attualmente il glucosio ed il lattato sono monitorati ad intervalli non frequenti e la terapia con insulina viene effettuata solo quando i livelli di glucosio superano i 200 mg/dL. La possibilità di disporre di una misura diretta e continua potrebbe offrire al medico il vantaggio di una valutazione in tempo reale delle oscillazioni dei livelli di glucosio e lattato, così come la possibilità di somministrare insulina per mantenere il glucosio entro un ben definito

intervallo. È stato dimostrato che il rigido controllo del glucosio è associato ad una diminuzione della degenza nelle unità intensive e della mortalità [132].

Esiste quindi un notevole interesse ad un apparecchio che possa monitorare in modo affidabile questi parametri durante la procedura di emodialisi.

2. MATERIALI E METODI

La spettroscopia di impedenza o dielettrica

L'analisi delle proprietà dielettriche dei materiali è stata condotta in vari ambiti, dall'ingegneria elettrica, alla medicina (studio delle proprietà chimico-fisiche delle sostanze usate in tale ambito [133]) e, più in generale, è portata avanti nell'investigazione della struttura dei materiali sotto il nome di "spettroscopia di impedenza" [134].

2.1.1 Impedenza

Si definisce impedenza (Z) il numero complesso dato dal rapporto tra il numero complesso che rappresenta la tensione e il numero complesso che rappresenta l'intensità di corrente, l'impedenza è quindi una grandezza complessa che lega l'andamento in funzione del tempo della tensione $V(t)$ presente agli estremi di un circuito elettrico con quello della corrente $i(t)$ che lo percorre, più precisamente è definita come il rapporto tra il fasore appunto della tensione d'ingresso $V(t)$ e quello della corrente $i(t)$. Nel caso particolarmente semplice in cui corrente e tensione si mantengano costanti nel tempo, la relazione è di diretta proporzionalità $V = iR$ (legge di Ohm), con R resistenza del circuito [90].

2.1.2 Tecniche di spettroscopia dielettrica o di impedenza

Il principio alla base dell'IS può essere così riassunto: al campione oggetto di studio si applica uno stimolo noto di corrente, oppure di tensione e se ne osserva la risposta nel tempo, ovvero la tensione oppure la corrente risultante. Ogni fattore in grado di modificare la conduttività del sistema può potenzialmente essere indagato con questa tecnica, poiché l'andamento dell'impedenza con la frequenza permette di descrivere in modo completo le proprietà elettriche di qualunque sistema lineare. Operativamente, la misura impedenziometrica si effettua applicando al dispositivo in esame un segnale $V(t)$ e leggendo la corrente prodotta $I(t)$. I risultati ottenuti tramite tecniche di spettroscopia di impedenza necessitano per loro natura di una rappresentazione in tre dimensioni, dal momento che l'impedenza è una funzione complessa: l'informazione di impedenza è scomponibile come parte reale e parte immaginaria in funzione della frequenza, quindi per esprimere in modo completo Z è possibile utilizzare o i diagrammi di Bode, che forniscono modulo e fase su due grafici separati, o il diagramma di Nyquist, nel quale in un grafico

cartesiano bidimensionale si esprime la componente immaginaria in funzione della componente reale al variare della frequenza, cosicché ogni frequenza sia rappresentata da un punto nel piano e la curva risultante sia l'interpolazione dell'informazione alle varie frequenze alle quali si effettua la misura. Il diagramma di Nyquist risulta particolarmente utile se si vogliono ottenere informazioni legate a singolarità vicine in frequenza, che non risulterebbero ben distinte su grafici logaritmici, come i diagrammi di Bode [135].

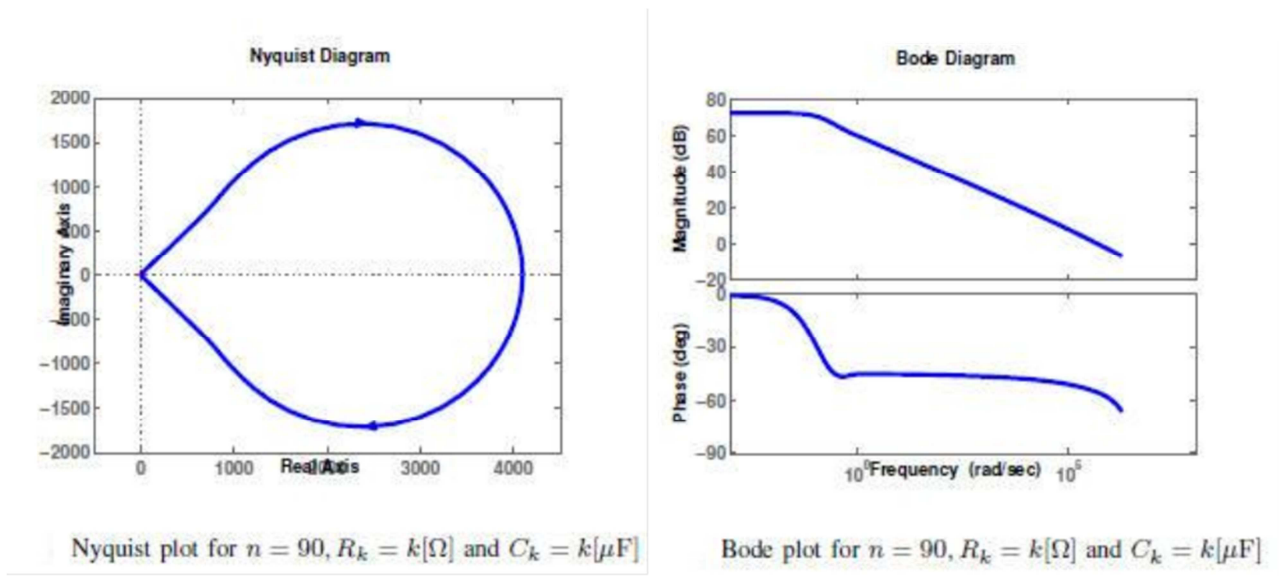


Fig.5: Rappresentazione generica di una misura di impedenza secondo i diagrammi di Bode e Nyquist.

Le tecniche di spettroscopia dielettrica si dividono in due grandi tipologie: i metodi nel dominio del tempo (*time-domain techniques*) e quelli nel dominio della frequenza (*frequency domain techniques*). Matematicamente parlando i due approcci, pur equivalendosi, rivelano delle differenze pratiche che riguardano la capacità dei metodi nel dominio del tempo di investigare il comportamento a bassa frequenza (10-4-10 Hz) ed in quella dei metodi nel dominio della frequenza di spingersi nelle regioni dello spettro a più alta frequenza (10-1-106 Hz) [134].

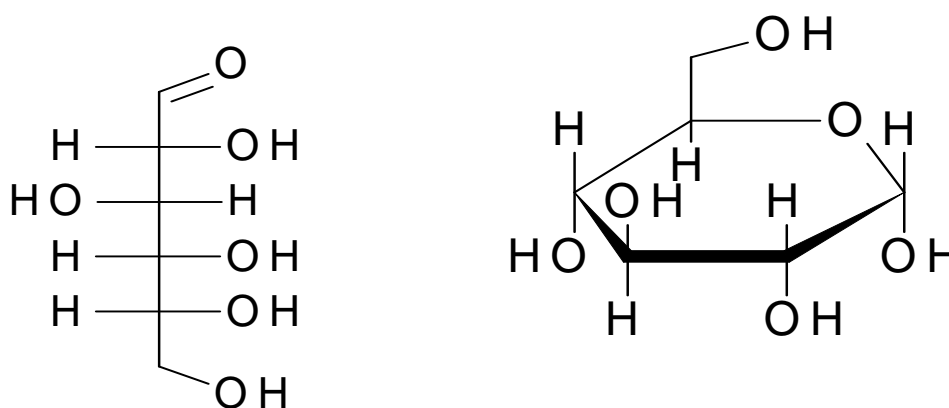
Per le misure di campioni biologici il metodo più utilizzato di stimolazione elettrica consiste nel misurare direttamente l'impedenza Z in funzione della frequenza $f = \omega/2\pi$, applicando una tensione V , di frequenza singola variabile, all'interfaccia e misurando lo sfasamento e l'ampiezza, oppure la parte reale e quella immaginaria della corrente i risultante, corrispondente di volta in volta alla frequenza fissata. Gli strumenti commerciali disponibili misurano l'impedenza Z in funzione della frequenza f tipicamente entro il *range* di frequenza ($10^{-3} \div 10^6$) Hz e sono facilmente interfacciabili con i PC (*Personal Computer*) da laboratorio. I maggiori vantaggi del metodo descritto sono costituiti appunto dall'ampia

disponibilità sul mercato di strumentazione dedicata di relativamente facile impiego, unitamente alla possibilità di operare direttamente entro il *range* di frequenza di maggior interesse per l'esperimento [90-134].

2.2 Spettroscopia di impedenza per la misura delle proprietà dielettriche di soluzioni di NaCl a diverse concentrazioni di glucosio.

Preparazione dei campioni

Per la preparazione dei campioni, sono stati utilizzati il cloruro di sodio (NaCl) allo 0,9% (Baxter) e D-glucosio (C₆H₁₂O₆) 99,5% (Fluka).



GLUCOSIO

Sono stati preparati 500 ml di sodio cloruro 0,9% (soluzione salina fisiologica) con l'aggiunta di 25 g di glucosio per raggiungere la concentrazione finale di 5000 mg/dl.

Il campione è stato poi diluito, diverse volte per minimizzare l'errore di misura ottenendo, alla fine, sette campioni, con valori di concentrazione di glucosio di rispettivamente ~ 78, ~156 ~ 312, 625, 1250, 2500 e 5000 mg / dl.

Strumentazione utilizzata

Per misurare l'impedenza Z è stato utilizzato l'impedenzometro *Solartron 1260* (Solartron Analytical). Tale apparecchio è in grado di eseguire automaticamente scansioni nel dominio della frequenza del segnale in corrente alternata, inviata dallo strumento stesso. Il sistema, si interfaccia con un PC per la lettura e l'analisi delle misure.



Fig.6: *Solartron 1260* (Solartron Analytical)

L'approccio utilizzato è quello a elaborazione digitale con sistemi di amplificazione del segnale e convertitori analogico-digitali.

La fase di calibratura dello strumento consiste nella rilevazione di un'impedenza nota in modo da determinare il guadagno equivalente dell'intera catena di misura. I guadagni dei vari blocchi di misura dipendono, in generale, sia dalla frequenza sia dai vari fattori ambientali, come ad esempio la temperatura.

Comunemente a ogni sistema di misura digitale lo strumento presenta i seguenti elementi:

- ✓ **ADC** (Analog-to-Digital Conversion): per la conversione digitale del segnale analogico misurato.
- ✓ **Generatore di tensione.**
- ✓ **Amplificatore di transimpedenza.**
- ✓ **DAC** (Digital-to-Analog Conversion): per la conversione analogica del segnale campionato.

Algoritmo di Stima: per la determinazione del valore del fasore corrente da una sequenza di valori campionati dalla corrente stessa.

Per la cella di misura, abbiamo scelto una sonda della Delta OHM (*modello SP06T*). Un diagramma a blocchi della sonda è riportato in fig. 7 (alto). La cella è caratterizzata da

quattro elettrodi piatti di platino, per avere la possibilità di effettuare la separazione tra terminali di stimolo e di rilevamento fig. 7 (in basso), permettendo così di minimizzare possibili effetti secondari, come l'induttanza dei cavi o eventuali capacità parassite (effetti capacitivi non previsti che allontanano il comportamento di un dispositivo reale rispetto ad uno ideale) che possono influenzare la precisione della misurazione di impedenza [136]. Gli elettrodi sono poi coperti da una campana in modo da mantenere delimitata e costante la regione misura quando la cella viene immersa nel tubo di vetro contenente la soluzione del campione da analizzare. La cella include anche un sensore di temperatura. Il *k-factor* (fattore geometrico che dipende dalla posizione degli elettrodi) della cella è $0,7 \text{ cm}^{-1}$ e il *range* di misura va da $5\mu\text{S/cm}$ a 200mS/cm .

L'impedenza dei campioni è stata misurata nel *range* di frequenza 10^5 - 10^7 Hz, con cinque punti di frequenza per ogni decade. In questo studio i valori di frequenza più bassa non sono stati considerati per evitare possibili fattori confondenti legati alla polarizzazione degli elettrodi. Inoltre non abbiamo eseguito inoltre misure superiori a 10 MHz (cioè a frequenze molto alte), minimizzando ulteriormente il peso degli eventuali effetti secondari sopracitati. D'altra parte, quando il campione da misurare possiede conducibilità molto elevata, per una migliore accuratezza e precisione, può essere conveniente utilizzare gli elettrodi a una distanza sufficientemente elevata. Per questo motivo, abbiamo deciso di utilizzare la coppia di elettrodi esterni non solo per la stimolazione, ma anche per il rilevamento. I test sono stati eseguiti applicando una tensione di 100 mV r.m.s. al campione attraverso la coppia di elettrodi esterni.

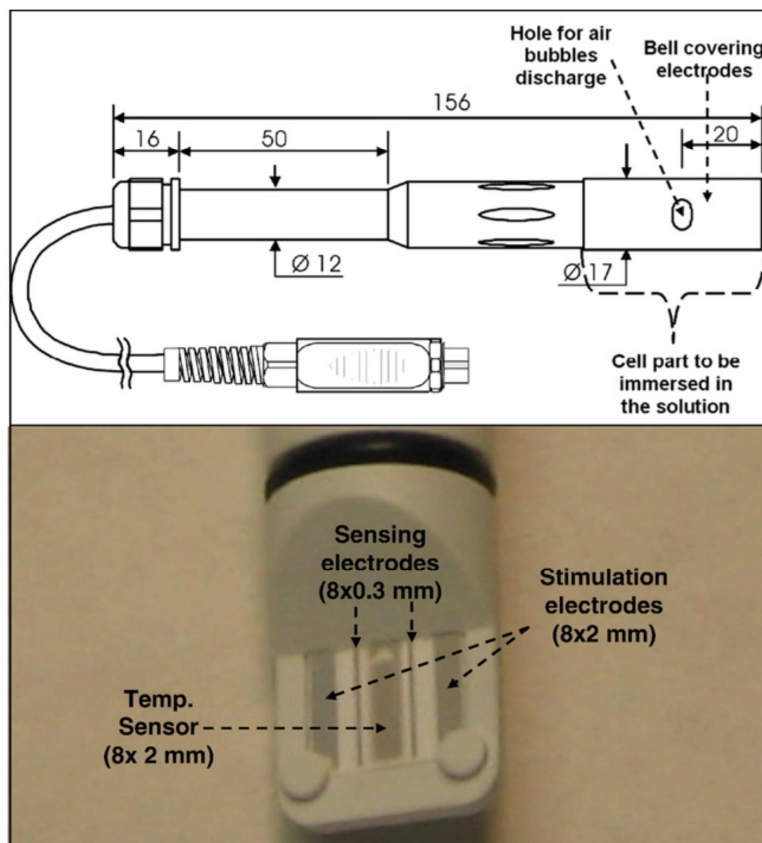


Fig.7: Schema a blocchi della cella di misura (in alto), e la foto del interno parte mostrando gli elettrodi (in basso).

Procedura sperimentale

In ciascuno dei campioni alle diverse concentrazioni di glucosio, abbiamo effettuato i seguenti esperimenti:

- i) La misura di impedenza è stata effettuata sul campione a temperatura ambiente (circa 22°C), in condizioni statiche.
- ii) Per ottenere condizioni dinamiche, il campione è stato agitato attraverso un micro agitatore elettromagnetico (Velp Scientifica), mentre la misura di impedenza è stata portato avanti,
- iii) In seguito, le misure di impedenza, sia in condizioni statiche e dinamiche, come riportato nei punti i) e ii), sono state eseguite dopo il riscaldamento del campione, fino a raggiungere un set di temperature stabili, scelte in una vasta gamma tra cui anche le temperature tipiche dei fluidi corporei umani (32, 37, 42, 47°C); riscaldamento è stato ottenuto per mezzo di una piastra riscaldante (Velp Scientifica), termostatato e poi controllato attraverso un termometro con $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$

di precisione (Checktemp °C, Hanna instrument). Ogni esperimento, per ogni campione, sia in condizioni statiche e dinamiche, e a ogni temperatura investigata è stato eseguito dieci volte: dopo ogni esperimento, la cella di misura è stata pulita prima di immergere nuovamente nel campione stesso. Ogni valore di impedenza presentato nella sezione dei risultati è la media tra le misure sullo stesso campione (in ogni condizione specifica), se non diversamente specificato.

Analisi Statistica

Su ogni coppia di *set* di misura (statica e dinamica), a temperature diverse, abbiamo eseguito un test non parametrico, il test di Wilcoxon Signed Rank. Abbiamo voluto valutare possibili differenze, sulla media, tra i valori in condizioni statiche e dinamiche, per ogni temperatura (modulo di impedenza a 1 MHz). Una $P < 0,05$ è stata considerata come una differenza statisticamente significativa.

2.3 Spettroscopia di impedenza di soluzioni di acqua, NaCl e sangue bovino a diverse concentrazioni fisiologiche di glucosio.

Preparazione dei campioni

I campioni di acqua deionizzata (resistività 18,5 MΩcm, Millipore MilliQ Element system, Billerica MA, USA) sono stati preparati a concentrazioni di glucosio che vanno dalla glicemia normale a quella osservata nel diabete grave, cioè 100, 200, 300 mg / dl. Ogni campione era composto da 50 ml di acqua con D-glucosio (99,5%, Fluka). Le soluzioni di cloruro di sodio 0,9% (Baxter) sono state preparate allo stesso modo.

Per la preparazione di campioni di sangue sono stati raccolti 500 ml di sangue bovino immediatamente dopo la macellazione degli animali. E' stato quindi necessario evitare sia la coagulazione che la glicolisi [137, 138] aggiungendo al campione 1 g di ossalato di potassio (99,98%, Sigma-Aldrich) e 1,25 g di fluoruro di sodio (99,99%, Sigma-Aldrich), rispettivamente come anticoagulante e inibitore glicolitico [139]. Abbiamo quindi testato la concentrazione di glucosio del campione di sangue con due glucometri portatili (Freestyle, TheraSense e GlucoMen, Menarini Diagnostica). Abbiamo eseguito sei misure per ogni sensore: il valore medio è stato 65 mg / dl. Il sangue è stato poi conservato in un frigorifero a 4 °C. Nelle ore successive abbiamo controllato ancora diverse volte la concentrazione di glucosio: le differenze rispetto al le prime misure

sono sempre state all'interno della precisione dello strumento, confermando così che la glicolisi è stata correttamente inibita.

Poi, abbiamo aggiunto D-glucosio per ottenere campioni di sangue con concentrazioni simili a quelle sopra indicate per le altre tipologie di campioni.

Abbiamo anche testato la condizione degli eritrociti prima e dopo gli esperimenti di impedenza. Abbiamo usato il colorante trypan blu ($C_{34}H_{24}N_6-O_{14}S_4Na_4$) per discriminare le cellule vive da quelle morte.

La reattività del trypan blu è basata sul fatto che non penetra la cellula, salvo che la membrana non sia danneggiata. Pertanto, il colorante penetra solo la membrana delle cellule morte, che di conseguenza appaiono blu osservandole al microscopio ottico; 10 ml di ogni campione sono stati centrifugati a 250 g (1200 rpm) per 7 minuti, il pellet è stato poi risospeso in 5 ml di tampone PBS e dopo 5 min di incubazione con la soluzione trypan blu a temperatura ambiente, è stata riempita una camera Burker con una diluizione 1/180 e osservata con un microscopio ottico (10x e 20x). Tutti i campioni hanno mostrato che la maggior parte delle cellule erano ancora vive (almeno il 90%). Se ne deduce che al momento degli esperimenti di impedenza gli eritrociti sono stati in grado di innescare i meccanismi che probabilmente interessano i valori di impedenza misurati.

Abbiamo valutato l'accuratezza nella preparazione dei campioni misurando la concentrazione di glucosio: le differenze sono sempre all'interno della precisione strumentali (<5%).

Strumentazione utilizzata

La strumentazione utilizzata è identica a quella del set di esperimenti descritti in 2.2.

Procedura sperimentale

Attraverso il Solartron 1260 abbiamo applicato una tensione di 100 mV r.m.s. al campione attraverso la coppia di elettrodi esterni. La corrente elettrica è stata letta attraverso gli elettrodi interni. Abbiamo analizzato l'impedenza nella gamma 10^{-1} - 10^7 Hz. in cinque punti di frequenza per ogni decade. Per ogni campione studiato, abbiamo effettuato sei misure indipendenti: dopo ogni misura la cella è stata pulita prima di immergerla di nuovo nel campione. I valori presentati per ciascun campione sono la media tra le misure. Nella gamma di frequenza di maggiore interesse (vedi risultati) le

differenze tra le due misure di un campione sono state sempre inferiori alla differenza tra i valori medi di due diversi campioni. Per esempio, nei campioni di sangue la peggiore differenza tra due misure di un campione è stata dell'ordine di 0,1 Ω , nettamente inferiore alla differenza media tra campioni a diverse concentrazioni di glucosio. Tutte le misure di impedenza sono stati eseguiti con i campioni a temperatura ambiente (23 °C con la massima variazione di $\pm 0,3$ °C).

Tutte le misure sono state corrette attraverso tecniche di compensazione "open-short".

2.4 Misura indiretta della concentrazione di glucosio tramite sensore elettromagnetico a bassa frequenza: esperimenti *in vitro* in diverse soluzioni conduttive.

Preparazione dei campioni

I Campioni di soluzione fisiologica salina sono stati preparati con il procedimento descritto in 2.2 ottenendo le stesse concentrazioni finali di glucosio: 5,000, 2,500, 1,250, 625, ~312, ~156, ~78 mg/dL.

Una seconda serie di campioni è stata preparata a partire di nuovo da 100 ml di soluzione di sodio cloruro 0,9% con l'aggiunta di 0,1 g di NaCl (JT Baker). Così, abbiamo ottenuto una soluzione al 1,0% di cloruro di sodio. Con il metodo descritto in precedenza, abbiamo poi ottenuto e analizzato i campioni ai diversi valori di concentrazione di glucosio sopra indicati. Un terzo e quarto set di campioni sono stati preparati con un'ulteriore aggiunta di cloruro di sodio, in modo da ottenere soluzioni all'1,1% e 1,2%. Infine, la quinta serie di campioni è stata preparata utilizzando la soluzione di Ringer lattato (130 mmol/L Na⁺, 109 mmol/L Cl⁻, 28 mmol/L di Lattato come HCO₃⁻, 4 mmol/L K⁺, 1,5 mmol/L Ca²⁺) (Bieffe Medital) per poi ottenere i campioni a diversi valori di concentrazione di glucosio come sopra.

Strumentazione utilizzata

Il sistema di misura è costituito da una pompa peristaltica (Bellco), una cella di vetro che contiene il campione da analizzare, un tubo in silicone flessibile (diametro 8 mm, lunghezza totale ~ 200 cm) con entrambe le estremità all'interno della cella di vetro (cioè, immersi nel fluido campione), e un sensore elettromagnetico inserito nel circuito idraulico. Il diagramma a blocchi del sistema è mostrato in figura 8. Il sensore elettromagnetico è

stato recentemente sviluppato presso la divisione ricerca e sviluppo Bellco, (Mirandola (MO), Italia). Una fotografia del sensore è mostrata in figura 9.

Il sensore si basa sul principio fisico dell'induzione elettromagnetica (1.5.). Due bobine a induzione sono accoppiate attraverso il mezzo in esame (cioè il liquido che scorre nel circuito idraulico). Il fluido rappresenta il nucleo che collega i due induttori. L'accoppiamento elettromagnetico dei due induttori viene modificato dalle variazioni dei parametri dielettrici del fluido. Infatti, quando la bobina primaria è eccitata da una sorgente CA (corrente alternata), un campo magnetico nella bobina primaria induce un campo elettrico attorno alle due bobine. Questo campo elettrico induce una corrente elettrica all'interno del *ring* dove passa il fluido (il sensore ha infatti due rami: vedi figura). Questa corrente induce un flusso magnetico nella bobina secondaria, e il flusso magnetico induce una forza elettromotrice nella bobina stessa. La corrente nel liquido può essere stimata misurando la corrente nella bobina secondaria: I_s (corrente nella bobina secondaria) è uguale a I_f / n_s (I_f è la corrente nel liquido, e n_s il numero di giri della bobina secondaria). Dato che la grandezza della corrente nel fluido è proporzionale all'ingresso del fluido nel *ring*, è possibile ricavare la conducibilità del fluido. In teoria potrebbe essere misurata anche la permittività del liquido con questo metodo, ma nella pratica questo tipo di sensore è più adeguato per la misura della conducibilità [140].

Nel nostro sensore, i due induttori sono realizzati con elementi di piccole dimensioni ($30 \times 30 \times 16$ mm). Abbiamo utilizzato componenti commerciali, come ad esempio il Philips 4330-030-3752 (possono essere utilizzati in alternativa altri componenti). L'induttore primario funziona in configurazione push-pull. È guidato da un impulso di un modulatore che regola la larghezza di impulso (Intersil CA3524). Questo componente è stato impostato per avere gli induttori che lavorino a 40 kHz. Il sensore elettromagnetico ha bisogno di due linee di alimentazione a +15 V e -15 V. Fornite attraverso un alimentatore stabilizzato con doppia uscita (ES Roland). L'uscita del sensore elettromagnetico che abbiamo preso in considerazione in questo studio è stata una corrente elettrica continua (DC o CC da 0 a ~ 25 mA). Questa corrente è stata diretta su una resistenza di 500Ω (1/4W, 1%), ottenendo un voltaggio continuo da 0 a ~12,5V. Quindi, abbiamo semplicemente analizzato i valori di conducibilità dei campioni studiati. La relazione tra la tensione di uscita e la conduttività del campione è stata ottenuta in tutta la gamma di conducibilità indagata da parte l'equazione $1 \text{ V} = 2 \text{ mS/cm}$. Questa relazione è stata ottenuta calibrando il sensore con standard di conducibilità nota, considerando che il

fattore k del sensore (il volume del *ring* del liquido) è pari a 8 cm^3 . La pompa peristaltica ha richiesto un'alimentazione a 15 V (o meno, a seconda della velocità del flusso necessaria) fornita da un unico alimentatore (Stab Italia).

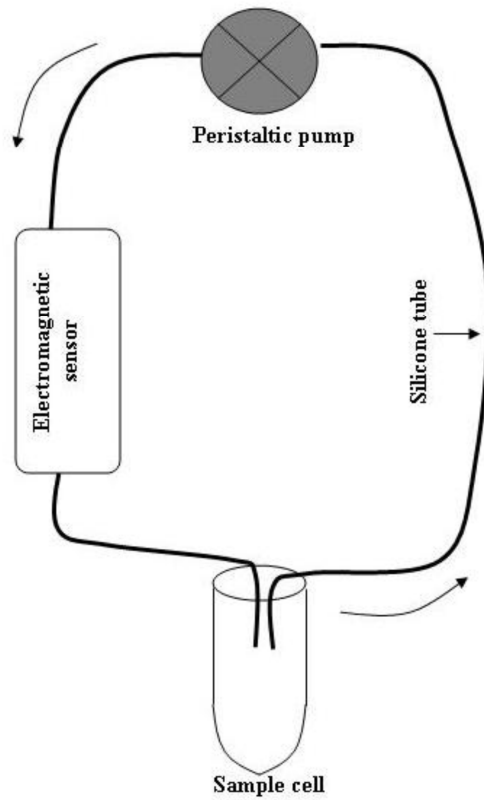


Fig.8: sistema di misura

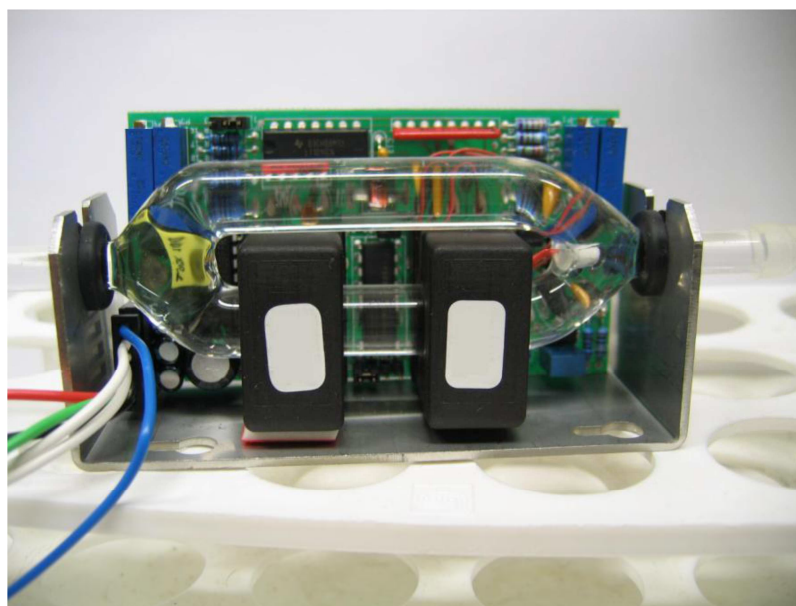


Fig.9: sensore elettromagnetico

Procedura sperimentale

Per quanto riguarda la prima serie di campioni (0,9% sodio cloruro), abbiamo prima analizzato il campione a 5.000 mg/dl di glucosio. La pompa peristaltica è stata inizialmente alimentata a 10 V, dando così una velocità al fluido di circa 20 cm/s. Abbiamo aspettato alcuni secondi per consentire il riempimento del circuito idraulico con il fluido-campione, e abbiamo verificato che non fossero presenti bolle d'aria. Attraverso un multimetro digitale (Wavetek) abbiamo verificato la tensione di uscita del sensore, e salvato il valore in un foglio elettronico. Per valutare i possibili effetti della velocità del flusso sulla stima della concentrazione di glucosio, abbiamo aumentato la potenza della pompa a 15 V (la velocità di flusso nel circuito cambia quasi linearmente con la potenza della pompa) e ripetuto la misura. Inoltre, abbiamo poi diminuito la velocità a 5 V e 0 V, ottenendo così anche una misura in condizioni statiche (assenza di flusso). Per ogni misura, la temperatura del fluido campione è stata controllata attraverso un termometro per liquidi, con precisione $\pm 0,3$ °C (Hanna Instruments). Per tutte le misure a temperatura ambiente (anche per i set di altri campioni), la temperatura del campione era nel range di 22-23 °C. Dopo le quattro misurazioni a velocità di flusso differenti, il circuito è stato svuotato e poi riempito con la soluzione del bianco (0,9% di soluzione di cloruro di sodio, senza glucosio); abbiamo diffuso la soluzione per circa un minuto, e poi svuotato di nuovo il circuito. Poi, abbiamo messo nella cella del campione la concentrazione immediatamente inferiore (2.500 mg / dL in questo caso), e ripetuto l'intera procedura. Abbiamo continuato con tutti i campioni, e infine eseguito le misurazioni sul campione di bianco. Tutte le procedure descritte sono state eseguite per il secondo, terzo, quarto e quinto set di campioni.

Per due campioni di ogni set, abbiamo anche eseguito alcune misurazioni per valutare il possibile effetto delle variazioni di temperatura sulla valutazione della concentrazione del glucosio. Abbiamo scelto un campione con alto livello di glucosio (2.500 mg / dL), e uno con un basso livello (~156 mg /dL). Per mezzo di una piastra riscaldante (Velp Scientifica) abbiamo progressivamente riscaldato il campione, ed eseguito la misura a circa 30 °C, 37,5 °C (di particolare interesse è la temperatura del corpo umano), e 45 °C. Di regola, ogni misura (cioè, per ogni campione in ogni set, a diverse velocità e, in alcuni casi, a diverse temperature) è stato ripetuto quattro volte, in giorni separati, a partire da tutte le procedure sperimentali dall'inizio (cioè, partendo dalla preparazione dei campioni). Inoltre, per quanto riguarda il sodio cloruro allo 0,9% con ~78 mg/dl di glucosio, abbiamo eseguito la misura 10 volte (pompa alimentata a 10V, temperatura ambiente), per ottenere

l'indicazione della ripetibilità (precisione) del nostro approccio (tutte le misurazioni sono state eseguite dallo stesso operatore). La conducibilità di alcuni dei campioni studiati è stata misurata con un conduttivimetro commerciale (Amel Instruments, mod 160.): prima abbiamo misurato il campione bianco allo 0,9%, 1,0%, 1,1% e 1,2%, di cloruro di sodio e di Ringer lattato. Poi, abbiamo misurato la serie di campioni del 0,9% cloruro di sodio, più glucosio a diverse concentrazioni (da ~78 a 5.000 mg /dL). Così, un totale di 12 campioni sono stati analizzati. Naturalmente, le misure con questo strumento sono state ottenute con la sonda dello strumento direttamente a contatto del campione. Tutte le misurazioni sono state effettuate quattro volte, a temperatura ambiente.

2.5 Valutazione tramite spettroscopia di impedenza e resine a scambio ionico, del contributo dello ione Na⁺ nella conducibilità di soluzioni di interesse.

Questo allo scopo di valutare l'effettivo contributo del segnale di sodio misurato durante le procedure di emodialisi e valutare la possibilità di ricavare da esso la stima della concentrazione di glucosio.

Preparazione dei campioni

Sono state utilizzate diverse soluzioni di soluzione fisiologica salina caricata con NaCl e con concentrazioni diverse di glucosio come descritto il 2.4.

Strumentazione utilizzata

Le Resine a scambio ionico hanno consistenza solida e sono costituite da una Matrice e da un Gruppo Funzionale quest'ultimo in grado di adsorbire selettivamente alcuni ioni presenti in soluzione. Le resine possono essere di tre tipi:

- 1) Resine a scambio Cationico: dalla soluzione assorbono ioni positivi
- 2) Resine a scambio Anionico: dalla soluzione assorbono ioni negativi
- 3) Resine di tipo Anfotero: possono scambiare sia ioni positivi che negativi

Gli ioni più frequentemente adsorbiti sono:

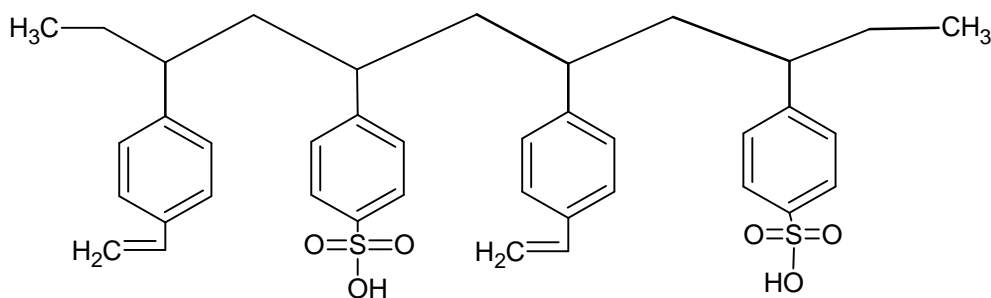
Cationi: Na⁺; H⁺; K⁺; Ca²⁺; Mg²⁺; anioni organici –NR₂H⁺;

Anioni: (OH)⁻; Cl⁻ Anioni di acidi organici RCOO⁻

Inoltre possono essere assorbiti anche amminoacidi, peptidi, proteine, biomolecole ionizzabili che, a seconda del pH del mezzo, possono presentare cariche positive o

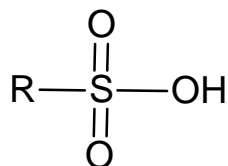
negative. A seconda del tipo di ione interessato all'assorbimento (sia positivo che negativo), può trattarsi di uno scambio "forte" o "debole".

La resina utilizzata è una Resina a scambio Cationico di tipo forte DOWX G-26,H (SIGMA-ALDRIC), con una MATRICE POLIMERICA costituita da STIRENE reticolato con DIVINILBENZENE. Il risultato di questa reticolazione è quello di avere polimeri molto incrociati tra loro ed insolubili che macroscopicamente costituiscono granuli con diametro Ø di pochi millimetri. Il grado di legami crociati presenti dipende dalla copolimerizzazione di % variabili dei due costituenti, in particolare: più aumenta la quantità di DIVINILBENZENE rispetto a quella dello STIRENE, più aumentano i legami incrociati presenti tra queste molecole. A grandi linee, la rappresentazione della formula di questo polimero è:



STIRENE DIVINILBENZENE

Come si vede da questa formula, il gruppo funzionale della resina è l'ACIDO SULFONICO (RSO₃H) :



Esso si ottiene quando uno dei sostituenti dell'atomo dello zolfo è un gruppo alchilico: nel caso della resina in esame, l'atomo di zolfo si lega covalentemente ad un carbonio del radicale benzenico. Esso costituisce un gruppo funzionale molto polare per la presenza

del gruppo ossidrile ed anche perché sono presenti due atomi molto elettronegativi: lo zolfo e l'ossigeno.

L'acido sulfonico è quindi un acido forte, infatti, esso possiede un atomo di idrogeno che legato covalentemente ad un atomo di ossigeno e che può facilmente essere rilasciato sotto forma di idrogenione H^+ in quanto i 2 elettroni del suo legame covalente, con uno degli ossigeni, vengono facilmente richiamati dalla forte elettronegatività dell'ossigeno O a cui è legato, ma anche da quella dell'atomo di zolfo S che è vicino. Vi sono altre resine cationiche che hanno come gruppi funzionali (-RCOOH) o (-OH) da definirsi rispettivamente: resina cationica debolmente acida e resina cationica debole. Si può così stabilire una sequenza dei gruppi funzionali delle resine rispetto alla tendenza alla dissociazione dell'idrogenione :



Ovviamente l'efficienza di questa reazione dipende dal pH del mezzo. Infatti, se fossero già presenti molti idrogenioni, cioè se ci fosse un pH basso nel mezzo (elevata acidità), la dissociazione non avverrebbe facilmente nemmeno per l'acido più forte come quello presente nella nostra resina.

Oltre alla resina menzionata è stata secondariamente utilizzata una resina a scambio $H^+ > OH^-$ per la normalizzazione del pH.

Le resine utilizzate sono state quindi:

DOWX G-26(SIGMA-ALDRIC), H Scambio $Na^+ > H^+$

MTO-Dowex M43 Anion Exchange Resin (SUPELCO Analytical), Scambio $H^+ > OH^-$

E' stato predisposto un circuito idraulico come descritto in 2.4

La sonda utilizzata è stata una semplice sonda a due elettrodi *Natrium* (Bellco) inserita all'interno del circuito idraulico, la sonda viene usata inserita normalmente nel circuito di dialisi per la misura del sodio.

L'analizzatore Solatron è stato poi collegato al polo positivo della sonda per mezzo dei morsetti "Gen output" e "Input V1 H1", all'anodo con i morsetti "Input" e "Input V1 LO" mentre, infine, i morsetti di massa sono collegati ad un oggetto metallico.



Fig.10: Sonda Natrium

Abbiamo allestito una colonna di diluizione costruendo alla base un filtro adatto alla grana delle due resine.

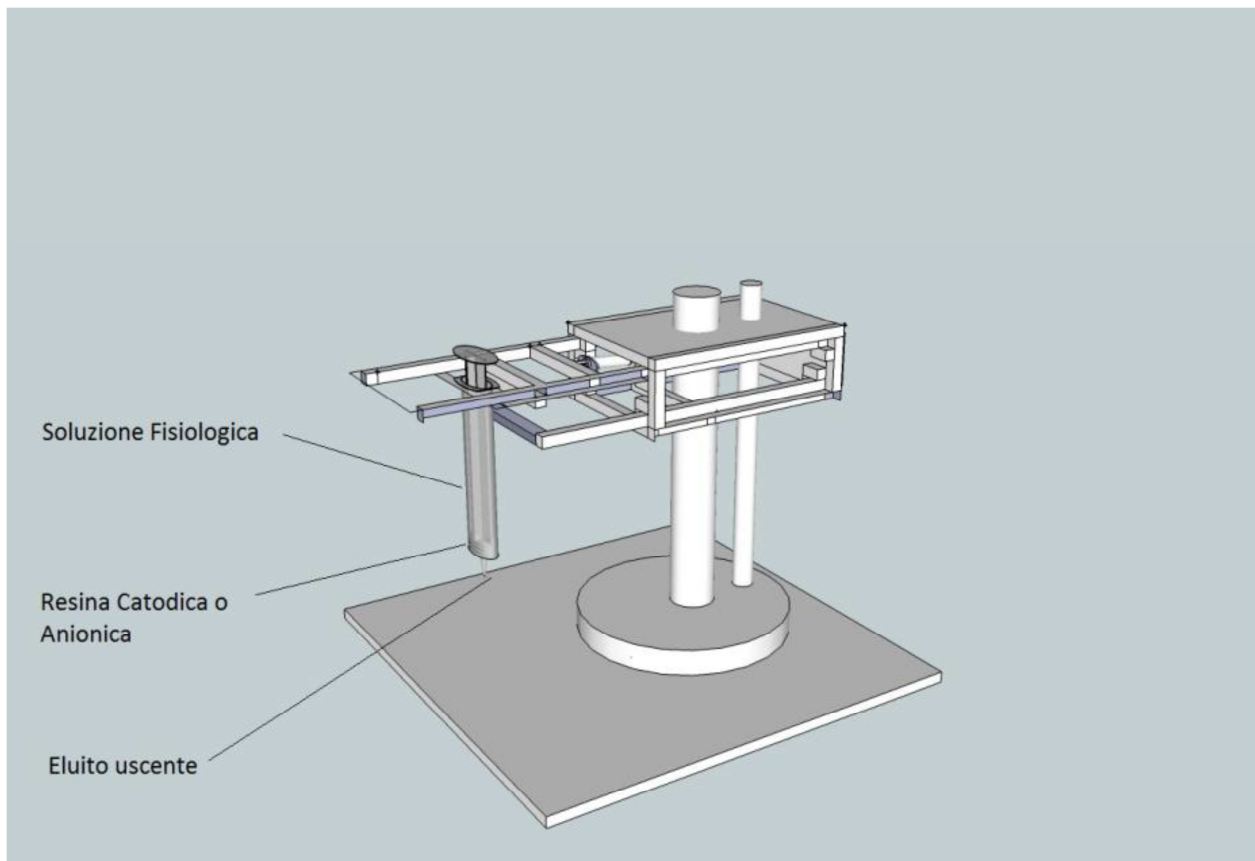


Fig.11: Schema dell'apparato di eluzione costruito.

Procedura sperimentale

- La colonna è stata riempita di volta in volta con 1 g della resina in esame e attraverso questa è stato fatto fluire mediante infusione costante (manuale, agendo su un percussore) un campione di 20 ml di soluzione: questo è stato poi sottoposto a misura di pH e inserito nel circuito per la misura di impedenza. Le misurazioni successive sono state eseguite con quantità costante di resina ma con soluzione fresca, fino all'esaurirsi dell'azione scambiatrice della resina.
- Per verificare le capacità scambiatrici della resina e il reale contributo dello ione Na⁺ il campione è stato messo in agitazione con quantitativi diversi delle 2 resine (4-6 grammi) per tempi crescenti (5-10-15-20-25-30 min.) e poi filtrate prima della misura nel circuito.
- Per tutte le soluzioni è stata misurata l'impedenza in condizioni di varie velocità di flusso all'interno del circuito idraulico, regolando la tensione fornita alla pompa dall'alimentatore; le tensioni considerate sono state: 0V (pompa ferma), 5V, 10V e 15V.
- Tutte le misure sono state eseguite nel range di frequenze di 10MHz – 1KHz, con 5 punti per decade, in scala logaritmica.

2.6 Applicazione della spettroscopia FT-NIR per la misura del glucosio in soluzioni conduttive, per un possibile utilizzo durante terapia dialitica.

La spettroscopia IR è stata, come detto anticipatamente, utilizzata per la misura non invasiva del glucosio con scarso successo, dato in gran parte dai problemi dei confondenti. Abbiamo pensato a un suo utilizzo per la misura in dialisi.

Preparazione dei campioni

Sono stati preparati campioni di Ringer lattato e D-glucosio (2.4) con concentrazioni crescenti 50-100-200-300-400-500 mg/dl; partendo da concentrazioni basse che mimano l'ipoglicemia, passando attraverso concentrazioni fisiologiche fino ad arrivare a severe iperglicemie.

Strumentazione utilizzata

Spettrofotometria In Trasformata Di Fourier (Ft-Ir)

Questa tecnica strumentale è basata sulla spettroscopia infrarossa classica che abbiamo già visto nel capitolo 1.5.1. si tratta di una tecnica recente creata grazie alla computerizzazione dei laboratori strumentali, Il suo principio di base è rappresentato dalla possibilità di cogliere contemporaneamente tutte le frequenze dello spettro IR nel rilevatore, il che rende superflua la scansione della lunghezza d'onda.

Questo è possibile trasformando, per mezzo di un *interferometro*, la radiazione IR policromatica emessa dalla sorgente (istante per istante con la medesima intensità) in un *interferogramma*, dove l'assorbimento non è più funzione della frequenza, ma del tempo (si passa quindi dal dominio delle frequenze al dominio dei tempi).

Contrariamente agli spettrofotometri tradizionali, quindi, in quest'apparecchiatura non si ha un monocromatore a dispersione, ma viene utilizzato *l'interferometro di Michelson*, il quale produce nel corso di una speciale scansione l'interferogramma della sostanza in esame.

Dopo il passaggio della radiazione così "trattata" attraverso il campione, l'interferogramma viene trasformato dal calcolatore collegato allo strumento in un tradizionale spettro infrarosso mediante un'operazione matematica, la *trasformata di Fourier*.

In questa maniera si passa perciò dall'interferogramma, un grafico dello spazio o del tempo, a uno spettro comune, che rappresenta però la variazione dell'intensità del segnale in funzione del numero d'onda (o della lunghezza d'onda) della radiazione.

Lo spettrometro usato è stato l' Antaris™ Analyzer (modello Nicolet Antaris NIR II™ Thermo Fisher Scientific) il funzionamento dell'apparecchio può essere così riassunto:

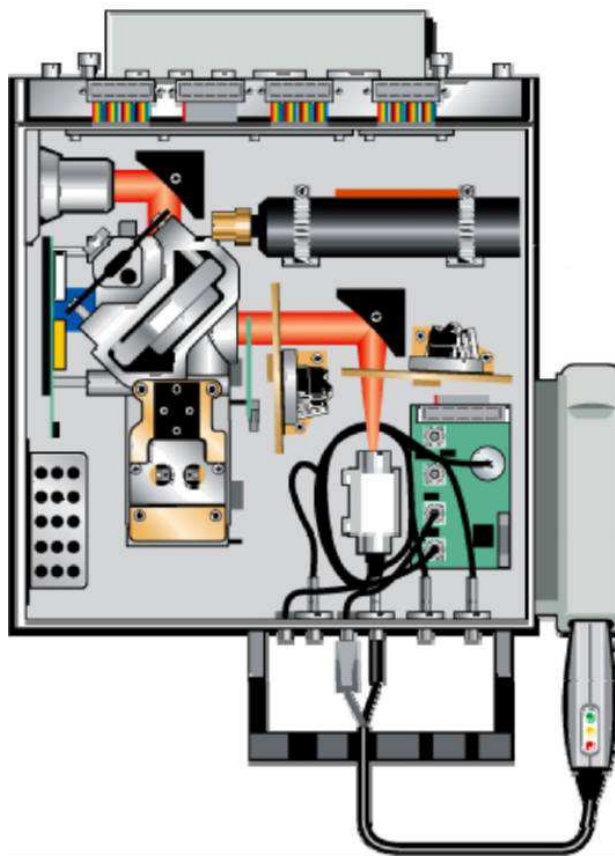


Fig.12: Schema dello spettrofotometro IR Anatriss™

Una sorgente luminosa ad incandescenza emette un raggio luminoso nel campo dell'IR; tale raggio giunge ad uno specchio semiriflettente (**beamsplitter**, un cristallo di KBr rivestito di Geranio) che lo divide in 50% ad uno specchio fisso ed un 50% allo specchio mobile. I raggi riflessi da questi specchi sono inviati un'altra volta allo specchio semiriflettente il quale ricongiunge i due raggi e li invia al rivelatore. Anche se i due raggi hanno raggiunto il rivelatore congiunto, essi hanno compiuto un diverso *cammino ottico*: a seconda della differenza del cammino ottico dei due raggi si creano delle interferenze costruttive o distruttive che creano un segnale al rivelatore proporzionale alla differenza di cammino ottico dei due raggi e quindi dalla posizione dello specchio mobile in quell'istante. In base al movimento del suddetto specchio tutte le radiazioni monocromatiche contenute nella luce emessa dalla lampada danno luogo a un segnale complessivo di interferenza (*l'interferogramma*) che contiene in sé le informazioni riguardanti la frequenza e l'intensità della radiazione emessa.

La trasformata di Fourier, compiuta dal calcolatore dello strumento una volta che il raggio è arrivato al detector, mostra sullo schermo un tradizionale spettro infrarosso,

trasformando il segnale di intensità luminosa in funzione del tempo (spostamento dello specchio) in segnale di intensità in funzione del numero d'onda [141-142].

Le caratteristiche peculiari dell'apparecchio usato sono le seguenti:

- 2 o 4 canali di campionamento indipendenti e simultanei
- 2 o 4 detector dedicati di tipo InGaAs
- Nessun tempo di *lag*
- Nessuna parte meccanica in movimento: Allineamento permanente
- Elevata intensità: tutta la radiazione elettromagnetica viene mandata alla/e fibra/e
- Detector InGaAs dedicato per il background: non si rimuove il *probe* dal processo per eseguire il background (*error free*)

Lo strumento è in grado di supportare diverse sonde per misure su liquidi e di eseguire 4 misure simultanee, noi abbiamo utilizzato l'FT-NIR con sfera integratrice e VLS (1.0 mm) con le seguenti caratteristiche:

- Ottica rivestita in oro (Efficienza > 99%)
- Specchio in oro motorizzato interno per acquisizione del fondo "error free"
- Top in acciaio inossidabile e finestra in zaffiro
- Nicolet Antaris NIR VLS™ studiata per l'analisi liquidi viscosi

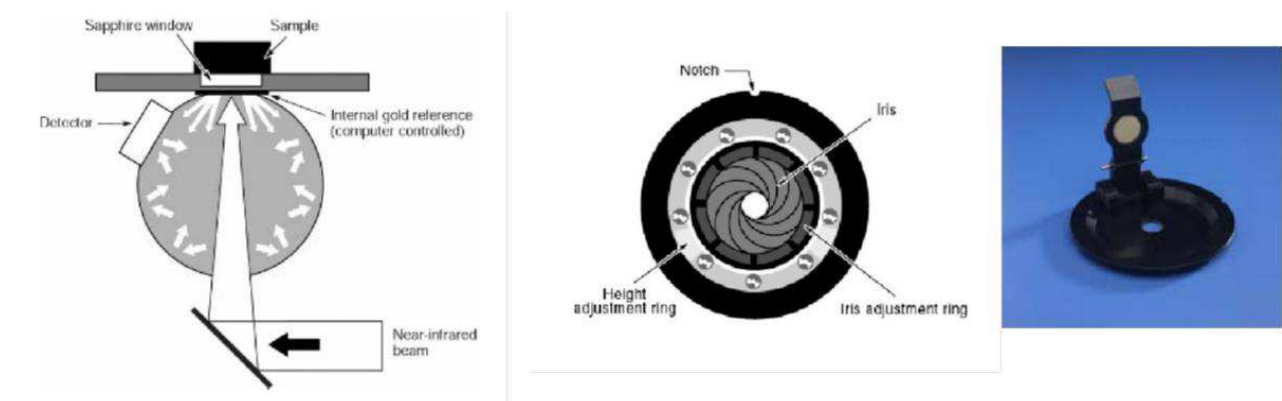


Fig.13: Funzionamento, schema e foto dell'apparato di misura con Nicolet Antaris NIR II™ - Sfera Integratrice

Procedure sperimentali

I campioni sono stati posti sulla cella di misura studiata per rendere più sottile possibile il film del liquido. Per le acquisizioni sperimentali sono stati usati i seguenti parametri:

- 32 scansioni (20 secondi)
- Risoluzione 4 cm^{-1}
- Range spettrale 10.000-4.000 cm^{-1}
- Cammino ottico 2.0 mm
- Pretrattamenti: - First Derivative- Smoothing (*Norris derivative filter*)

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Proprietà dielettriche dei materiali biologici

Ogni mezzo, compresi i materiali biologici, può essere descritto sia dalla conduttività (σ , in S/m), che quantifica la facilità con cui i portatori di carica delocalizzati possono muoversi attraverso il campione, sotto l'influsso di un campo elettrico applicato, sia dalla permittività (ϵ , in F/m) che indica la polarizzabilità del materiale, cioè della sua propensione a immagazzinare carica [143].

$$\epsilon = \epsilon' - j\epsilon''$$

La parte reale della permittività ϵ' indica la quantità di energia elettromagnetica memorizzata in un materiale, rispetto a quella conservata nel vuoto. La parte immaginaria della permittività $j\epsilon''$ è un coefficiente di sottrazione, che descrive la perdita dielettrica nel materiale [143].

$$\epsilon'' = \sigma / \epsilon_0 \omega$$

dove σ è la conducibilità totale del materiale, ϵ_0 è la permittività dello spazio libero, ed ω è la frequenza angolare del campo.

Le proprietà dielettriche di sangue, come quelle di tutti i tessuti, non sono costanti nelle varie frequenze; esse, infatti variano in base alla frequenza: questo fenomeno è detto dispersione. Ci sono molte zone di dispersione, cioè gamme di frequenza in cui alcuni meccanismi (macromolecole, molecole d'acqua, ecc) determinano preferenzialmente le proprietà dielettriche del mezzo [143].

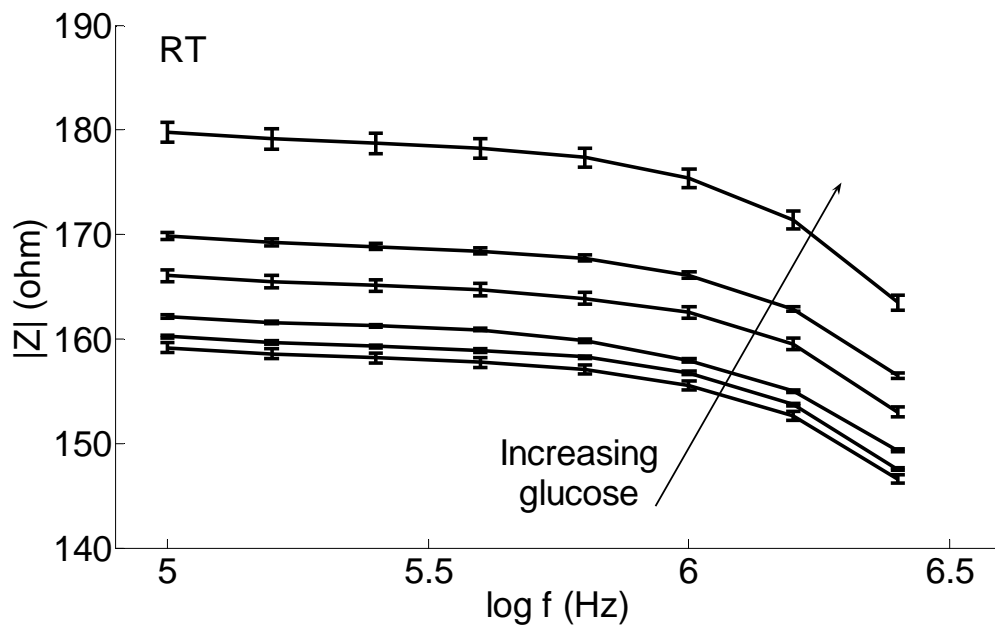
3.2 Metodi impedenziometrici per l'approccio alla misura non invasiva della glicemia.

3.2.1 Risultati

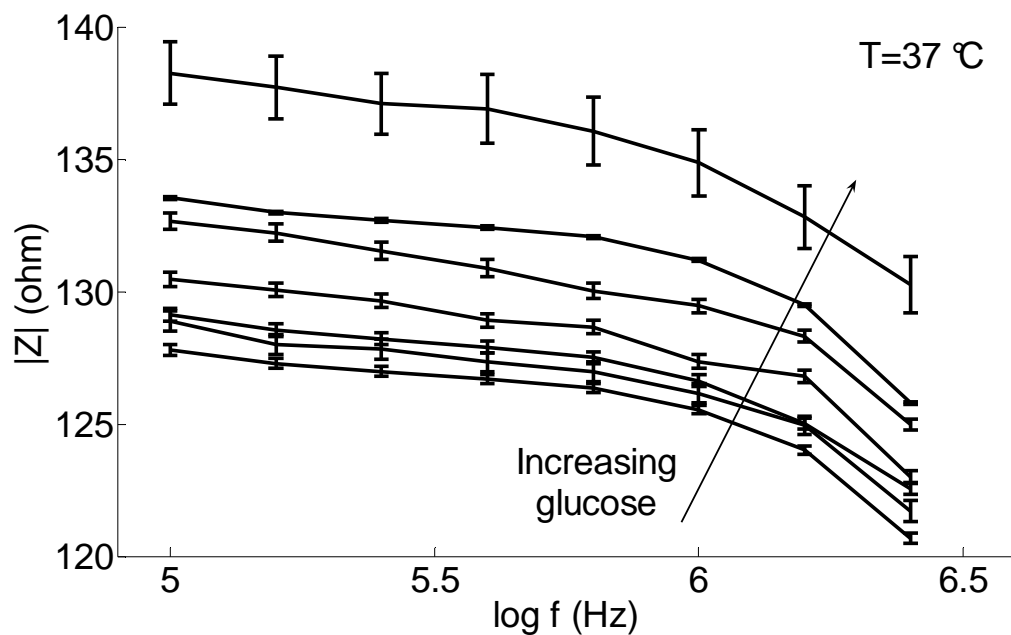
Spettroscopia di impedenza per la misura delle proprietà dielettriche di soluzioni di NaCl a diverse concentrazioni di glucosio.

Il modulo di impedenza dei campioni a temperatura ambiente è riportato in fig.14 il modulo aumenta con l'aumentare dei valori di concentrazione di glucosio in tutta la gamma di frequenze studiate, anche se le differenze a basse concentrazioni di glucosio sono

risultate modeste. Risultati simili sono stati trovati per il set di esperimenti eseguiti alle diverse temperature: per esempio la figura 14 b mostra il modulo di impedenza su tutta la gamma di frequenza studiata a 37 °C.



a)



b)

Fig.14: Modulo di impedenza dei campioni di soluzione fisiologica sola e con glucosio aggiunto a concentrazioni da 5000 a circa 78 mg/dl, a temperatura ambiente (a) e a 37 °C (b). i dati riportati sono media \pm SE

La figura 15 mostra i valori di impedenza misurata a 1 MHz (valore centrale rispetto alla gamma di frequenze investigate), in funzione della concentrazione di glucosio a temperatura ambiente e a 37 °C. Le due curve mostrano un andamento pressoché parallelo, con una diminuzione dei valori di impedenza nei campioni a temperatura più alta. Tale diminuzione rimane sostanzialmente costante a qualsiasi valore di concentrazione di glucosio. Le pendenze delle curve, come stimato dalla regressione lineare, sono di circa 4,6 e 3.2 mΩ/(mg/dl), rispettivamente per i campioni a temperatura ambiente e a 37 °C. I valori di R della regressione lineare trovati sono rispettivamente di 0,98 e 0,99.

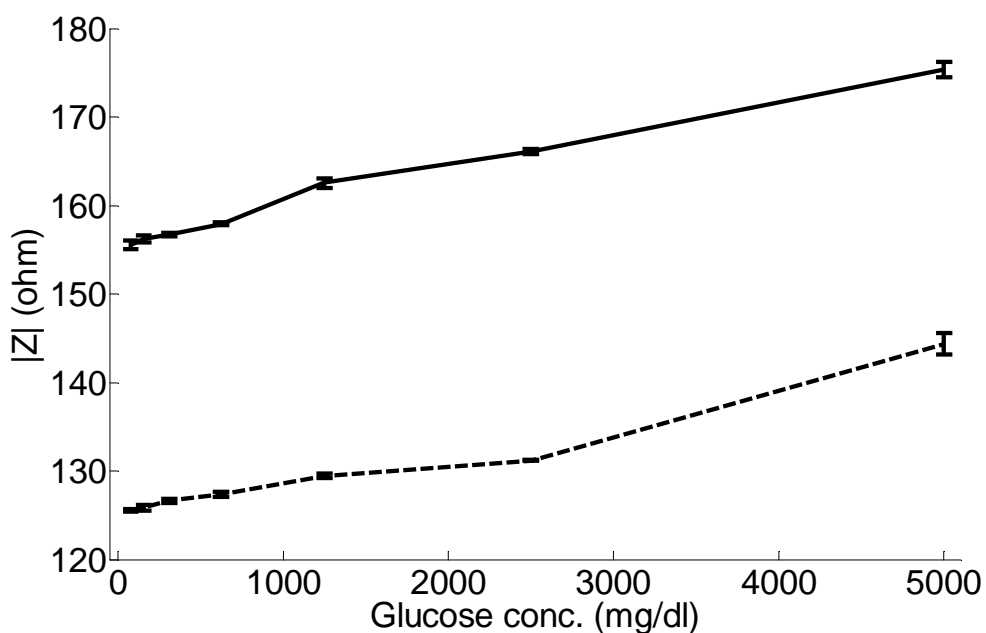


Fig.15: Modulo di impedenza dei campioni in funzione della concentrazione di glucosio a 1 MHz. I risultati a due diverse temperature sono indicati: curva continua = temperatura ambiente; curva tratteggiata = 37 °C.

La figura 16 mostra i risultati ottenuti in condizioni statiche e dinamiche per il campione a 78 mg/dl a tutte le temperature testate. Per ogni temperatura, l'impedenza in condizioni statiche e dinamiche è praticamente la stessa, come si può vedere dalle curve quasi sovrapposte; risultati simili sono stati ottenuti per gli altri campioni, a differenti concentrazioni di glucosio (dati non riportati). Questo risultato è stato confermato dal test statistico, attraverso il quale non abbiamo trovato differenze statisticamente significative tra il modulo di impedenza (a 1 MHz) in condizioni statiche e quello in condizioni dinamiche, per tutti i campioni a diverse concentrazioni di glucosio, in ciascuna delle

diverse temperature. La tabella 1 riporta il modulo dell'impedenza del campione a 78 mg/dl di glucosio, alle diverse temperature.

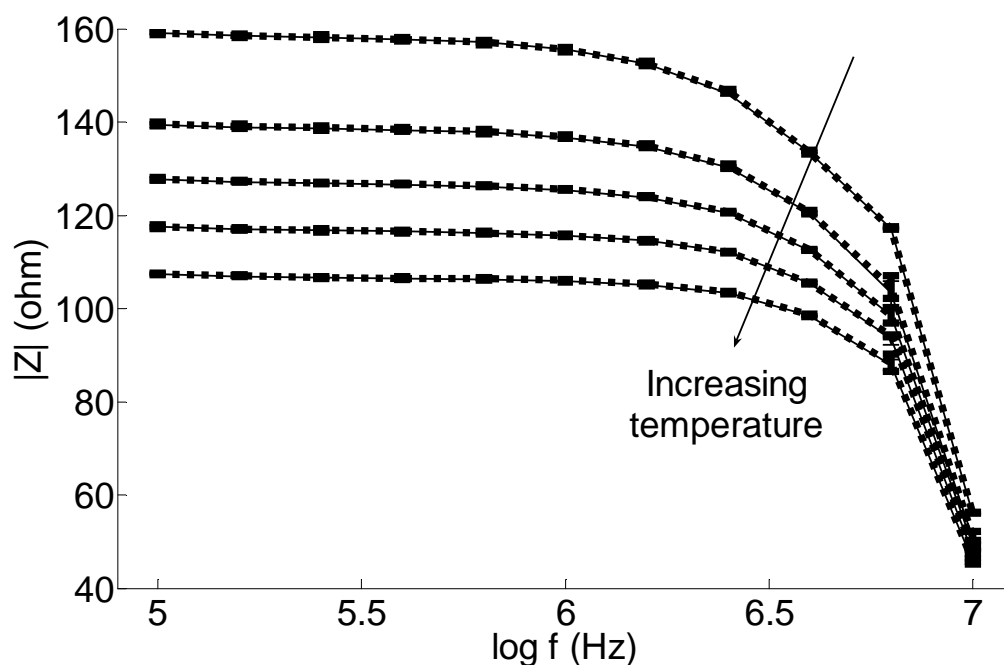


Fig.16: Spettro del modulo di Impedenza per i campioni a 78 mg / dl, in condizioni statiche (curva tratteggiata) e dinamiche (curva continua) condizioni a temperatura ambiente e al 32, 37, 42, 47 °C (dall'alto verso il in basso). I dati riportati sono media \pm SE

Temperature	RT		32		37		42		47	
	Static	Dynamic	Static	Dynamic	Static	Dynamic	Static	Dynamic	Static	Dynamic
Test 1	156,11	156,10	136,38	136,08	125,34	125,27	115,99	116,25	105,99	105,81
Test 2	155,71	155,69	137,38	136,94	125,47	125,78	115,73	115,56	106,23	105,62
Test 3	155,35	155,42	137,07	137,12	125,67	124,96	115,48	115,48	106,03	105,73
Test 4	155,08	155,11	136,91	136,84	125,67	125,67	115,42	115,39	105,60	105,90

Tab.1: Valori a 1 MHz per il campione a 78 mg/dl glucosio a diverse temperature in condizioni statiche e dinamiche. Il range di P per le coppie di valori in condizioni statiche/dinamiche dei valori va da 0,14-0,72 (non significativo).

Spettroscopia di impedenza di soluzioni di acqua, NaCl e sangue bovino a diverse concentrazioni fisiologiche di glucosio.

Il modulo e la fase dell'impedenza sia dei campioni d'acqua, sia delle miscele di glucosio e acqua, sono riportati in figura 17.

Il modulo cresce all'aumentare dei valori di concentrazione di glucosio in una vasta gamma di frequenze, anche se le variazioni non sono state lineari: un incremento della concentrazione di 100 mg/dl di glucosio non ha prodotto variazioni di impedenza della stessa grandezza (questa non linearità è stata osservata anche nei campioni cloruro di sodio nel sangue, come illustrato in seguito). La fase, invece, decresce con l'aumento dei valori di glucosio, anche se la variazione è meno marcata di quella osservata nel modulo. Nello specifico, il *range* di frequenza dove le differenze nel modulo sono più evidenti è stato l'intervallo 0,1-800 Hz (lo definiremo come *range* di riferimento).

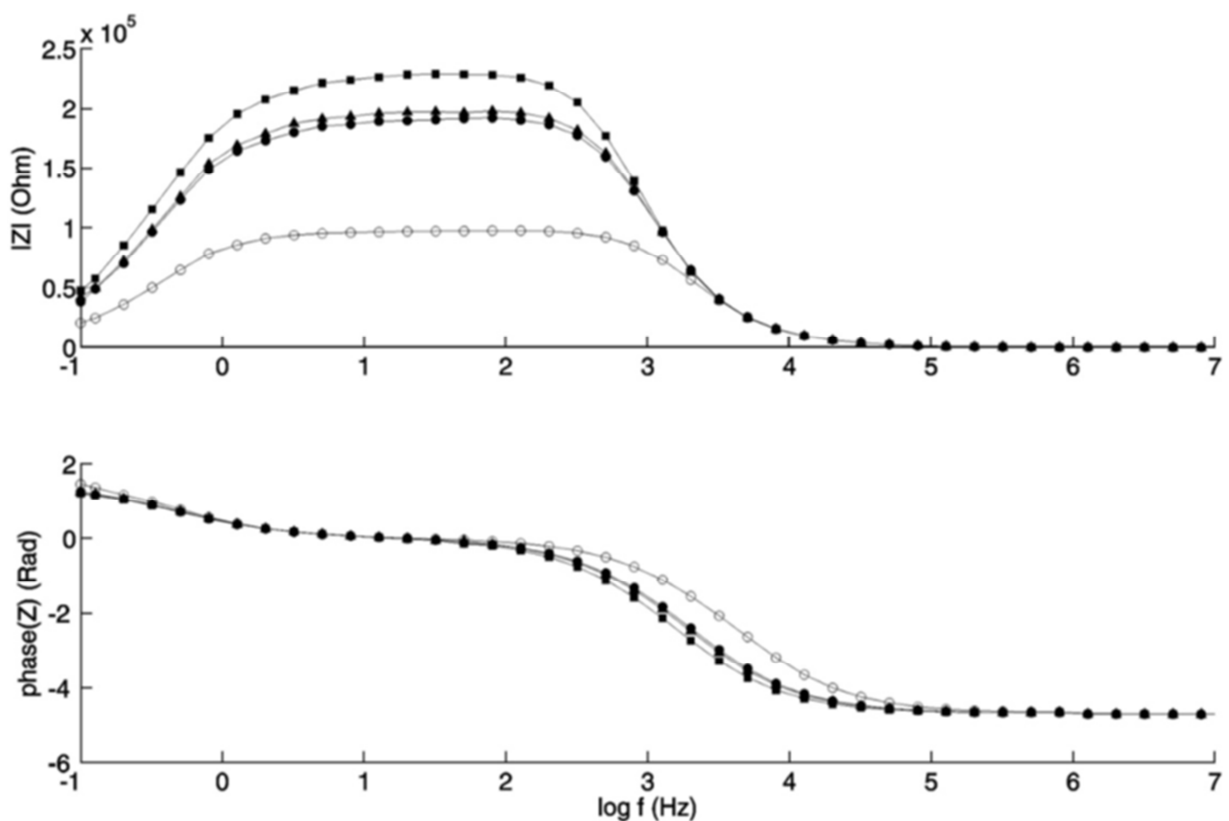


Fig.17: Modulo dell'Impedenza (in alto) e fase (in basso) per i campioni d'acqua e glucosio (cerchio vuoto: acqua pura, al punto di partenza: 100 mg / dl glucosio; triangolo: 200 mg / dl di glucosio; quadrati: 300 mg / dl di glucosio).

Fuori da questo intervallo, le differenze sono meno chiare: le curve di modulo, infatti, mostrano intersezioni relativamente frequenti per alcuni valori di frequenza. Per quanto riguarda la fase, il *range* di riferimento è stato: 80 Hz-10⁷Hz anche se, a partire da 10⁵ Hz in poi, le differenze osservate sono state piccole. Ciò nondimeno, in tutta la gamma di frequenze studiate è stata osservata una variazione evidente, in almeno uno dei due parametri di impedenza, conseguentemente all'aumento dei valori di concentrazione di glucosio. La differenza, in percentuale, tra i valori del campione bianco (cioè senza glucosio) e quelli alla concentrazione più alta di glucosio è riportata in tabella 2, per ciascuno modulo e fase nel loro *range* di riferimento.

	Glucose-water	Glucose-blood	Glucose-sodium chloride
<i>Modulus</i>			
Difference (%)	125±17 [135; 63]	2.00±0.09 [2.24; 1.68]	1.41±0.24 [1.69; 0.56]
<i>Phase</i>			
Difference (%)	43±56 [157; 0.1]	1.51±0.11 [1.60; 1.27]	51±33 [73; 13]
Max. total difference (%)	291	3.69	75
Frequency for max.	80	5.1 · 10 ⁵	1.3 · 10 ⁴
total difference (Hz)			

Tab.2: Media ± deviazione standard della differenza percentuale tra i campioni a concentrazione di glucosio nel minimo e massimo sia per modulo che per fase nelle loro gamme di frequenza di riferimento.

Per quanto riguarda il sangue, l'impedenza del campione con glucosio endogeno e quella dei campioni con l'ulteriore aggiunta di glucosio esogeno è riportato in figura 19. Guardando le curve del modulo e della fase nella loro interezza, non si apprezza una variazione marcata e le curve sembrano completamente sovrapposte. Tuttavia, se l'analisi si concentra su una gamma specifica di frequenze emergono alcune differenze. Infatti, in una sufficientemente ampia gamma di frequenze, vale a dire $8 \cdot 10^2 - 2 \cdot 10^6$ Hz, si può apprezzare una differenza lieve ma evidente nel modulo dell'impedenza: come osservato nei campioni di glucosio e acqua, il modulo aumenta all'aumentare della concentrazione di glucosio in tutta la gamma specificata (fig.18, in alto a destra). Al di fuori del *range* di

riferimento riportato, la curve del modulo hanno mostrato frequenti intersezioni; un risultato simile è emerso per la fase, di nuovo in una gamma relativamente ampia di frequenza, $2 \cdot 10^5 - 8 \cdot 10^6 \text{ Hz}$, abbiamo osservato un leggero calo della fase all'aumentare della concentrazione di glucosio nell'intera gamma (dati non riportati).

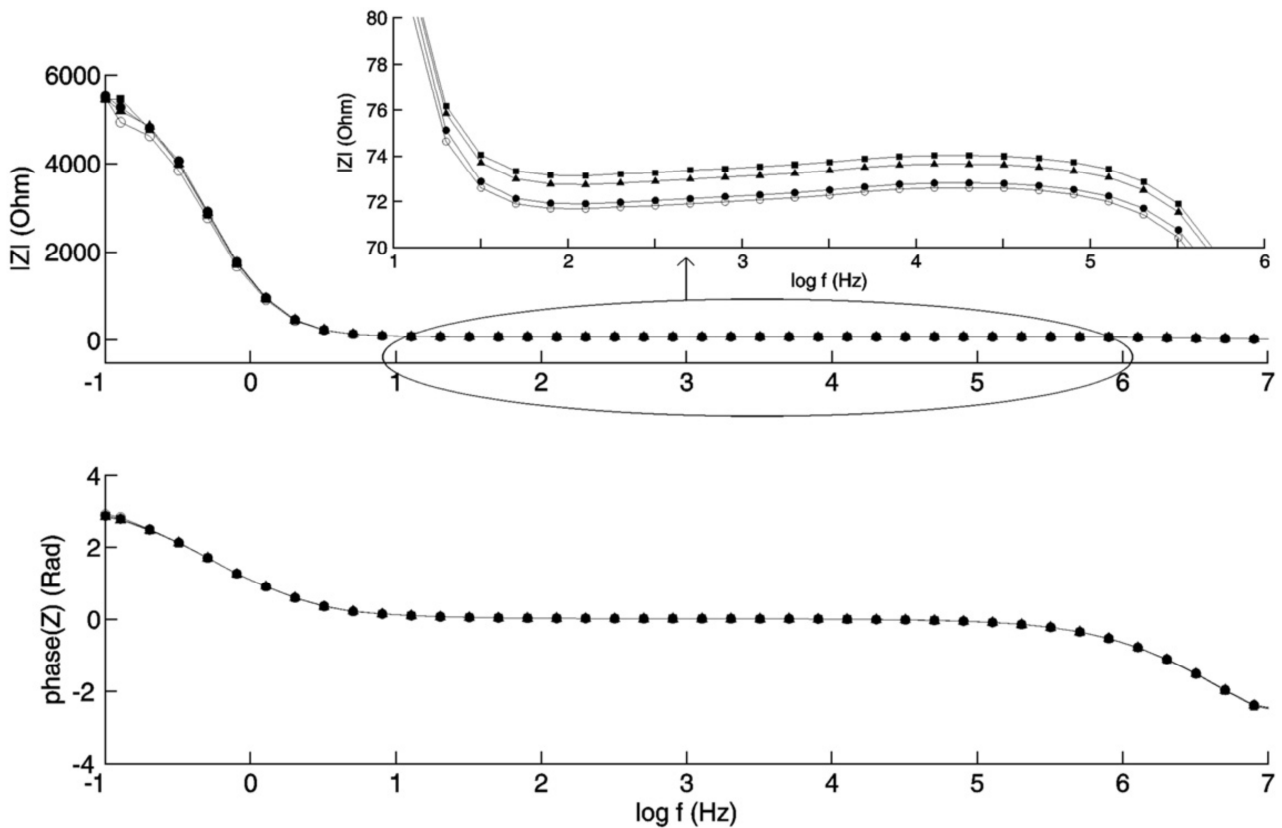


Fig.18: Modulo dell'Impedenza (in alto) e fase (in basso) per i campioni di glucosio- sangue (dal basso; cerchio vuoto: sangue a glucosio basale (65 mg/dl); cerchio completo: 100 mg/dl glucosio; triangolo: 200 mg/dl glucosio; quadrati: 300 mg/dl di glucosio).

Si può dire che, in una gamma di frequenze, che copre quasi tutta la gamma studiata, almeno uno dei due, tra il modulo e la fase dell'impedenza ha mostrato variazioni chiare con l'aumento delle concentrazioni di glucosio. I campioni glucosio-cloruro di sodio hanno mostrato modelli di impedenza simili a quelli osservati nei campioni di sangue (figura 19). Ancora una volta, alcune differenze nei parametri di impedenza sono emerse quando è stato considerato un intervallo di frequenze specifico. Nella gamma di frequenze $80 - 8 \cdot 10^6 \text{ Hz}$, il modulo mostra (in tutta la gamma) un leggero aumento col crescere delle concentrazioni di glucosio (figura 20, in alto a destra), la fase, invece, decresce nell'intervallo $8 \cdot 10^3 - 2 \cdot 10^4 \text{ Hz}$ (non in figura). A differenza dei campioni di sangue, quasi tutto l'aumento del modulo è stato osservato tra i primi due campioni, cioè il campione in

bianco e quello a 100 mg/dl. La differenza percentuale tra i valori del campione di bianco e quello alle concentrazioni più alte di glucosio sono riportate nella tabella 2.

E' da notare anche che le differenze di percentuale per la fase erano molto più alte rispetto a quanto riscontrato nei campioni di sangue.

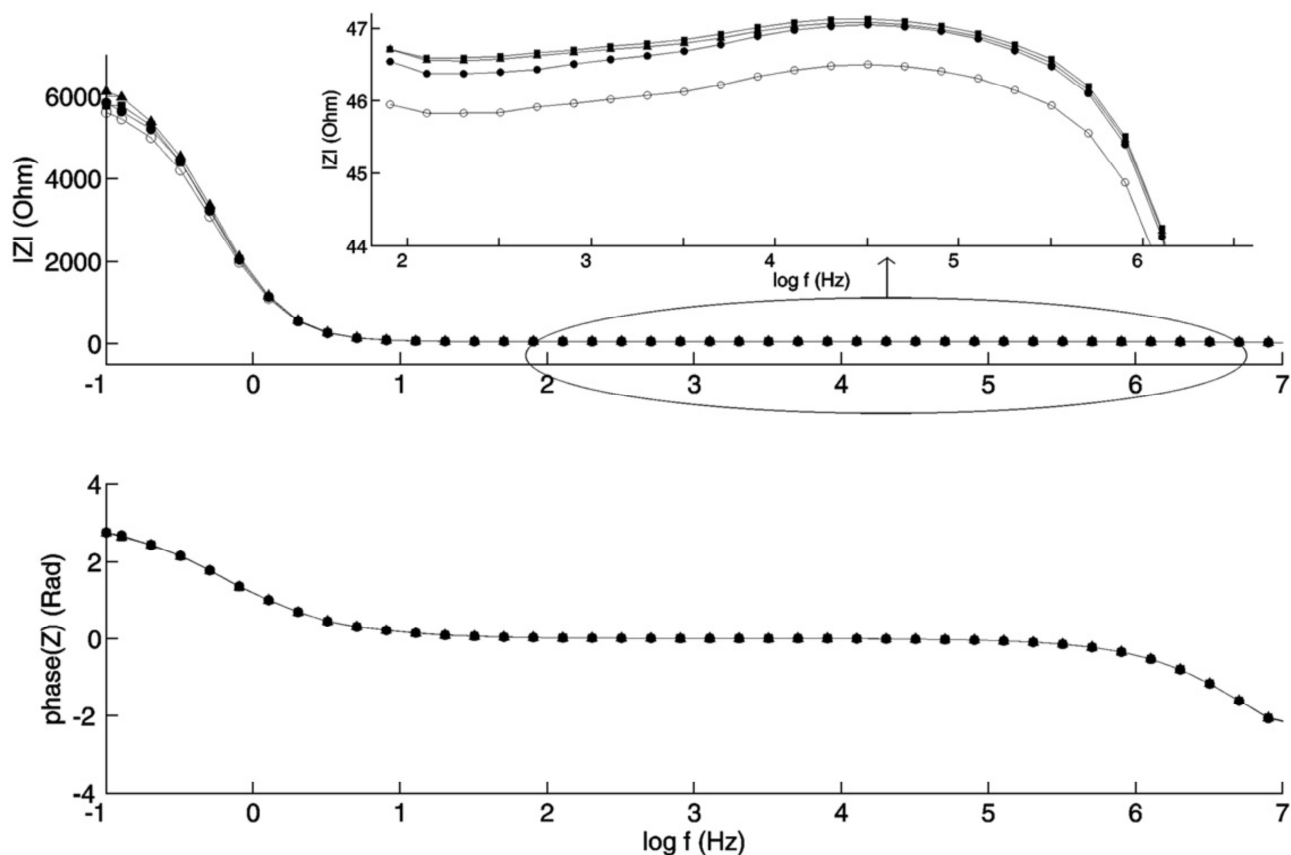


Fig.19. Modulo dell'Impedenza (in alto) e fase (in basso) per i campioni di cloruro di sodio glucosio- (cerchio vuoto: cloruro di sodio puro 0,9%; cerchio completo: 100 mg / dl di glucosio; triangolo: 200 mg / dl glucosio; quadrati: 300 mg / dl di glucosio).

Tuttavia, questo risultato può essere influenzato dal fatto che, nel *range* di riferimento, il valore di fase era molto basso (valore medio pari a -0,0021 rad) e anche un piccolo errore di misura può avere avuto una grande influenza sul calcolo della differenza di percentuale, che può essere così risultata erroneamente elevata.

3.2.2 *Discussione*

In questo lavoro [93] gli autori hanno affermato che la misurazione della glicemia, tramite spettroscopia di impedenza, è resa possibile dal fatto che le variazioni della concentrazione di glucosio nel sangue inducono un trasporto elettrolitico attraverso la

membrana cellulare (soprattutto degli eritrociti) e, come conseguenza di questo processo, possono essere osservate variazioni nelle proprietà dielettriche del mezzo in esame. Il fenomeno più rilevante legato a questo processo sembra essere l'abbassamento dei livelli di sodio nel sangue in presenza di uno stato di iperglicemia [91]. In [93-144] si è affermato che questi effetti sono interamente responsabili delle variazioni di impedenza del sangue e dei tessuti sottostanti, dato che le variazioni di glucosio non influenzano direttamente le proprietà dielettriche del mezzo indagato (almeno nella banda MHz). Tuttavia, alcuni recenti studi contraddicono questi risultati: in [145] ad esempio, le proprietà dielettriche di soluzioni con glucosio e acqua sono state trovate diverse per valori variabili di concentrazione di glucosio all'interno del *range* fisiologico: si è osservato un aumento nel modulo di impedenza con l'aumento delle concentrazioni di glucosio nella banda 1 kHz -1 MHz.

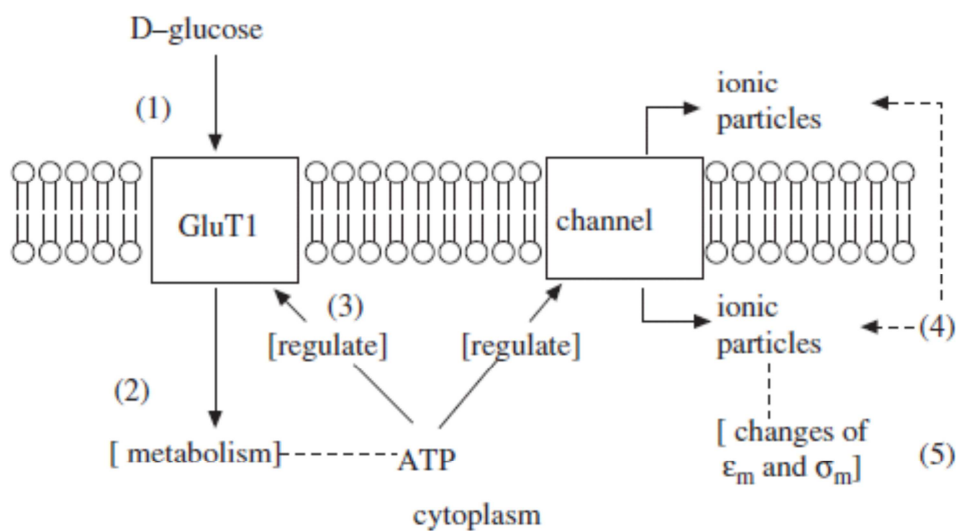


Fig.20: Schema del modello ipotetico causato dall'iperglicemia [144]

Nei nostri studi sono stati analizzati diversi aspetti dei cambiamenti di impedenza di soluzioni di cloruro di sodio, acqua e sangue a diverse concentrazioni di glucosio e in diverse condizioni.

L'interesse per la soluzione di cloruro di sodio allo 0,9% è dovuto sia al fatto che possiede una pressione osmotica molto vicina a quella del plasma, e una conducibilità simile a quella del sangue, tant'è che abbiamo anche misurato la conducibilità della soluzione sodio cloruro 0,9% con un conduttimetro semplice (Orion) e trovato un valore di 15,60 mS/cm (a temperatura ambiente), dato non lontano dai valori riportati in letteratura per il

sangue [146]. Abbiamo analizzato soluzioni a diverse concentrazioni di glucosio a cinque diverse temperature, tra cui anche la temperatura tipica dei fluidi corporei umani (22, 32, 37, 42, 47 °C), sia in condizioni statiche che dinamiche, quest'ultime, tra l'altro, simulano più specificatamente quello che avviene in un contesto *in vivo*. I risultati hanno mostrato che il modulo dell'impedenza dei campioni è stato influenzato dalle diverse concentrazioni di glucosio in tutte le frequenze studiate, confermando che le variazioni della concentrazione di glucosio, anche nel *range* fisiologico, influenzano le proprietà dielettriche delle soluzioni. Tuttavia, i cambiamenti nelle proprietà dielettriche sono stati di modesta entità; questo è osservabile, nelle concentrazioni di glucosio nel *range* fisiopatologico (da circa 100 a 300-400 mg/dl), in cui sono stati trovati, a temperatura ambiente, solo cambiamenti di alcuni mΩ/(mg/dl).

Questi risultati sono stati confermati anche quando la temperatura del campione è stata aumentata. Come previsto, in questi casi, i valori di impedenza, in funzione della concentrazione di glucosio, sono stati inferiori a quelli misurati a 22 °C (per gli esperimenti a 37 °C, la differenza media è stata di circa 35,9 Ω), ma è stato comunque possibile osservare un trend simile (vedi fig. 15). Per quanto riguarda le possibili differenze tra le condizioni statiche e dinamiche, esistono alcuni studi in letteratura circa le possibili differenze nello spettro di impedenza tra queste due condizioni, ma sono tipicamente focalizzati sullo studio delle principali caratteristiche delle membrane a scambio ionico [147-148]. A nostra conoscenza, vi è un solo studio [149] in letteratura che affronta il problema della misurazione del glucosio tramite impedenza, con analisi in condizioni statiche e dinamiche. Nello studio [149] è stata analizzata l'impedenza di campioni di sangue animale a diverse concentrazioni di glucosio, sia in condizioni statiche che dinamiche, alla stessa temperatura. Per alcune concentrazioni di glucosio, il campione in condizioni dinamiche ha mostrato una leggera diminuzione del valore di impedenza rispetto al campione in condizioni statiche, ma per altri valori è stato trovato un comportamento opposto. Gli Autori non hanno potuto fornire una chiara spiegazione di questi risultati. Nel nostro studio, non è stata trovata alcuna differenza tra condizioni statiche e dinamiche in ogni campione ad ogni temperatura testata. Le soluzioni utilizzate per i nostri esperimenti includono un soluto ionico (NaCl) completamente solvatato da molecole di solvente polare (H₂O), e anche la completa dissoluzione del glucosio contribuisce all'omogeneità della soluzione. La nostra ipotesi è che, in condizioni sperimentali che coinvolgono volumi relativamente piccoli (<100 ml) di soluzioni altamente

omogenee e molto conduttive, l'agitazione del campione tende a non influenzare la mobilità degli ioni, e quindi il flusso della corrente elettrica. In ogni caso, le differenze tra i nostri studi e [149], in base ai risultati riguardanti le possibili differenze tra i dati statici e dinamici, possono essere dovute alle differenze nel tipo di soluzioni.

I risultati di tutti i nostri esperimenti confermano, sostanzialmente, quelli dello studio [145] ma in una più ampia gamma di frequenze: infatti, in tutta la gamma indagata, (ossia 0,1 Hz-10 MHz), abbiamo osservato una variazione significativa nel modulo di impedenza, nella fase, o in entrambi, anche se le differenze maggiori sono state riscontrate per frequenze inferiori a 100 kHz. Possiamo, quindi, affermare che variazioni nella concentrazione di glucosio, anche a valori bassi come quelli fisiologici, modificano direttamente le proprietà dielettriche di una soluzione, indipendentemente da altri meccanismi che possono essere indirettamente indotti. E' stato anche confermato che le variazioni di impedenza risultano chiaramente più evidenti alle basse frequenze, e questo può spiegare, in parte, perché non siano state osservate negli studi [150, 151], in cui erano indagate solo le frequenze superiori a 1 MHz.

Si deve, inoltre, osservare che le differenze parziali tra i nostri risultati e quelli dello studio [145] possono essere dovute all'utilizzo di una diversa sonda. Per i nostri esperimenti è stata scelta una sonda a quattro elettrodi, meno incline agli effetti del rumore di fondo a frequenze medio-alte [136]. Inoltre, la nostra sonda utilizza elettrodi di platino al posto dei classici in acciaio inossidabile, questi ultimi sono più sensibili agli effetti delle possibili reazioni con la soluzione a basse frequenze. Un'unica limitazione della nostra sonda può essere il fattore k della cella di misura, $0,7 \text{ cm}^{-1}$; per le misure di impedenza in soluzioni a conducibilità relativamente alta, come sangue o sodio cloruro 0,9%, un fattore k maggiore potrebbe essere più adeguato. I risultati presentati qui potrebbero inoltre essere stati influenzati da fenomeni di polarizzazione degli elettrodi. Tuttavia, questo aspetto influenzerebbe solo una minima parte dei valori a bassa frequenza dove l'effetto di polarizzazione è più rilevante; infatti, è improbabile che avvengano questi effetti a frequenze superiori a un centinaio di kHz.

In letteratura, si trovano pochi casi di studi concentrati su misure di impedenza sul sangue in relazione alle concentrazioni di glucosio, pur essendo questo un argomento citato in molti lavori. In [93] sono riportati dati di impedenza ottenuti da esperimenti *in vivo* sull'uomo, con valori di glicemia di 100 e 200 mg/dl, anche se sono state indagate solo le frequenze superiori a 1 MHz; il risultato è stato che, per alcune gamme di frequenza, sia il

modulo dell'impedenza che la fase erano differenti tra le due concentrazioni di glucosio, e similmente ai nostri risultati valori più alti sono stati trovati a concentrazioni più alte di glucosio. Per quanto riguarda il modulo, che è stato il parametro di maggior interesse, gli autori affermano che la sensibilità è tra i 20 e 60 mg/dl di glucosio / Ω ; questi risultati sono sufficientemente in accordo con i nostri, anche se la sensibilità che abbiamo riscontrato è stata leggermente inferiore: tra i campioni a 100 e 200 mg/dl abbiamo rilevato circa 110 mg/dl di glucosio / Ω (100 mg/dl: 72,2 Ω , 200 mg/dl: 73,1 Ω), a frequenze di circa 1 kHz.

In [94] le proprietà dielettriche di campioni di sangue con glucosio in una vasta gamma di concentrazioni, sono state analizzate tramite un sensore costituito da due bobine ad induzione accoppiata attraverso due tubi di vetro contenenti sangue suino. Nonostante l'ampio intervallo di concentrazione di glucosio che è stato studiato compresi anche valori non fisiologici (da 130 mg/dl fino a 10 g/dl), le differenze osservate sono state deboli, solo 17,72% tra i valori estremi dell'intervallo analizzato.

Alcuni studi già citati hanno poi indagato le proprietà dielettriche di soluzioni di buffer PBS a diverse concentrazioni di glucosio in una sospensione di eritrociti [144]. In questo articolo le concentrazioni di glucosio considerate vanno da zero a circa 400 mg /dl, e le analisi sono state effettuate tra 10 kHz e 100 MHz. Sebbene siano state trovate variazioni nelle proprietà dielettriche del buffer per le diverse concentrazioni di glucosio, tuttavia i risultati non mostrano un trend coerente nelle variazioni per valori crescenti di glucosio, diversamente dai nostri risultati. Gli autori hanno sostenuto che questo comportamento potrebbe dipendere dall'attività a livello della membrana degli eritrociti, ma non vi sono ulteriori dettagli forniti a tal proposito.

Nel nostro studio le maggiori variazioni nei parametri di impedenza a diversi valori di glucosio sono stati osservati solo in acqua, suggerendo che la capacità del glucosio di indurre variazioni nelle proprietà dielettriche della soluzione può dipendere dai livelli di conduttività coinvolti. Infatti, sia nel sangue che nelle soluzioni di sodio cloruro, che hanno conducibilità molto superiori all'acqua, le variazioni di impedenza sono risultate modeste se confrontate a quelle osservate in acqua. Questo può anche spiegare le variazioni leggermente più alte nel modulo di impedenza (che è più rilevante rispetto alla fase) osservate nel sangue rispetto alla soluzione fisiologica, visto che il primo è leggermente meno conduttivo rispetto al secondo. Anche se non si può escludere che le differenze siano dovute ai fenomeni indiretti, descritti sopra, che coinvolgono gli eritrociti.

Un altro fattore di variabilità nei campioni di sangue può essere l'approccio scelto per la preparazione del campione e l'aggiunta dei componenti esogeni per bloccarne i processi biochimici di interesse. Tuttavia, i campioni di sangue sono stati tutti analizzati a partire dallo stesso contenitore da 500 ml (dove il sangue è stato trattato con ossalato di potassio e fluoruro di sodio), siamo certi quindi che possibili effetti dei composti esogeni siano stati simili in tutti i campioni. Inoltre possiamo affermare che non ci sono differenze di impedenza tra le condizioni statiche e dinamiche (testate per la soluzione più conduttiva) e alle diverse temperature analizzate, e per i volumi limitati e tipi di soluzioni utilizzate nello studio.

Nonostante i risultati che le variazioni di concentrazione di glucosio inducono sulle misure di impedenza, l'utilità pratica di tali risultati per il monitoraggio non invasivo della glicemia rimane ancora da dimostrare. Infatti, questo studio non ha valutato se l'approccio con la spettroscopia di impedenza può essere in grado di distinguere tra valori di concentrazione di glucosio relativamente simili, ma con significato clinico molto differente.

Le problematiche per un approccio *in vivo* rimangono, soprattutto, relative alla sede di collocazione degli elettrodi, che ovviamente implica la misura attraverso i tessuti, con tutti i fattori confondenti dovuti ai fenomeni fisiologici, senza contare le implicazioni nel *turn over* delle strutture cellulari e tissutali [57], microcircolazione, fenomeni infiammatori e la variazione di ematocrito[152]. Tutte queste problematiche si inseriscono in un contesto di forte variabilità individuale, che va certamente considerato in un'ottica di sviluppo di uno strumento, sarebbe quindi certamente necessaria un'un'auto-calibrazione dell'apparecchio per misurare solo il delta delle variazioni.

In conclusione, possiamo dire che vi sono in letteratura pochi studi che hanno dimostrato le variazioni di impedenza del sangue per le diverse concentrazioni di glucosio entro l'intervallo fisiologico e, a nostra conoscenza, nessuno studio ha esaminato in dettaglio la banda di frequenza dei valori sotto i MHz: questa è una delle novità principali del nostro metodo. Per possibili applicazioni cliniche il vantaggio di concentrarsi su valori sotto i MHz può consistere in una minore sensibilità ai segnali elettromagnetici ambientali. Inoltre, non esiste in letteratura alcuno studio concentrato su l'impedenza di soluzioni di glucosio e cloruro di sodio.

3.3 Misura indiretta della concentrazione di glucosio tramite sensore elettromagnetico a bassa frequenza: esperimenti *in vitro* in diverse soluzioni conduttive.

3.3.1 Risultati

La tensione di uscita del sensore elettromagnetico in funzione della concentrazione del set di campioni di glucosio in sodio cloruro 0,9%, 1%, 1,1% e 1,2% è riportato in figura 21 (per ogni campione è mostrato il valore medio tra le misure effettuate).

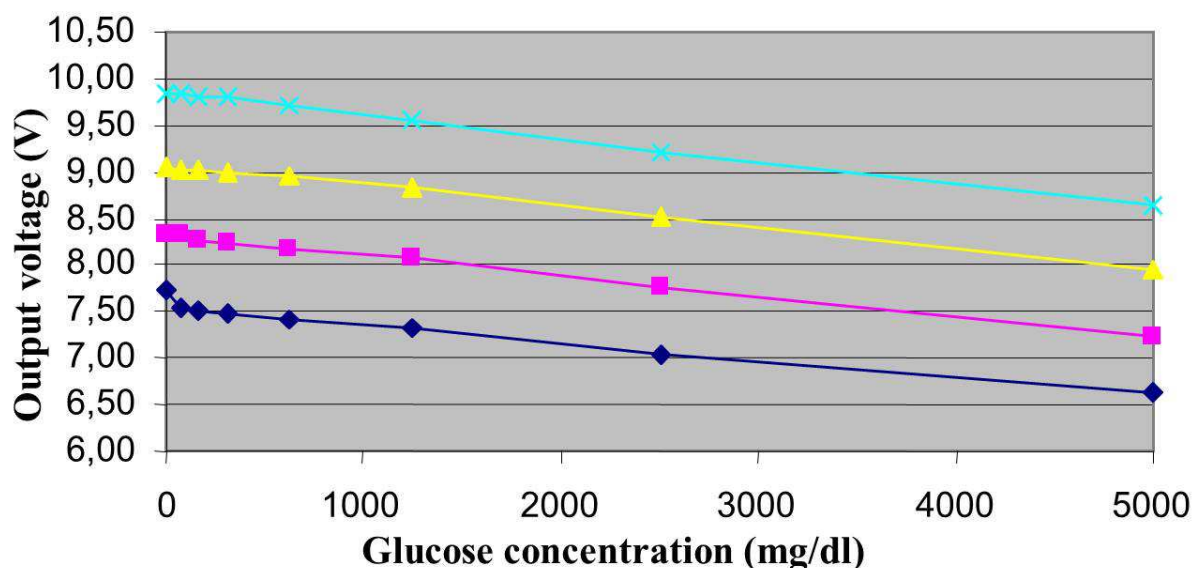


Fig.21: Tensione di uscita del sensore elettromagnetico in relazione alla concentrazione di glucosio dei campioni nel gruppo di sodio cloruro 0,9% (rombo), 1,0% (quadrato), 1,1% (triangolo), 1,2% (simbolo x), a temperatura ambiente e con la pompa alimentata a 10 V.

Si può notare che in ogni serie di campioni, su tutta la gamma dei valori esaminati, la tensione di uscita dipende dalla concentrazione di glucosio del campione e decresce quasi linearmente con l'aumento dei valori di glucosio. Infatti, per quanto riguarda l'insieme di risultati del sodio cloruro 0,9%, l'analisi di regressione ha fornito un alto valore R^2 ($R^2 = 0,97$, $p < 0,0001$) e risultati simili sono stati trovati per gli altri tre set (non riportati per brevità). Abbiamo anche calcolato un "indice di sensibilità" per le variazioni di glucosio, pari a $S = \Delta V / \Delta G$, dove ΔV è la differenza totale della tensione di uscita, e ΔG è la variazione totale nel *range* di glucosio. Nel set di misure dell'NaCl 0,9%, ΔV è stato 1,11 V, mentre ΔG 5.000 mg/dL, dunque $S = 0,22$ mV/(mg/dL).

E' da notare che, a causa della quasi linearità della curva output-glucosio, S ha avuto valori molto simili quando calcolato in piccoli intervalli della gamma di glucosio: per

esempio, se si considera l'intervallo di glucosio ~78-625 mg/dL, il calcolo di S ha fornito 0,21 mV/(mg/dL). Risultati simili (non riportati) sono stati trovati per gli altri tre set di campioni.

La relazione tra la tensione di uscita del sensore elettromagnetico e la concentrazione di glucosio nel set di campioni di Ringer lattato è illustrato in figura 22. Ancora una volta, abbiamo trovato una chiara diminuzione nell'output del segnale all' aumentare dei valori di glucosio, anche se il rapporto in questo caso sembra essere non lineare, almeno nella prima parte del *range* di glucosio.

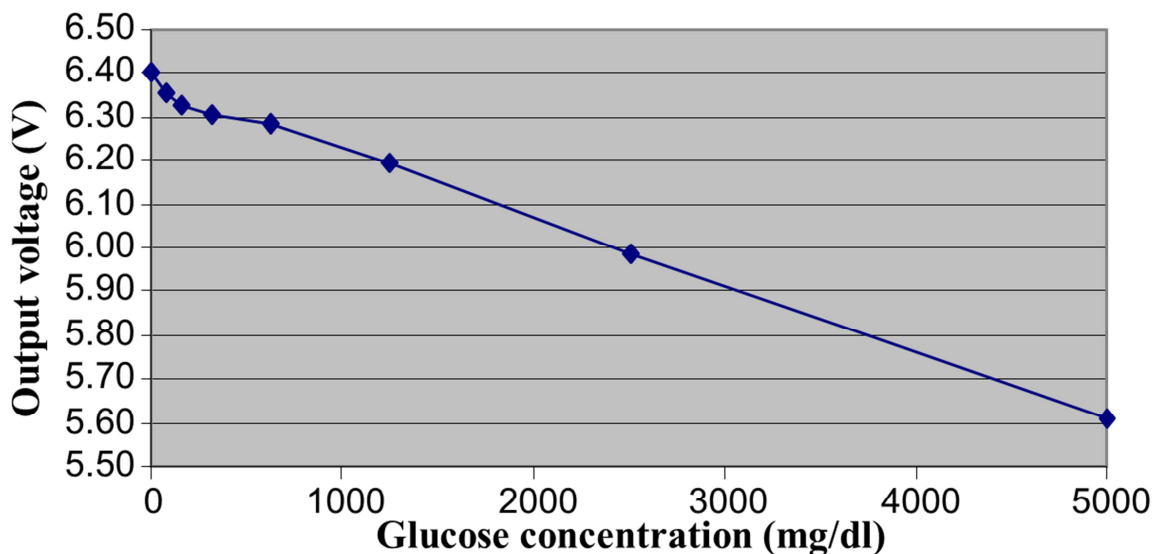


Fig.22: Tensione di uscita del sensore elettromagnetico in relazione alle concentrazioni di glucosio in campioni in Ringer lattato, a temperatura ambiente e con la pompa alimentata a 10 V.

Per quanto riguarda l'effetto delle variazioni di temperatura sulla tensione di uscita, come ci si aspettava un aumento dell'*output* (cioè, una maggiore conduttività) corrisponde all'aumento dei valori di temperatura (figura 23). Questo è stato riscontrato sia sul campione di glucosio a concentrazione più elevata (2500 mg / dL) che in quello a concentrazione minore (~156 mg/dL), in ogni set sperimentale. Le variazioni sono state misurate nel range 1,4-1,6% /°C e questi risultati concordano con quanto riportato in letteratura per le variazioni di conducibilità temperatura-indotte, di soluzioni di cloruro di sodio [153].

La differenza nella tensione in uscita del sensore elettromagnetico, a causa della velocità di flusso (da nessun movimento fino a circa 30 cm/s), è risultato essere di piccole dimensioni in tutti i set, a qualsiasi concentrazione di glucosio. Di fatto, la deviazione

standard delle quattro misure, a diverse condizioni di velocità, è in media di soli 17 mV, per tutti i campioni analizzati in questo studio.

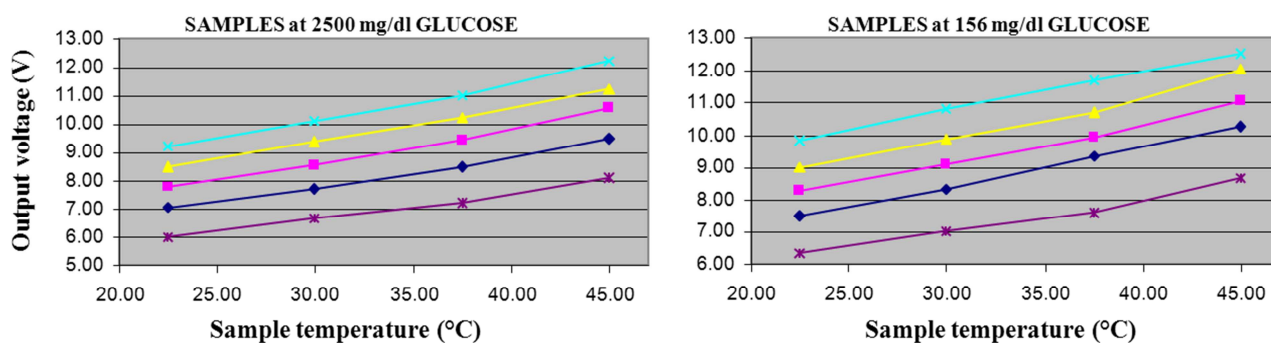


Fig.23: Tensione di uscita del sensore elettromagnetico in relazione alla temperatura (temperatura ambiente, 30 °C, 37,5 °C, 45 °C) in Ringer latta to (stella), in il cloruro di sodio allo 0,9% (rombo), 1,0% (quadrato), 1,1% (triangolo), 1,2% (simbolo x), per la concentrazione di glucosio fisso di 2.500 mg / dL (a sinistra) e ~156 mg/dL (a destra), con pompa alimentata a 10 V.

Per ricavare l'indicazione della differenza minima di concentrazione di glucosio misurabile con il nostro approccio, ci siamo basti sulla ripetibilità di 10 misure effettuate sul cloruro di sodio allo 0,9% a ~78 mg/dL di glucosio; considerando tre volte la deviazione standard di queste misure, e dato il valore di S riportato sopra, abbiamo ottenuto un valore di ~30 mg/dL, che pur non essendo un valore trascurabile, tuttavia include non solo l'imprecisione del sensore, ma anche le possibili incertezze in alcune fasi della procedura sperimentale (in particolare, imprecisione nella diluizione). Per quanto riguarda le misure ottenute con il conduttimetro commerciale, abbiamo trovato i risultati in ottimo accordo con quelli ottenuti con il sensore elettromagnetico. La media del valore di conducibilità nei 12 campioni misurati è stata 16,04 mS/cm (deviazione standard, SD = 2.10); il valore medio corrispondente trovato con il sensore elettromagnetico era 15,40 mS / cm (SD = 1.94). La retta di regressione è $Y = 0,91 x + 1,03$, $R^2 = 0,99$, $p < 0,0001$. Il grafico Bland-Altman plot (non mostrato) non ha mostrato punti di fuori dai limiti di *agreement*.

3.3.2 *Discussione*

In questa parte di tesi, abbiamo presentato un nuovo sensore elettromagnetico, analizzandone le capacità in un contesto *in vitro*, per stimare le variazioni della concentrazione di glucosio, in soluzioni che hanno alcune similitudini con il sangue, cioè, cloruro di sodio e Ringer lattato. Le motivazioni relative alla scelta della soluzione fisiologica come modello sperimentale sono descritti nei paragrafi precedenti, e sono simili per quanto concerne il Ringer lattato: questa è, infatti, una soluzione isotonica con il

sangue, ed ha una composizione chimica simile a quella dei fluidi interstiziali; impiegata principalmente nella la terapia parenterale conseguente alla perdita di liquidi, a causa di ferite, ustioni o interventi chirurgici, ma è anche usata per stimolare la minzione in soggetti con malattie renali e quando devono essere corretti alcuni stati di acidosi lieve o moderata. Nel quadro delle metodologie basate sulla misura delle proprietà dielettriche dei tessuti umani, questo studio può essere considerato il primo passo per verificare se il nostro sensore elettromagnetico sia adeguato come base per un approccio non invasivo per il monitoraggio della glicemia,.

In questa analisi *in vitro*, abbiamo studiato diverse soluzioni con valori di concentrazione di glucosio che variano da 5.000 a ~78 mg/dL; questi valori rappresentano una gamma che va da valori molto elevati, talvolta comunque osservati in alcune tipologie di pazienti (valori superiori a 1.800 mg/dL sono comuni in un coma diabetico), a valori tipici di soggetti con normale tolleranza al glucosio [6]. L'interesse per lo studio di campioni a diverse concentrazioni di cloruro di sodio (da 0,9% fino a 1,2% di NaCl) invece, è dovuta alla necessità di verificare se le prestazioni del sensore elettromagnetico nella misura del glucosio, siano influenzate anche dal grado di conducibilità delle soluzioni. I nostri risultati hanno dimostrato che il sensore elettromagnetico è in grado di rilevare variazioni di glucosio in tutta l'ampia gamma di concentrazioni prese in esame, e a tutti i quattro valori di conducibilità basale considerati. Inoltre, il rapporto tra la tensione in uscita del sensore e la concentrazione di glucosio è essenzialmente lineare per tutti i set di campioni.

Con lo studio della soluzione di Ringer lattato, abbiamo verificato se una composizione chimica molto vicina ai fluidi corporei, ma più complessa di quella delle classiche soluzioni di cloruro di sodio, possa influenzare le prestazioni del sensore elettromagnetico. Anche in questo caso il sensore elettromagnetico è stato in grado di rilevare le variazioni della concentrazione di glucosio, anche se il rapporto tra l'output del sensore e la concentrazione di glucosio non è stata lineare nella prima parte del set di concentrazioni. In questa fase, non abbiamo una spiegazione soddisfacente di questo risultato, ma una delle ragioni che possono in parte giustificarlo sta nell'incertezza sperimentale dei valori di concentrazione, ottenuti dopo diverse diluizioni.

Dal nostro esperimento, si conferma quanto già concluso con la spettroscopia dielettrica: le variazioni della concentrazione di glucosio influenzano direttamente la conduttività di una soluzione, indipendentemente da alcuni fenomeni che possono essere innescati nel sangue da variazioni di glucosio, come l'iperglicemia, l'iponatremia [94], che possono

provocare cambiamenti nelle proprietà dielettriche del sangue, come descritto nei paragrafi precedenti.

I primi e, per nostra conoscenza, unici studi dove sia stato proposto un approccio elettromagnetico per l'eventuale misurazione non invasiva della glicemia, sono quelli riportati in [94-95]: come nel nostro studio, gli autori hanno eseguito un'indagine *in vitro* con i loro sensori elettromagnetici; hanno effettuato i loro esperimenti su sangue animale, ma nessuna soluzione priva di componenti cellulari. Così, è difficile concludere se il loro sensore è stato in grado di rilevare le variazioni di conducibilità direttamente determinate dal glucosio in una soluzione, e conseguentemente un confronto diretto con i nostri risultati non è possibile. Infatti, la presenza di elementi cellulari espone il campione a fenomeni di dispersione specifici, probabilmente presenti negli esperimenti eseguiti negli studi [94,95], ma non nei nostri. In ogni caso, sia in condizioni statiche sia dinamiche, nei campioni di sangue analizzati hanno trovato significative variazioni nella tensione di uscita del sensore in relazione alle variazioni della concentrazione di glucosio, e le relazioni erano quasi lineari, in accordo con i nostri risultati. Riguardo il confronto tra i risultati in condizioni statiche e dinamiche, hanno trovato differenze molto piccole ma non trascurabili, sempre in accordo con i nostri risultati.

Tuttavia, si deve rilevare che, a parte per i diversi tipi di esperimenti, il sistema elettromagnetico proposto in [94,95] è molto diverso dal nostro e, certamente, più complesso: per esempio, ha richiesto due sottosistemi elettromagnetici (dei sottosistemi di misura, e dei sottosistemi di riferimento, ciascuno dei quali richiede un paio di induttori), inoltre le induttanze erano molto più grandi rispetto a quelle usate nei nostri sensori e, infine, l'intero sistema sembra avere dimensioni e complessità non compatibile con una possibile, futura applicazione in un contesto nel vivo. Un'altra differenza, è che in [94,95] i migliori risultati sono stati trovati a frequenze relativamente alte (alcuni MHz), mentre noi abbiamo lavorato a basse frequenze: sistemi a bassa frequenza permettono lo sviluppo di dispositivi di complessità relativamente bassa in termini di progettazione e produzione, e a costi ridotti. D'altra parte, si deve riconoscere che in [94,95] hanno sondato un'ampia gamma di frequenze, identificando una regione con una maggiore sensibilità alle variazioni di glucosio. Al contrario, nel nostro studio abbiamo lavorato solo a frequenza fissa (la frequenza ottimale per gli induttori utilizzati nel sensore elettromagnetico): studi futuri potrebbero essere dedicati all'analisi delle prestazioni del nostro sistema a frequenze diverse.

Un ulteriore vantaggio dato dal nostro sistema non-contact deriva proprio dal fatto che un sensore, a contatto con la pelle, potrebbe dare problemi di polarizzazione degli elettrodi, dovendo lavorare ad alte frequenze per ottimizzare la misura, incorrendo così in altri rischi, come lo sviluppo di irritazioni cutanee.

3.4 Valutazione tramite spettroscopia di impedenza e resine a scambio ionico, del contributo dello ione Na^+ nella conducibilità di soluzioni di interesse.

3.4.1 Risultati

Le misurazioni delle soluzioni passate in resina hanno in generale dato i risultati attesi.

I passaggi in resina eseguiti come descritto in precedenza nei metodi hanno dato i seguenti risultati :

A. Soluzione fisiologica 0,9% 1,448 KOhms

B. Soluzione fisiologica 0,9% mescolata 30' con resina a scambio $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 1,098 KOhms

C. Soluzione fisiologica caricata (12g/L NaCl) a 418,1190 Ohms

D. Soluzione fisiologica caricata mescolata 30' con resina a scambio $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 319,380 Ohms.

Quindi il delta tra A. e B. è di 350 Ohms , mentre quello tra C. e D. è di 98 Ohms (figura 24) L'esperimento è stato poi ripetuto aumentando il quantitativo di resina da due grammi a quattro nel tentativo di capire se, a fronte di un aumento di resina, il delta d'impedenza avesse un diminuzione. Inoltre, è stato aumentato il tempo di mescolamento da 30 minuti a un'ora, sempre al fine di capire se la cinematica influisse nella diminuzione del gap di impedenza. Non abbiamo rilevato nessun miglioramento a riguardo, segno probabilmente del raggiungimento della saturazione del sistema.

L'interesse applicativo di queste resine si traduce nel poter ricavare il valore di una quantità di sodio incognito, presente in una soluzione (sia essa fisiologica, liquido di dialisi, Ringer lattato).

Infatti, un esperimento più articolato rispetto a quello preliminare sopraindicato ci ha permesso di costruire una curva di taratura che permette un legame tra il delta d'impedenza, ottenuto dallo spettro di una soluzione fisiologica a concentrazione di sodio variabile, e lo stesso spettro calcolato dopo aver fatto passare quest'ultima nella resina a scambio $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (DOWX G-26, H).

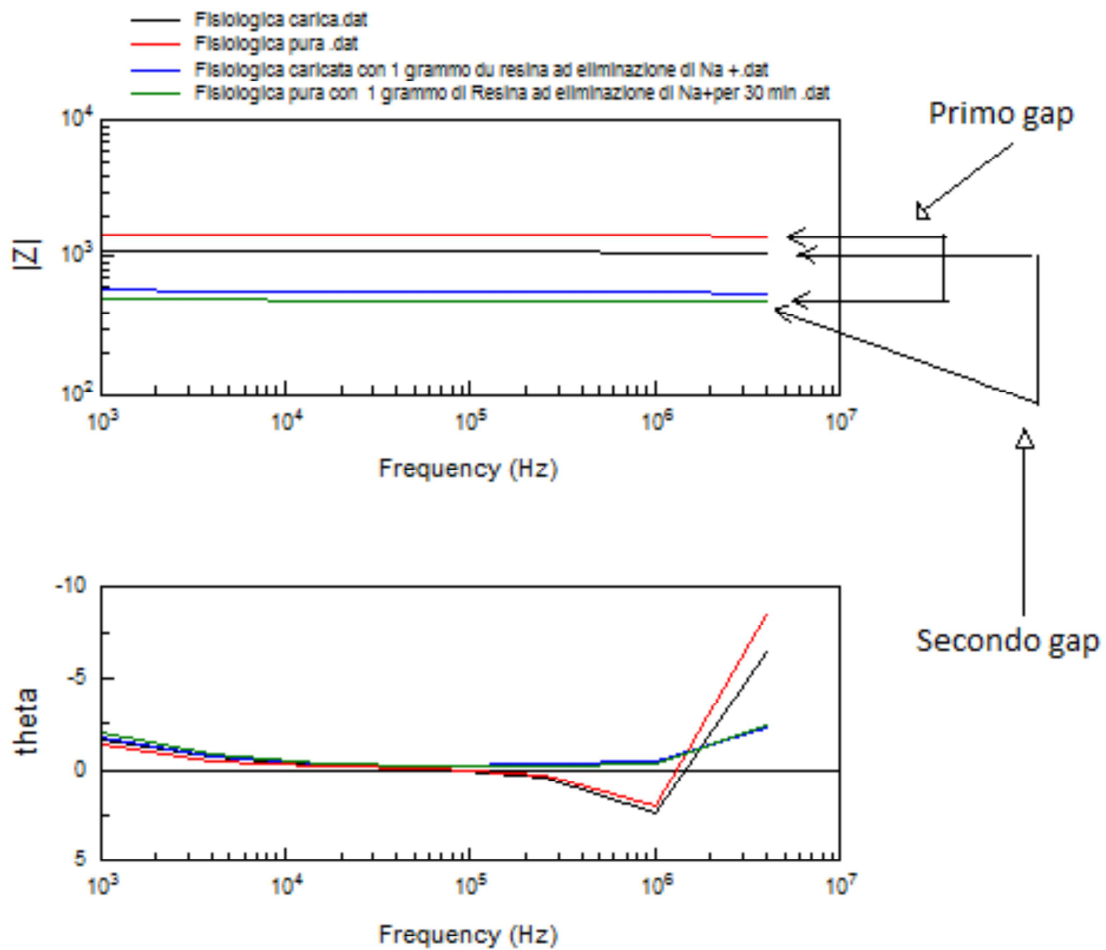


Fig 24. Differenze prima e dopo il passaggio in resina (1g): fisiologica 0,9% (rosso, blu), e caricata (nero, verde)

Per fare ciò, abbiamo costruito sette soluzioni fisiologiche da 100 ml ciascuna caricate nel seguente modo:

- 1) 0,9% fisiologica normale, non carica
- 2) 1,0 % caricata di 0,1% di NaCl dalla soluzione fisiologica di partenza
- 3) 1,1% caricata di 0,2% di NaCl dalla soluzione fisiologica di partenza
- 4) 1,2% caricata di 0,3% di NaCl dalla soluzione fisiologica di partenza
- 5) 1,3% caricata di 0,4% NaCl dalla soluzione fisiologica di partenza
- 6) 1,4% caricata di 0,5% di NaCl dalla soluzione fisiologica di partenza
- 7) 1,5% caricata di 0,6% NaCl dalla soluzione fisiologica di partenza

Si sono quindi prelevati 20 ml di soluzione 1) e aggiunto poi 4,0g di resina DOWX G-26,H si è fatto miscelare per 30 minuti.

Le stesse operazioni si sono svolte per ciascuna delle soluzioni preparate. Infine, sono state misurate le impedenze delle soluzioni prima e dopo il passaggio in resina, poi, calcolato successivamente il delta d'impedenza, i risultati sono di seguito riportati in tabella 3 e 4 e in figura 25.

Fisiologica a concentrazione nota senza passaggio in resina (% NaCl)	Impedenza Misurata	Fisiologica a concertazione nota con passaggio in resina (%NaCl)	Impedenza Misurata
0.9	1.394 Ohms	0.9	414.002 Ohms
1.0	1.246 Ohms	1.0	399.606 Ohms
1.1	1.146 Ohms	1.1	368.771 Ohms
1.2	1.123 Ohms	1.2	346.577 Ohms
1.3	1.011 Ohms	1.3	327.822 Ohms
1.4	915.801 Ohms	1.4	301.341 Ohms
1.5	851.347 Ohms	1.5	281.547 Ohms

Impedenza della Soluzione non trattata con resina	Impedenza della Soluzione trattata con resina	Delta di impedenza calcolato
1.394 Ohms	414.002 Ohms	979.998 Ohms
1.246 Ohms	399.606 Ohms	846.394 Ohms
1.146 Ohms	368.771 Ohms	777.229 Ohms
1.123 Ohms	346.577 Ohms	776.423 Ohms
1.011 Ohms	327.822 Ohms	683.178 Ohms
915.801 Ohms	301.341 Ohms	614.460 Ohms
851.347 Ohms	281.547 Ohms	569.800 Ohms

Tabelle 3 e 4: Risultati dell'impedenza delle soluzioni caricate di NaCl per la curva di taratura e calcolo del delta corrispondente

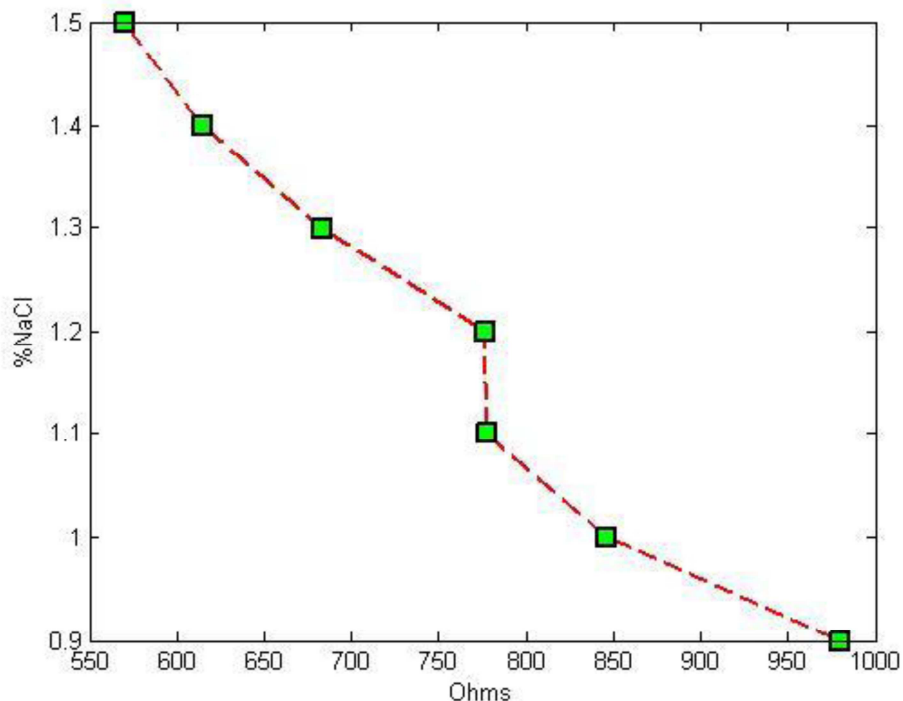


Figura 25: Rappresentazione grafica dei risultati riportati in tabella 3 e 4

Abbiamo ripetuto l'esperienza con percentuali diverse di NaCl ottenendo quattro tipi di soluzione

- 1) 1,2% caricata di 0,3% NaCl dalla soluzione fisiologica di partenza
- 2) 1.8% caricata a 0,9% NaCl dalla soluzione fisiologica di partenza
- 3) 2,4% caricata 1,5% di NaCl dalla soluzione fisiologica di partenza
- 4) 3,0% caricata 2,1% di NaCl della soluzione fisiologica di partenza

Si sono poi presi 20 ml della soluzione 1) e aggiunto successivamente 4,0g di resina Dowex G-26, come nel precedente esperimento abbiamo lasciato a miscelare per 30 minuti Per ciascuna delle quattro soluzioni si è ripetuto le stesse operazioni ottenendo quattro eluiti. Alla fine abbiamo misurato l'impedenza di ciascuna soluzione e dei corrispondenti eluiti (8 misurazioni in tutto).

I risultati sono riportati di seguito in tabella 5 e figura 26

%NaCl	Impedenza della Soluzione non trattata resina	Impedenza della Soluzione trattata resina	Delta di impedenza calcolato
1.2	1.032 Ohms	329.923 Ohms	702.077 Ohms
1.8	736.620 Ohms	249.509 Ohms	487.11 Ohms
2.4	584.637 Ohms	204.356 Ohms	380.281 Ohms
3.0	476.684 Ohms	178.915 Ohms	297.769 Ohms

Tabella 5: Risultati dell'impedenza delle soluzioni caricate di NaCl per la curva di taratura e calcolo del delta corrispondente

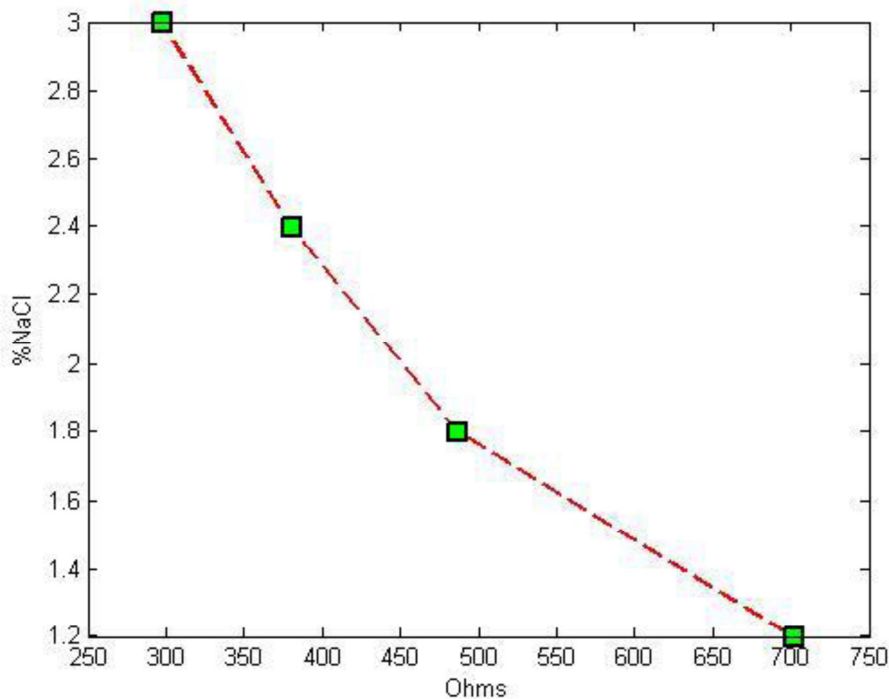


Figura 26: Rappresentazione grafica dei risultati riportati in tabella 5

Abbiamo poi sostituito la soluzione fisiologica con il Ringer Lattato il quale, come più volte sottolineato nei paragrafi precedenti, per la sua più complessa i avvicina maggiormente alle caratteristiche di conducibilità del sangue e dei fluidi interstiziali.

Simile agli esperimenti precedenti costruiamo cinque soluzioni aggiungendo NaCl

1,2% pari a 0,6 g di NaCl

1, 5% pari a 0,9 g di NaCl

1,8% pari a 1,2 g di NaCl

2,1% pari a 1,5 g di NaCl

2,4% pari a 1,8 g di NaCl

Per ciascuna soluzione prediamo 20 ml di volume e aggiungiamo 4,0 g di resina Dowex G-26 e dopo aver mescolato per 30 minuti, abbiamo ricavato l'eluato di ciascuna soluzione. Infine, è stata misurata l'impedenza di ciascuna soluzione fisiologica e dell'eluato. I valori misurati sono riassunti nella tabella 6.

%NaCl	Impedenza della Soluzione non trattata con resina	Impedenza della Soluzione tratta con resina	Delta di impedenza calcolato
1,2 %	975.820 Ohms	353.516 Ohms	622.304 Ohms
1,5 %	860.693 Ohms	270.129 Ohms	590.564 Ohms
1,8 %	706.607 Ohms	251.866 Ohms	454.741 Ohms
2,1 %	631.628 Ohms	227.047 Ohms	404.581 Ohms
2,4 %	544.260 Ohms	201.212 Ohms	343.048 Ohms

Tabella 6: Risultati dell'impedenza delle soluzioni di ringer lattato caricate di NaCl per la curva di taratura e calcolo del delta corrispondente.

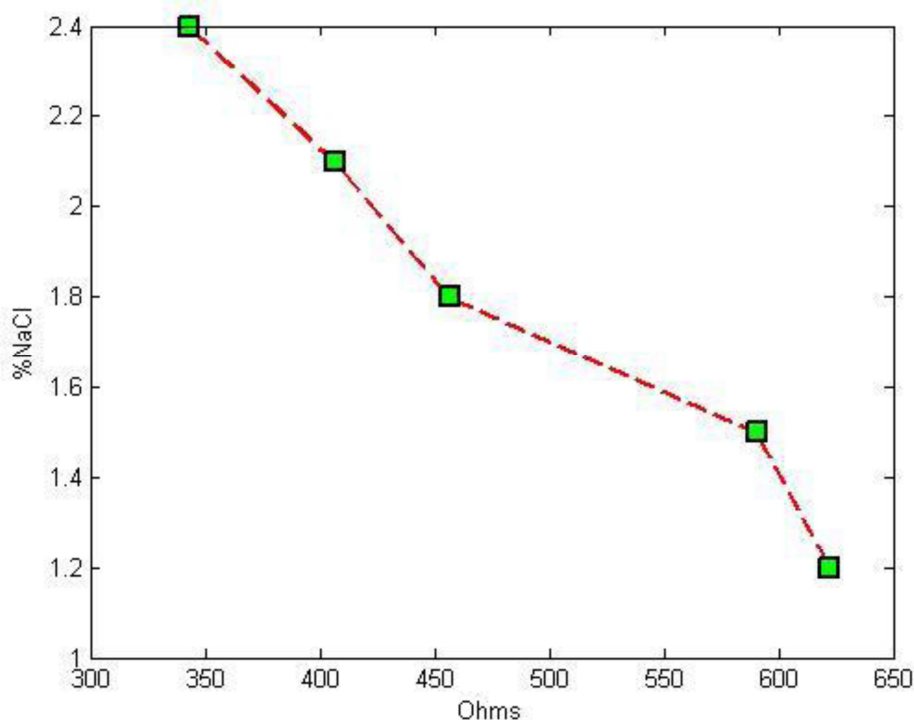


Figura 27: Rappresentazione grafica dei risultati riportati in tabella 6

Al fine di capire il comportamento della curva di taratura in presenza di glucosio si sono preparate quattro soluzioni di NaCl 0,9% con concentrazioni decrescenti di glucosio partendo da 625 mg/dl e a scalare 312,5 mg/dL, ~156mg/dL, ~78 mg/dL. Poi, da ciascuna delle 4 soluzioni, sono stati prelevati 20ml e aggiunti così 4,0g di resina Dowex G-26.

Dopo aver miscelato per 30 minuti si sono prelevati gli eluiti e sottoposti infine a misurazione.

% Glucosio (mg/dl)	Impedenza della Soluzione non passata in resina	Impedenza della Soluzione passata in resina	Delta calcolato
625	1.427 Ohms	430.243 Ohms	996.757 Ohms
312	1.400 Ohms	422.814 Ohms	977.186 Ohms
156	1.348 Ohms	428.397 Ohms	919.603 Ohms
78	1.375 Ohms	423.924 Ohms	951.076 Ohms

Tabella 7: Risultati dell'impedenza delle soluzioni di ringer lattato caricate di NaCl per la curva di taratura e calcolo del delta corrispondente.

Da quest'ultima tabella si ottiene il seguente grafico che conferma che l'effetto del trattamento con resina non dipende dalla concentrazione di glucosio, come auspicato.

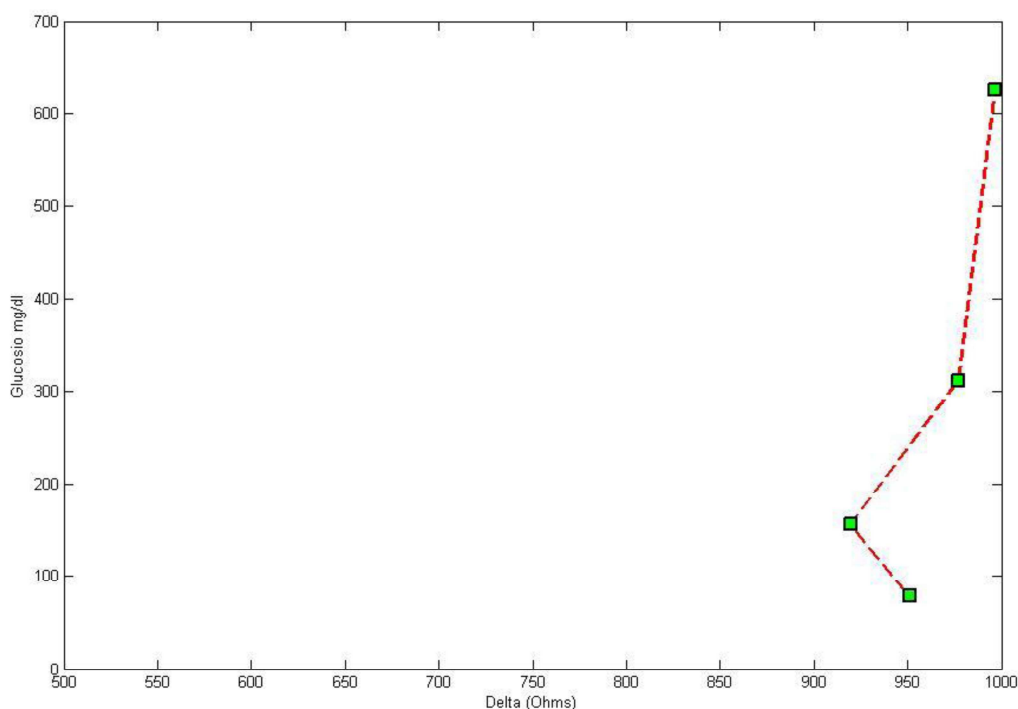


Figura 28: Rappresentazione grafica dei risultati riportati in tabella 7

3.4.2 Discussione

Non esistono in letteratura, per quanto abbiamo potuto verificare, studi sulle resine a scambio ionico applicate alla misura del sodio.

La sonda *Natrium* della ditta Bellco effettua una stima della concentrazione di sodio attraverso una semplice misura di conducibilità, nell'ipotesi che sia lo ione sodio a determinare in gran parte la conducibilità dell'acqua plasmatica (o ultrafiltrato), e le relative variazioni della conducibilità stessa, durante una sessione di dialisi. Tale ipotesi è tuttavia chiaramente una approssimazione, in quanto diversi fattori (tra cui il glucosio stesso, pur in piccola parte) contribuiscono a determinare la conducibilità di un fluido biologico quale un ultrafiltrato dialitico.

Attraverso il nostro approccio, è possibile pensare di pervenire ad una curva di calibrazione, che costituisca una relazione tra la concentrazione di sodio di una soluzione, ed il delta di impedenza che tale soluzione mostra dopo trattamento con resina. Una volta costruita una curva di calibrazione affidabile, del tipo di quelle di figura 26, 27, 28, al fine di misurare la concentrazione di sodio di una soluzione si può ritenere possibile di procedere, in teoria, nel modo seguente:

- a) Si preleva un campione di soluzione di interesse
- b) Si effettua la misura di impedenza del campione
- c) Si tratta il campione con la resina
- d) Si misura nuovamente l'impedenza del campione, sottoposto a trattamento con resina
- e) Si calcola il Delta di impedenza
- f) Si considera la curva di calibrazione, e si stima, in base al Delta di impedenza ottenuto, la concentrazione di sodio della soluzione in esame (infatti, si ribadisce che le curve del tipo di figura 26-28 mostrano chiaramente che il Delta di impedenza dipende proprio dalla concentrazione di sodio della soluzione: quindi, noto il Delta, in base alla curva di calibrazione si risale alla concentrazione di sodio).

Studi futuri dovranno determinare come applicare suddetta metodologia, che prevede due misure di impedenza (una delle quali dopo trattamento di un campione di soluzione con resina), potrà essere applicata in un contesto in vivo, durante una seduta di dialisi. A parte la questione della fattibilità, tuttavia, tale approccio sembra rendere possibile una misura della concentrazione del sodio molto più accurata di una misura di impedenza semplice

(come di fatto operato nella apparecchiatura Bellco), in quanto il sodio certamente influenza in maniera rilevante (probabilmente preponderante) l'impedenza di una soluzione (in particolare la conducibilità), tuttavia di certo NON è l'unico determinante della impedenza stessa.

Va altresì osservato che una eventuale stima corretta della concentrazione di sodio sarebbe di aiuto ai fini della misura della glicemia con l'approccio dell'impedenza, perché sarebbe possibile tenere conto di uno dei principali confondenti (anzi, presumibilmente il principale), e cioè appunto il sodio.

3.5 Applicazione della spettroscopia FT-NIR per la misura del glucosio in soluzioni conduttive, per un possibile utilizzo durante terapia dialitica.

3.5.1 Risultati

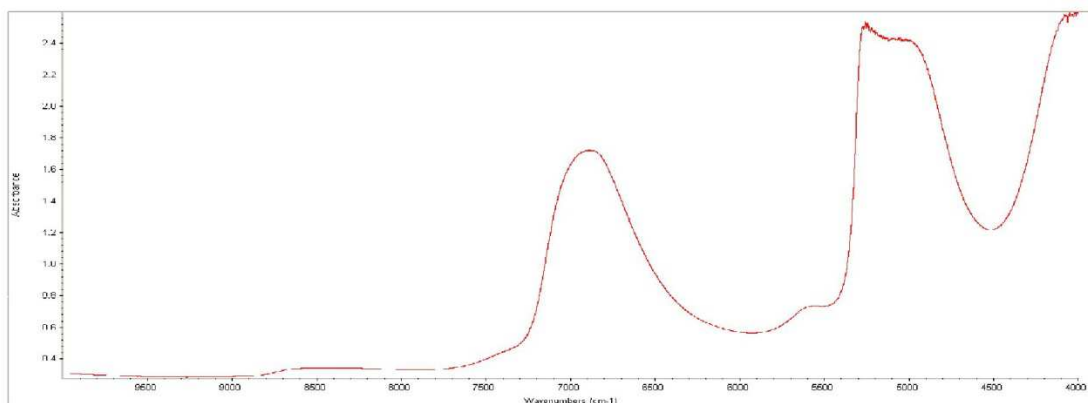
La tecnica FT NIR e lo strumento utilizzato sono stati descritti ampiamente nel capitolo 2.6.

I campioni sono stati preparati partendo da una soluzione di Ringer lattato a diverse concentrazioni di glucosio: 50-100-200-300-400-500 mg dl.

Lo strumento è stato quindi tarato per ricavare lo spettro NIR del glucosio identificando la regione dello spettro di interesse (figura 29)

TABELLA DEI COMPONENTI – SPETTRO CAMPIONE

Index	Component	Abbrev.	Unit	Digits	Analysis Low	Analysis High	Uncertainty Limit	Result
1	Glucosio	C1	ppm	2	27.50	522.50	10.00	Compute and report
2								Compute and report



12

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Figura 29: Regioni di interesse dello spettro NIR

Le alte prestazioni dello strumento hanno permesso di distinguere lo spettro dell'H₂O da quello del glucosio: la vicinanza degli spettri è infatti in questo caso il principale problema (figura 30).

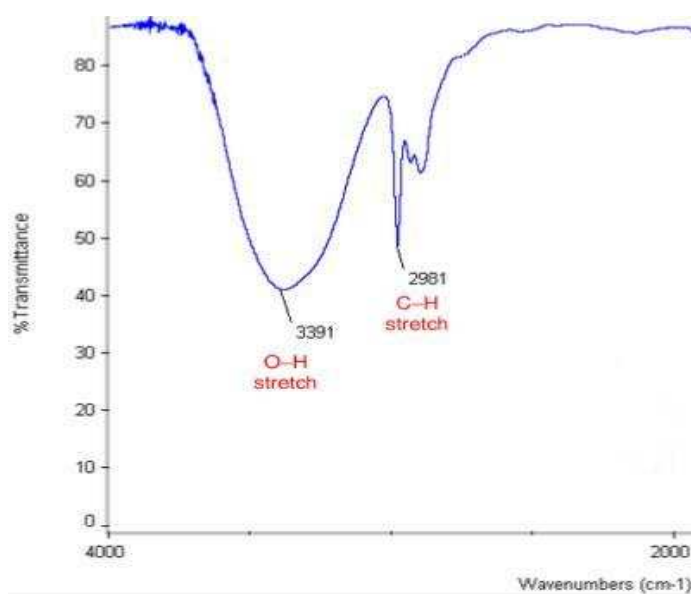
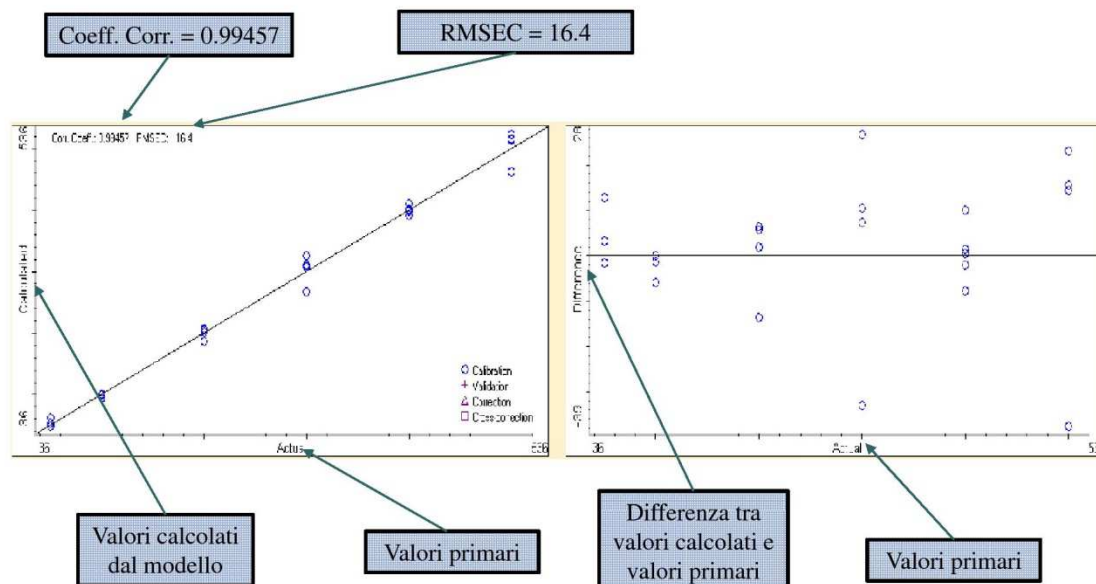


Figura 30: Regioni di stretch dei gruppi di glucosio e acqua dello spettro NIR

Lo strumento è stato poi calibrato come dettagliatamente mostrato in figura 31.

Performance di Calibrazione: GLUCOSIO



13

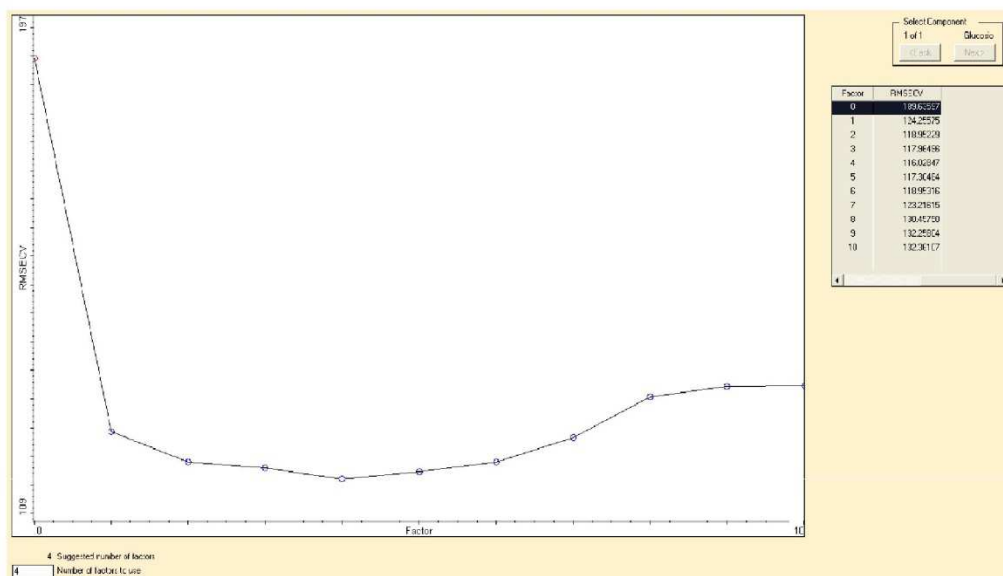
ThermoFisher
SCIENTIFIC

Figura 31: Curva di calibrazione e parametri utilizzati.

In questo caso, contrariamente a quanto riscontrato negli esperimenti precedenti con tecniche impedenziometriche ed elettromagnetiche, l'effetto dei sali disciolti diventa trascurabile, in quanto tutti i Sali, completamente dissociati in solventi polari, risultano trasparenti ai RI.

L'isolamento dello spettro del glucosio da quello dell'acqua e la trasparenza dei Sali hanno permesso un ottimo risultato, sia qualitativo che quantitativo, permettendo di discriminare chiaramente le differenze di concentrazione di glucosio dei vari campioni, come si può vedere in figura 33 e in tabella 8 di seguito.

Performance di Calibrazione: PRESS



14

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Figura 32: Performance di calibrazione.

RISULTATI CALIBRAZIONE

Tabella risultati Calibrazione - Glucosio							
Index	Spectrum Title	Actual	Calculated	Diff. x Path			
1	Composite standard A	500	462.4	-37.6			
3	50 lattato III	50	48.45	-1.55			
4	50 lattato IIII	50	62.86	12.86			
5	50 lattato	50	53.32	3.32			
6	100 lattato II	100	98.8	-1.2			
7	100 lattato III	100	100.01	0.01			
9	100 lattato	100	94.14	-5.86			
11	200 lattato III	200	205.73	5.73			
12	200 lattato IIII	200	206.56	6.56			
13	200 lattato	200	201.84	1.84			
14	300 lattato II	300	307.32	7.32			
15	300 lattato III	300	310.52	10.52			
16	300 lattato IIII	300	326.79	26.79			
18	400 lattato II	400	410.13	10.13			
19	400 lattato III	400	401.34	1.34			
20	400 lattato IIII	400	397.93	-2.07			
21	400 lattato	400	392.41	-7.59			
22	500 lattato II	500	515.63	15.63			
23	500 lattato III	500	523.16	23.16			
26	500 lattato	500	514.55	14.55			
27	Composite standard G	500	462.4	-37.6			
30	Composite standard J	200	186.38	-13.62			
31	Composite standard K	300	266.88	-33.12			
32	Composite standard L	400	400.45	0.45			

15

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Tabella 8: Differenze riscontrate tra le varie concentrazioni di glucosio inn Ringer lattato.

3.5.2 Discussione

La tecnica FT-NIR sembra essere un approccio molto promettente per la misura del glucosio in continuo, nei circuiti di emodialisi. Come detto in precedenza, esistono diverse ragioni per lo sviluppo di un apparecchio che effettui il monitoraggio in continuo della glicemia nel paziente dializzato e, per nostra conoscenza, non esiste alcuno studio orientato a questi obiettivi con alcuna tecnologia.

L'apparecchio da noi utilizzato era provvisto solo di sonda a goccia Nicolet Antaris NIR II™, ma la strumentazione è adattabile a utilizzare sonde a fibra ottica, mantenendo sostanzialmente, le stesse prestazioni (da testare). Questa configurazione permetterebbe di monitorare con un'unica macchina fino a quattro pazienti contemporaneamente.

Stiamo iniziando un protocollo sperimentale utilizzando dializzati esausti e soluzioni di dialisi (Baxter) per approfondire le possibilità applicative dell'apparecchio e della metodica.

I primi risultati sono incoraggianti e l'applicazione di questa tecnica porterebbe a una serie di vantaggi:

- Risparmio economico
- Riduzione tempi di analisi
- Nessuna necessità di utilizzare solventi/reattivi
- Nessuna preparazione del campione
- Risultati analitici in pochi secondi
- Utilizzo da personale non qualificato
- Monitoraggio costante del parametro analizzato

4. CONCLUSIONI

Il monitoraggio non invasivo della glicemia è un argomento dibattuto ormai da diverso tempo e divenuto, attualmente, una vera e propria sfida della comunità scientifica internazionale. Molti gruppi di ricerca e ditte specializzate in apparecchiature biomedicali, stanno investendo denaro ed energie per venire a capo di un problema medico-scientifico di difficile soluzione, che allo stato attuale ha registrato più sconfitte che successi.

Il lavoro presentato in questa tesi non si è mai prefissato di arrivare a fornire una soluzione definitiva a questa complessa problematica, ma è altresì vero che attraverso gli esperimenti condotti e i risultati ottenuti, crediamo di aver dato il nostro contributo chiarificando e approfondendo alcuni aspetti, poco indagati in letteratura, che riguardano i comportamenti dielettrici dei fluidi biologici, in particolare attraverso l'utilizzo di due degli approcci tecnologici più promettenti in questo campo: la spettroscopia dielettrica ed il *sensing* elettromagnetico.

D'altra parte, studiando queste problematiche, è nata l'idea di dedicarsi anche a un aspetto collegato alla tematica principale: la misura della glicemia in dialisi. Questa idea, a dire il vero poco considerata in letteratura, è stata accolta con entusiasmo dai professionisti del settore (medici nefrologi e diabetologi) a cui è stata proposta.

La sfida scientifica e tecnologica risulta in questo caso sicuramente più abbordabile; infatti, oltre all'approccio basato sulla spettroscopia di impedenza, abbiamo ottenuto ottimi risultati, pur preliminari, basandoci su tecnologie, come l'FT-NIR, che, applicate al monitoraggio non invasivo direttamente sul paziente, hanno sempre fallito. Il nostro gruppo di ricerca sta ora insistendo su questo aspetto, tramite l'analisi di dializzati esausti di pazienti diabetici e non per verificare la risposta ai carichi di sodio e glucosio.

Si noti che un potenziale aspetto connesso alla misura della glicemia in dialisi è la misura della concentrazione di sodio, ossia la stima del legame iperglicemia-iponatremia; a tale proposito, l'uso della spettroscopia d'impedenza connessa con l'uso di resine a scambio ionico pare essere un approccio promettente per la misura indiretta della concentrazione sodica.

In un futuro quindi non troppo distante, auspichiamo che, grazie alle collaborazioni con le ditte *leader* nel settore di interesse (come Bellco e Termofisher) e le unità medico-ospedaliere di riferimento in campo metabolico e nefrologico, si arrivi presto allo sviluppo

di un apparecchio per la misure del glucosio e del sodio, da poter inserire nei circuiti di emodialisi.

ABBREVIAZIONI UTILIZZATE NEL TESTO

OMS - Organizzazione Mondiale della Sanità

SMBG - Self-Monitoring of Blood Glucose

HbA1c - Emoglobina Glicata

GOX - Gox glucose oxidase enzyme

FDA - Food & drug administration

ISO - International Organization for Standardization

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

NIR - Near Infra Red - vicino infrarosso

MIR - Mead infra red – medio infrarosso

OCT - tomografia ottica a radiazione coerente

AGE - Prodotti avanzati di glicazione

PBS - Phosphate buffered saline

FT-NIR – Spettroscopia nel vicino infrarosso a Trasformata di Fourier

BIBLIOGRAFIA

1. Cowie CC, Rust KF, Byrd-Holt DD, Gregg EW, Ford ES, Geiss LS, et al. Prevalence of diabetes and high risk for diabetes using A1C criteria in the U.S. population in 1988-2006. *Diabetes Care*. 2010, 33, 562-8.
2. Narayan KM, Boyle JP, Geiss LS, Saaddine JB, Thompson TJ. Impact of recent increase in incidence on future diabetes burden: U.S., 2005-2050. *Diabetes Care*. 2006, 29, 2114-6.
3. Rathmann W, Giani G. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004, 27, 2568-9
4. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010, 87, 4-14.
5. De Micheli A, D'Ugo E, Ceriello A.G L'importanza del controllo della variabilità glicemica nella prevenzione delle complicanze del paziente con diabete mellito. *It Diabetol Metab* 2007, 27, 227-239
6. American Diabetes Association Diagnosis and classification of diabetes mellitus.. *Diabetes Care* 2010, 33, S62-9.
7. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993, 329, 977-86.
8. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2011 *Diabetes Care* 2011, 34, S11-61.

9. Mosca A. Perché e come misurare l'emoglobina glicata G It Diabetol Metab 2009, 29, 179-83
10. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T et al Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. Clin Chem Lab Med 2002, 40, 78-89.
11. Finke A, Kobold U, Hoelzel W, Weykamp C, Miedema K, Jeppsson JO. Preparation of a candidate primary reference material for the international standardisation of HbA1c determinations. Clin Chem Lab Med. 1998, 36, 299-308.
12. Weykamp C, John WG, Mosca A, Hoshino T, Little R, Jeppsson JO et al. The IFCC Reference Measurement System for HbA1c: a 6-year progress report. Clin Chem. 2008, 54, 240-8.
13. Consensus statement . Consensus Statement on the Worldwide Standardization of the Hemoglobin A1c Measurement. Diabetes Care 2007, 30, 2399-400.
14. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ. et al Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes.. N Engl J Med. 2005, 22, 353, 2643-53.
15. American Diabetes Association. Self-monitoring of blood glucose. Diabetes Care 1994, 17, 81-6.
16. Bosi E. Automonitoraggio glicemico (SMBG) nel diabete di tipo 2 non trattato con insulina: efficace o superfluo? G It Diabetol Metab 2009, 29, 111-3.
17. International Diabetes Federation. Guideline on Self-Monitoring of Blood Glucose in Non-Insulin Treated Type 2 Diabetes., 2009 (www.idf.org).

18. Bosi E. Strutturazione dell'automonitoraggio glicemico (SMBG). *G It Diabetol Metab* 2011, 31, 61-2.
19. Bosi E. Monitoraggio glicemico continuo con lettura in tempo reale: rivoluzione in arrivo? *G It Diabetol Metab* 2009, 29, 1-2
20. The Juvenile Diabetes Research Foundation Continuous Glucose Monitoring Study Group. Continuous glucose monitoring and intensive treatment of type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2008, 359, 1464-76.
21. Battelino T, Bode B W. Continuous glucose monitoring in 2010 *Int J Clin Pract*, 2011, 65, 10–5.
22. Battelino T, Bode B W. Continuous glucose monitoring *Int J Clin Pract*, 2010, 64, 11–5.
23. Hoeks A., Greven W L, de Valk H W. Real-time continuous glucose monitoring system for treatment of diabetes: a systematic review *Diabet Med*. 2011, 28, 386-94.
24. Drury M I, Timoney F J, Delaney P. J. Dextrostix--a rapid method of estimating blood glucose levels. *Ir. Med. Assoc.* 1965, 56, 52-3.
25. Korp, W. A new rapid blood-sugar determination at bedside (dextrostix). *Wien. Med. Wochenschr.* 1965, 115, 435-7.
26. Clark L.C, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1962, 102, 29-45.
27. Updike S J, Hicks G P. The enzyme electrode. *Nature* 1967, 214, 986-8.
28. Wang J. Electrochemical glucose biosensors. *Chem. Rev.* 2008, 108, 814-825.
29. Liu J, Wang J. Improved design for the glucose biosensor. *Food technology and biotechnology* 2001, 39, 55-8.

30. Frew J E, Hill H A. Electrochemical biosensors. *Anal. Chem.* 1987, 59, 933-44.
31. Chaubey A, Malhotra B D. Mediated biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 2002, 17, 441-56.
32. Williams D L, Doig A R, Korosi A. Electrochemical-enzymatic analysis of blood glucose and lactate. *Anal. Chem.* 1970, 42, 118-121.
33. Hilditch P I, Green M J. Disposable electrochemical biosensors. *Analyst* 1991, 116, 1217-20.
34. Matthews D R, Holman RR, Bown E, Steemson J, Watson A, Hughes S et al. Pensized digital 30-second blood glucose meter. *Lancet* 1987, 1, 778-9.
35. Palmisano F, Zambonin, P G, Centonze D, Quinto M. A disposable, reagentless, third generation glucose biosensor based on overoxidized poly(pyrrole)/tetrathiafulvalenetetracyanoquinodimethane composite. *Anal. Chem.* 2002, 74, 5913-18.
36. Zhang W, Li G. Third-generation biosensors based on the direct electron transfer of proteins. *Anal. Sci.* 2004, 20, 603-9.
37. Clark LC Jr. Monitor and control of blood and tissue O₂ tensions. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1956, 2, 41-8.
38. D'Orazio P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. *Clin Chim Acta.* 2011, 18, 412, 1749-61.
39. Yoo E H, Lee S Y. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice *Sensors* 2010, 10, 4558-76.
40. Palleschi G, Rădoi A M. Nuovi sensori e biosensori elettrochimici basati su elettrodi a stampa serigrafica per la determinazione di analiti di interesse alimentare 2008 . Tesi di dottorato in scienze matematiche e fisiche, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata".

41. Weibel M K, Bright H J. The glucose oxidase mechanism. Interpretation of the pH dependence. *J. Biol. Chem.* 1971, 246, 2734-44.
42. Guilbault G G, Lubrano G J. An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Anal. Chim. Acta.* 1973, 64, 439-55.
43. Henry C. Getting under the skin: implantable glucose sensors. *Anal. Chem.* 1998, 70, 594A-8A.
44. Rebrin K, Steil G.M. Can interstitial glucose assessment replace blood glucose measurements? *Diabetes Technol. Ther.* 2000, 2, 461-72.
45. Shichiri M, Kawamori R, Yamasaki Y, Hakui N, Abe H. Wearable artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor. *Lancet* 1982, 2, 1129-31.
46. Gross T M, Bode B W, Einhorn D, Kayne D M, Reed J H, White N et al. Performance evaluation of the MiniMed continuous glucose monitoring system during patient home use. *J. Diabetes Technol. Ther.* 2000, 2, 49-56.
47. Cox M. An overview of continuous glucose monitoring systems. *J. Pediatr. Health Care* 2009, 23, 344-47.
48. Poscia A, Mascini M, Moscone D, Luzzana M, Caramenti G, Cremonesi P et al. A microdialysis technique for continuous subcutaneous glucose monitoring in diabetic patients (part 1). *Biosens. Bioelectron.* 2003, 18, 891-8.
49. Wentholt I M, Vollebregt M.A, Hart A A, Hoekstra J B, DeVries J H. Comparison of a needle-type and a microdialysis continuous glucose monitor in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2005, 28, 2871-6.
50. Bode B, Beck R W, Xing D, Gilliam L, Hirsch I, Kollman C et al. Sustained benefit of continuous glucose monitoring on A1C, glucose profiles, and hypoglycemia in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009, 32, 2047-9.

51. Goldstein D E, Little R R, Lorenz R A, Malone J I, Nathan D, Peterson C M et al. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2004, 27, 1761-73.
52. International Organization for Standardization. International Organization for Standardization: In vitro diagnostic test systems-Requirements for blood-glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus. Geneva, Switzerland, 2003.
53. Rohrscheib M, Robinson R, Eaton RP. Non-invasive glucose sensors and improved informatics-the future of diabetes management. *Diabetes Obes Metab* 2003, 5, 280–4.
54. Arnold MA, Small GW. Perspectives in analytical chemistry: noninvasive glucose sensing. *Anal Chem* 2005, 77, 5429–39.
55. Burmeister JJ, Arnold MA. Evaluation of measurement sites for noninvasive blood glucose sensing with near-infrared transmission spectroscopy. *Clin Chem* 1999, 45, 1621–7.
56. Oliver NS, Toumazou C, Cass AE, Johnston DG. Glucose sensors: a review of current and emerging technology. *Diabet Med.* 2009, 26, 197-210.
57. Khalil O S. Non-invasive glucose measurement technologies: an update from 1999 to the dawn of the new millennium. *Diabetes Technol. Ther.* 2004, 6, 660–97.
58. Malin S F, Ruchti T L, Blank T B, Thennadil S N, Monfre, Clin S L. Noninvasive prediction of glucose by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. 1999 *Chem.* 45, 1651–8.
59. Tura A, Maran A, Pacini G. Non-invasive glucose monitoring: assessment of technologies and devices according to quantitative criteria. *Diabetes Res Clin Pract* 2007, 77, 16–40.

60. Waynant R W, Chenault V M. Overview of non-invasive fluid glucose measurement using optical techniques to maintain glucose control in diabetes mellitus IEEE Lasers Electrooptics Soc Newslett 1998 3–6. (Last checked 22/03/2006).
61. Yki-Jarvinen H, Utriainen T. Insulin-induced vasodilatation: physiology or pharmacology? Diabetologia 1998, 41, 369–79.
62. Oomen P H, Kant G D, Dullaart, W D, Reitsma R P, Smit, A . Acute hyperglycemia and hyperinsulinemia enhance vasodilatation in Type 1 diabetes mellitus without increasing capillary permeability and inducing endothelial dysfunction, J. Microvasc. Res. 2002 63 1–9.
63. Sibbald R G, Landolt S J, Toth D. Skin and diabetes, Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 1996, 25, 463–72.
64. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. Diabetes Control and Complications Trial, Monnier V M, Bautista O, Kenny D, Sell D R, Fogarty J, Dahms W, et al. Skin collagen glycation, glycooxidation, and crosslinking are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of Type 1 diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA1c as markers of diabetic complications. Diabetes 1999, 48, 870–80.
65. Yeh S J, Khalil O S, Hanna C F, Kantor S, J. Near-infrared thermo-optical response of the localized reflectance of intact diabetic and nondiabetic human skin. Biomed. Opt. 2003, 8, 534–44.
66. G. Mazarevica, T. Freivalds, A. Jurka, Properties of erythrocyte light refraction in diabetic patients, J. Biomed. Opt. 2002, 7, 244–7.
67. Fusman R, Rotstein R, Elishkevich K, Zeltser D, Cohen S, Kofler M. Image analysis for the detection of increased erythrocyte, leukocyte and platelet adhesiveness/aggregation in the peripheral blood of patients with diabetes mellitus. Acta Diabetol. 2001, 38, 129–34.

68. Marbach R, Koschinsky T, Gries F A, Heise H M. Noninvasive blood glucose assay by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy of the human inner lip. *Appl. Spect* 1993, 47, 875–81.
69. Brancalion L, Bamberg M P, Sakamaki T, Kollias N. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy as a possible method to investigate biophysical parameters of stratum corneum in vivo, *J. Invest Dermatol.* 2001, 116, 380–6.
70. Heise H M, Marbach R. Human oral mucosa studies with varying blood glucose concentration by non-invasive ATR-FTIR-spectroscopy. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 1998, 44, 899–912.
71. Larin K V, Eledrisi M S, Motamedi M, Esenaliev R O. Noninvasive blood glucose monitoring with optical coherence tomography: a pilot study in human subjects. *Diab. Care* 2002, 25, 2263–7.
72. Non-Invasive Task Force, Heinemann L, Kramer U, Klotzer H M, Hein M, Volz D, Hermann M. et al. Noninvasive glucose measurement by monitoring of scattering coefficient during oral glucose tolerance tests. *Diabetes Technol. Ther.* 2000, 2, 211–20.
73. Khalil O S. Non-invasive glucose measurement technologies: an update from 1999 to the dawn of the new millennium.. *Diabetes Technol. Ther.* 2004, 6, 660–97.
74. Yeh S J, Hanna C F, Khalil O S. Monitoring blood glucose changes in cutaneous tissue by temperature-modulated localized reflectance measurements. *Clin Chem.* 2003, 49, 924–34.
75. Hanlon E B, Manoharan R, Koo T W, Shafer K E, Motz J T, Fitzmaurice M, et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Phys. Med. Biol.* 2000, 45, R1–R59.
76. Dieringer JA, McFarland AD, Shah NC, Stuart DA, Whitney AV, Yonzon CR et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy: new materials, concepts, characterization tools, and applications. *Faraday Discuss.* 2006, 132, 9–27.

77. Lambert JL, Morookian JM, Sirk SJ, Borchert MS. Measurement of aqueous glucose in a model anterior chamber using Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc* 2002, 33, 524–9.
78. Enejder A, Seccina T, Oh J, Hunter M, Shih WC, Sasic S et al. Raman spectroscopy for non-invasive glucose measurements. *J Biomed Optics* 2005, 10, 031114.
79. Caspers P J, Lucassen G W. Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin, *Puppels Biophys G J. J.* 2003, 85, 572–80.
80. Rabinovitch B, March W F, Adams R L. Noninvasive glucose monitoring of the aqueous humor of the eye: part I. Measurement of very small optical rotations. *Diab. Care* 1982, 5, 254–8.
81. McNichols R J, Cameron B D, Cote´ G L. Development of a non-invasive polarimetric glucose sensor (<http://www.ieee.org/organizations/pubs/newsletters/leos/apr98/glucosesensor.htm>. Last checked 22/03/2006).
82. Cameron BD, Anumula H. Development of a real-time corneal birefringence compensated glucose sensing polarimeter. *Diabetes Technol Ther* 2006, 8, 156–64. R.
83. Rawer R, Stork W, Muller-Glaser K D. Polarimetric methods for measurement of intra ocular glucose concentration. *Biomed. Tech. (Berl.)* 2002, 47, 186–8.
84. Khalil O. Spectroscopic and clinical aspects of noninvasive glucose measurements. *S. Clin. Chem.* 1999, 45, 165–77.
85. Cameron B D, Baba J S, Cote G L. Measurement of the glucose transport time delay between the blood and aqueous humor of the eye for the eventual development of a noninvasive glucose sensor. *Diabetes Technol. Ther.* 2001, 3, 201–7.

86. Shen Y, Lu Z, Spiers S, MacKenzie H A, Ashton H S, Hannigan J, et al. Measurement of the optical absorption coefficient of a liquid by use of a time-resolved photoacoustic technique, *Appl. Opt.* 2000, 39, 4007–12.
87. Weiss R, Yegorchikov Y, Shusterman A, Raz I. Non-invasive continuous glucose monitoring using photoacoustic technology—results from the first 62 subjects. *Diabetes Technol Ther* 2007, 9, 68–74.
88. Sandby-Moller J, Poulsen T, Wulf H C. Influence of epidermal thickness, pigmentation and redness on skin autofluorescence, *Photochem. Photobiol.* 2003, 77, 616–620.
89. Domschke A, March W F, Kabilan S, Lowe C. Initial clinical testing of a holographic non-invasive contact lens glucose sensor. *Diabetes Technol Ther.* 2006, 8, 89–93.
90. Ross Macdonald J. Impedance spectroscopy: emphasizing solid materials and systems, 1987, John Wiley & Sons, New York.
91. Hillier TA, Abbott RD, Barrett EJ. Hyponatremia: evaluating the correction factor for hyperglycemia. *Am J. Med.* 1999, 106, 399–403.
92. Oster JR, Singer I. Hyponatremia, hyposmolality, and hypotonicity: tables and fables. *Arch Intern Med.* 1999, 159, 333-6.
93. Caduff A, Hirt E, Feldman Y, Ali Z, Heinemann L. First human experiments with a novel non-invasive, non-optical continuous glucose monitoring system, *Biosens. Bioelectron.* 2003, 19, 209–17.
94. Gourzi M, Rouane A, Guelaz R, Nadi M, Jaspard F. Study of a new electromagnetic sensor for glycaemia measurement: in vitro results on blood pig. *J. Med. Eng. Technol.* 2003, 27, 276–81.
95. Gourzi M, Rouane A, Guelaz R, Alavi M S, McHugh M B, Nadi M, et al. Non-invasive glycaemia blood measurements by electromagnetic sensor: study in static and dynamic blood circulation. *J. Med. Eng. Technol.* 2005, 29, 22–6.

96. Moran G R, Jeffrey K R, Thomas J M, Stevens J R. A dielectric analysis of liquid and glassy solid glucose/water solutions. *Carbohydr. Res.* 2000, 328, 573–84.
97. Mitragotri S, Coleman M, Kost J, Langer R. Analysis of ultrasonically extracted interstitial fluid as a predictor of blood glucose levels, *J. Appl. Physiol.* 2000, 89, 961–66.
98. Kurnik R T, Oliver J J, Waterhouse S R, Dunn T, Jayalakshmi Y, Lesho M, et al. Application of the mixtures of experts algorithm for signal processing in a noninvasive glucose monitoring system. *Sens. Actuators B: Chem.* 1999, 60, 19–26.
99. Pitzer K R, Desai S, Dunn T, Edelman S, Jayalakshmi Y, Kennedy J, et al. Detection of hypoglycemia with the GlucoWatch biographer, *Diab. Care* 2001, 24, 881–85.
100. Kim S, Yoo H, Lee K, Friedman B, Gaspar M A, Levicky R. Noncontact characterization of glucose by a waveguide microwave probe. *Current Applied Physics* 2009, 9, 856–60
101. Melikyan H, Danielyan E, Kim S, Kim J, Babajanyan A, Lee J et al. Non-invasive in vitro sensing of d-glucose in pig blood. *Med Eng Phys.* 2011 Aug 8. [Epub ahead of print].
102. Dongman G, Zhang D. Monitor blood glucose levels via breath analysis system and sparse representation approach. *IEEE Sensors 2010 Conference.* 2010 Waikoloa, HI.
103. Barman I, P. Singh G, Jeon Woong Kang J W, R. Dasari R, Feld S. Investigation of the specificity of Raman spectroscopy in non-invasive blood glucose measurements. et al. *Anal Bioanal Chem* 2011, 400, 2871–80.
104. Caduff A, Mueller M, Megej A, Dewarrat F, Suri RE, Klisic J. Characteristics of a multisensor system for non invasive glucose monitoring with external validation and prospective evaluation. *Biosens Bioelectron.* 2011 Apr 12. [Epub ahead of print].

105. Tura A. Advances in the development of devices for noninvasive glycemia monitoring: who will win the race? *Nutritional Therapy & Metabolism* 2010, 28, 33-9.
106. Tamada JA, Garg S, Jovanovic L, Pitzer KR, Fermi S, Potts RO. Cygnus Research Team. Noninvasive glucose monitoring: comprehensive clinical results. *JAMA* 1999, 282, 1839-44.
107. The Diabetes Research in Children Network (DirecNet) Study Group. Youth and parent satisfaction with clinical use of the GlucoWatch G2 Biographer in the management of pediatric type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2005, 28, 1929-35.
108. Tura A. Noninvasive glycaemia monitoring: background, traditional findings, and novelties in the recent clinical trials. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008, 11, 607-12.
109. Chen CS, Wang KK, Jan MY, Hsu WC, Li SP, Wang-Lin YY, Bau JG. Noninvasive blood glucose monitoring using the optical signal of pulsatile microcirculation: a pilot study in subjects with diabetes. *J Diabetes Complications* 2008, 22, 371-6.
110. Rhee SY, Chon S, Koh G, Paeng JR, Oh S, Woo JT. Clinical experience of an iontophoresis based glucose measuring system. *Med Sci* 2007, 22, 70-3.
111. Weiss R, Yegorchikov Y, Shusterman A, Raz I. Noninvasive continuous glucose monitoring using photoacoustic technology: results from the first 62 subjects. *Diabetes Technol Ther* 2007, 9, 68-74.
112. Gabbay RA, Sivarajah S. Optical coherence tomography based continuous noninvasive glucose monitoring in patients with diabetes. *Diabetes Technol Ther* 2008, 10, 188-93.
113. Caduff A, Talary MS, Mueller M, Dewarrat F, Klisic J, Donath M. Non-invasive glucose monitoring in patients with Type 1 diabetes: a Multisensor system combining sensors for dielectric and optical characterisation of skin. *Biosens Bioelectron.* 2009, 15, 24, 2778-84.

114. Amir O, Weinstein D, Zilberman S, Less M, Perl-Treves D, Primack H et al. Continuous noninvasive glucose monitoring technology based on "occlusion spectroscopy". *J Diabetes Sci Technol*. 2007, 1, 463-9.
115. Tura A. Noninvasive glycaemia monitoring: background, traditional findings, and novelties in the recent clinical trials. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008, 11, 607-12.
116. Batlle D, Lurbe A, LaPointe M, Agrawal R. The Na⁺/H⁺ antiporter, type I diabetes, and hypertension. *Kidney Curr Surv World* 1995, 4, 1-3.
117. Borch-Johnsen K, Norgaard K, Hommel E, Mathiesen ER, Jensen JS, Deckert T et al. Is diabetic nephropathy an inherited complication? *Kidney Int*. 1992, 41, 719-22.
118. Viberti GC, Yip Messent J, Morocutti A. Diabetic nephropathy. Future avenue. *Diabetes Care*. 1992, 15, 1216-25.
119. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 1988, 3188, 1315-21.
120. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001, 44, 129-46.
121. Yabe-Nishimura C. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol Rev* 1998, 50, 21-33.
122. Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89, 11059-63.
123. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications *Diabetes*. 1998, 47, 859-66.

124. Kazempour-Ardebili S, Lecamwasam VL, Dassanyake T, Frankel AH, Tam FW, Dornhorst A. Assessing glycemic control in maintenance hemodialysis patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009, 32, 1137-42.
125. Jackson M, Holland MR, Nicholas J, Talbot M, Spencer H, Lodwick R et al. Occult hypoglycemia caused by hemodialysis. *Clin Nephrol*. 1999, 51, 242-7.
126. Arabi YM, Tamim HM, Rishu AH. Hypoglycemia with intensive insulin therapy in critically ill patients: predisposing factors and association with mortality. *Crit Care Med*. 2009, 37, 2536-44.
127. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995, 273, 117-23.
128. Neveu H, Kleinknecht D, Brivet F, Loirat P, Landais P. Prognostic factors in acute renal failure due to sepsis. Results of a prospective multicentre study. The French Study Group on Acute Renal Failure. *Nephrol Dial Transplant* 1996, 11, 293-9.
129. Van den Berghe G. How does blood glucose control with insulin save lives in intensive care? *J Clin Invest* 2004, 114, 1187-95.
130. Van den Berghe G, Wouters PJ, Bouillon R, Weekers F, Verwaest C, Schetz Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: Insulin dose versus glycemic control. *M.Crit Care Med* 2003, 31, 359-66.
131. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001, 345, 1368-77.
132. Netti G S, Centonze D, Gesualdo L. Biofiltri e Biosensori *Giornale Italiano Di Nefrologia* 2007, 24, S87-S93.

133. Liedermann K, LapEik Jr E. Study of Low-Frequency Dielectric Relaxations in Polysaccharides for Medical Applications, Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena, 1996 San Francisco, 20-23,
134. E. Barsoukov, J. Ross Macdonald. Impedance spectroscopy, Wiley-Interscience, Second Edition 2005.
135. Riande E, Diaz-Calleja R. Electrical Properties of Polymers Edited by Marcel Dekker 2004.
136. Awan S A, Kibble B P, Towards accurate measurement of the frequency dependence of capacitance and resistance standards up to 10 MHz, IEEE Trans. Instrum. Meas. 2005, 54, 516–20.
137. M. Lakomek, H. Winkler, Erythrocyte pyruvate kinase-and glucose phosphate isomerase deficiency: perturbation of glycolysis by structural defects and functional alterations of defective enzymes and its relation to the clinical severity of chronic hemolytic anemia. Biophys. Chem. 1997, 66, 269–84.
138. van Wijk R, van Solinge W W, The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. Blood 2005, 106, 4034–42.
139. Chan A Y, Swaminathan R, Cockram C S. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood, Clin. Chem. 1989, 35, 315–17.
140. Wakamatsu H. A dielectric spectrometer for liquid using the electromagnetic induction method. Hewlett-Packard J. 1997, 48, 37-44.
141. Atkins P, De Paula J. *Physical Chemistry* 2006, 8th ed. Oxford University Press: Oxford, UK
142. Oberg K A, Fink A L. A New Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy Method for the Study of Proteins in Solution. Analytical Biochemistry 1998, 256, 92-106.

143. Gabriel C S, Corthout E. The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey. *Physics in Medicine and Biology* 1996, 41, 2231.
144. Hayashi Y, Livshits L, Caduff A, Feldman Y D Dielectric spectroscopy study of specific glucose influence on human erythrocyte membranes *Journal of Physics D: Applied Physics* 2003, 36, 369-74.
145. Park J H, Kim C S, Choi B C, The correlation of the complex dielectric constant and blood glucose at low frequency, *Biosens. Bioelectron.* 2003, 19, 321-4.
146. Pethig R, Kell D B, The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology, *Phys. Med. Biol.* 1987, 32, 933-70.
147. Park J S, Choi J H, Woo J J, Moon S H. An electrical impedance spectroscopic (EIS) study on transport characteristics of ion-exchange membrane systems. *J. Colloid. Interf. Sci.* 2006, 300, 655-62.
148. Vazquez M I, Benavente J, A study of temperature effect on chemical, structural and transport parameters determined for two different regenerated cellulose membranes, *J. Membrane Sci.* 2003, 219, 59-67.
149. Gourzi M, Rouane A, Guelaz R, Alavi M S, McHugh M B, Nadi M, et al. Noninvasive glycaemia blood measurements by electromagnetic sensor: study in static and dynamic blood circulation, *J. Med. Eng. Technol.* 2005, 29, 22-6.
150. Fuchs K, Kaatze U, Molecular dynamics of carbohydrate aqueous solutions. Dielectric relaxation as a function of glucose and fructose concentration, *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 2036–42.
151. Mashimo S, Miura N, Umehara T. The structure of water determined by microwave dielectric study on water mixtures with glucose, polysaccharides, and L-ascorbic acid, *J. Chem. Phys.* 1992, 97, 6759–65.
152. Zhao T X. Electrical impedance and haematocrit of human blood with various anticoagulants, *Physiol. Meas.* 1993, 14, 299–307.

153. Huang M, Papangelakis V G. High-temperature conductivity measurements of concentrated NaCl-H₂SO₄-H₂O solutions up to 250 °C. Ind. Eng. Chem. Res. 2009 , 48, 2781-85.

ATTIVITA' DI RICERCA

In questi anni di attività di ricerca ho avuto la fortuna di lavorare con due gruppi di ricerca, diretti dall'Ing. Giovanni Pacini (ISIB-CNR) e dal Prof. Paolo Tessari (Malattie del Metabolismo-Università di Padova); ho potuto in questo modo approfondire diverse tematiche di ricerca oltre a quelle riportate in questo lavoro:

- Studi di proteomica per la ricerca di marker predittivi di nefropatia diabetica.
- Modelli matematici applicati al metabolismo, al diabete e alle sue complicanze.
- Analisi dell'attività di CK2 e AKT in colture di fibroblasti cutanei di pazienti normali, diabetici e diabetici con nefropatia.

Queste attività hanno prodotto le pubblicazioni riportate in seguito (segnalo solo i *full paper* su rivista internazionale).

- ✓ Electroimpedance spectroscopy for the measurement of the dielectric properties of sodium. **Sbrignadello S**, Tura A, Ravazzani P. Measurements [under second review]
- ✓ Influence of Increasing BMI on Insulin Sensitivity and Secretion in Normotolerant Men and Women of a Wide Age Span. Kautzky-Willer A, Brazzale AR, Moro E, Vrbíková J, Bendlova B, **Sbrignadello S**, Tura A, Pacini G. Obesity (Silver Spring). 2012 Jan 26. [Epub ahead of print]
- ✓ High abundance proteins depletion vs low abundance proteins enrichment: comparison of methods to reduce the plasma proteome complexity. Millions R, Tolin S, Puricelli L, **Sbrignadello S**, Fadini GP, Tessari P, Arrigoni G. PLoS One. 2011 May 4;6(5):e19603.

- ✓ Operator- and software-related post-experimental variability and source of error in 2-DE analysis. Millions R, Puricelli L, **Sbrignadello S**, Iori E, Murphy E, Tessari P. *Amino Acids*. 2011 Mar 11. [Epub ahead of print]
- ✓ Shape of glucose, insulin, C-peptide curves during a 3-h oral glucose tolerance test: any relationship with the degree of glucose tolerance? Tura A, Morbiducci U, **Sbrignadello S**, Winhofer Y, Pacini G, Kautzky-Willer A. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011 Apr;300(4):R941-8. Epub 2011 Jan 19.
- ✓ Improved instrumentation for large-size two-dimensional protein maps. Millions R, Miuzzo M, Puricelli L, Iori E, **Sbrignadello S**, Dosselli R, Cecconi D, Tessari P, Righetti PG. *Electrophoresis*. 2010 Dec;31(23-24):3863-6.
- ✓ The inter- and intra-operator variability in manual spot segmentation and its effect on spot quantitation in two-dimensional electrophoresis analysis. Millions R, **Sbrignadello S**, Tura A, Iori E, Murphy E, Tessari P. *Electrophoresis*. 2010 May;31(10):1739-42.
- ✓ Delta2D and Proteomweaver: Performance evaluation of two different approaches for 2-DE analysis. Millions R, Miuzzo M, **Sbrignadello S**, Murphy E, Puricelli L, Tura A, Bertacco E, Rattazzi M, Iori E, Tessari P. *Electrophoresis*. 2010 Apr;31(8):1311-7.
- ✓ SDS-PAGE and two-dimensional maps in a radial gel format. Millions R, Miuzzo M, Antonioli P, **Sbrignadello S**, Iori E, Dosselli R, Puricelli L, Kolbe M, Tessari P, Righetti PG. *Electrophoresis*. 2010 Jan;31(3):465-70.
- ✓ A low frequency electromagnetic sensor for indirect measurement of glucose concentration: in vitro experiments in different conductive solutions. Tura A, **Sbrignadello S**, Cianciavicchia D, Pacini G, Ravazzani P. *Sensors (Basel)*. 2010;10(6):5346-58. Epub 2010 May 28.

- ✓ An empirical index of insulin sensitivity from short IVGTT: validation against the minimal model and glucose clamp indices in patients with different clinical characteristics. Tura A, **Sbrignadello S**, Succurro E, Groop L, Sesti G, Pacini G. *Diabetologia*. 2010 Jan;53(1):144-52. Epub 2009 Oct 30.

- ✓ Impedance spectroscopy of solutions at physiological glucose concentrations. Tura A, **Sbrignadello S**, Barison S, Conti S, Pacini G. *Biophys Chem*. 2007 Sep;129(2-3):235-41. Epub 2007 Jun 9.

RINGRAZIAMENTI

Questo mio lavoro è frutto di anni di attività; tutto questo però non sarebbe stato possibile senza il contributo scientifico dei colleghi e il sostegno morale di parenti e amici.

Desidero quindi ringraziare:

L'Ing. Giovanni Pacini, l'Ing. Andrea Tura e tutto l'ISIB-CNR di Padova.

Il Prof. Paolo Tessari, il Dott. Renato Millions, la Dott. Elisabetta Iori e tutto il gruppo metabolico del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Padova.

Alessia...perché diciamo celo; avere accanto una letterata in questi frangenti è una grande cosa!

Mio padre e tutta la mia famiglia, per il sostegno e la pazienza.

Gli amici, che per mia fortuna sono tanti, che mi sono stati vicini in questi anni, siete troppi da nominare, ma sapete che il vostro nome è scritto qui sotto...

Grazie a tutti voi.

Stefano