



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ
FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

**Mikrovlnný senzor pro stanovení koncentrace
glukózy v krvi**

Microwave Sensor for Blood Glucose Monitoring

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský inženýr

Autor diplomové práce: Bc. Jan Platzner

Vedoucí diplomové práce: doc. Dr. Ing. Jan Vrba, M.Sc.

Kladno 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Mikrovlnný senzor pro stanovení koncentrace glukózy v krvi“ vypracoval samostatně a použil k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně 19.5.2017

Bc. Jan Platzer

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu této práce doc. Dr. Ing. Janu Vrbovi, M.Sc. a konzultantovi práce Ing. Davidu Vrbovi, Ph.D. za cenné připomínky, užitečné rady a poskytnutí odborné literatury.

ABSTRAKT

Mikrovlenný senzor pro stanovení koncentrace glukózy v krvi

Je známo, že permitivita a vodivost krve v mikrovlenném pásmu je ovlivněna koncentrací glukózy v krevní plazmě. K detekci těchto změn je možné využít mikrovlenných senzorů, jejichž výhody spočívají v neinvazivnosti a možnosti měření v reálném čase.

Cílem této práce bylo vytvořit a otestovat numerický model mikrovlenného senzoru glukózy v programu COMSOL Multiphysics pro 2 různé dielektrické modely roztoku krev-glukóza. První model předpovídá lineární a druhý nelineární závislost permitivity. Geometrie vycházela z již existujícího návrhu metamateriálového senzoru. Numerické simulace byly porovnány s experimentálním měřením fáze S_{21} parametru na vyrobeném senzoru a prasečí krvi s přidanou koncentrací glukózy až do 33 mmol/l. U všech experimentálních měření byla pozorována nelineární charakteristika průběhu fáze v závislosti na koncentraci glukózy. V souladu s aktuálními poznatky z literatury, s vyšší hodnotou glykémie klesaly i měřitelné dielektrické změny. Regresní analýza byla provedena proložení naměřených hodnot polynomem 2. stupně, u jehož koeficientů byl určen interval spolehlivosti. Při experimentech bylo dosaženo změny fáze až k 60° při zvýšení koncentrace z 5 na 18 mmol/l. To značí velkou senzitivitu senzoru na změnu permitivity krve. U výsledků simulací založených na obou modelech byl pozorován opačný průběh závislosti změny fáze na koncentraci glukózy, než jaký byl pozorován u experimentálního měření.

Klíčová slova

Mikrovlenný senzor, metamateriál, neinvazivní měření glukózy

ABSTRACT

Microwave Sensor for Blood Glucose Monitoring

It is known that the permittivity and the conductivity of the blood in the microwave band is affected by blood plasma glucose level. Microwave sensors can be used to detect these changes, with the benefits which are a non-invasiveness and possibility of real-time measurements.

The aim of this work was to create and test the numerical model of the microwave glucose sensor in the COMSOL Multiphysics software for two different dielectric blood glucose models. The first model predicts linear and second nonlinear dependence on permittivity. Geometry is based on an existing metamaterial sensor design. Numerical simulations were compared with the experimental measurements of the phase of S_{21} parameter with use of fabricated sensor. The pig blood with an added glucose concentration of up to 33 mmol/l was used for experimental measurements. In all experimental measurements, a nonlinear phase characteristic was observed depending on the glucose concentration. According to the actual knowledge the higher glycemic values resulted in smaller dielectric changes. The regression analysis was carried out by fitting the measured values by a polynomial of the 2nd degree. The confidence intervals of those coefficients were determined. During the experiments, a phase change of up to 60 ° was achieved at an increased concentration from 5 to 18 mmol/l. It shows the high sensitivity of the sensor to changes of the permittivity of the blood. In the simulation results based on both models, the opposite trend of phase dependence on glucose concentration was observed in comparison with experimental measurements.

Keywords

microwave sensor, metamaterial, non-invasive glucose sensing

Obsah

1 Úvod	13
1.1 Přehled současného stavu	13
1.2 Cíle práce	15
2 Popis problematiky měření glukózy v krvi	16
2.1 Současný stav klinického měření glykémie	16
2.2 Vliv místa odběru na naměřenou koncentraci glukózy a její zpoždění . .	17
2.3 Současný stav kontinuálního měření glykémie	18
2.4 Hodnocení přesnosti glukometru	18
3 Princip měření krevní glukózy mikrovlnným senzorem	19
3.1 Dielektrické vlastnosti biologických tkání	19
3.2 Komplexní permitivita a vodivost	19
3.3 Matematické modelování permitivity tkáně	22
3.4 Dielektrické vlastnosti červených krvinek	23
3.4.1 Dielektrické vlastnosti v regionu MHz	23
3.4.2 Dielektrické vlastnosti v regionu GHz	24
3.4.3 Efekt morfologie	27
3.4.4 Agregace červených krvinek	28
3.4.5 Vliv hematokritu na dielektrické parametry	28
3.5 Princip funkce mikrovlnného senzoru	29
3.6 Princip metamateriálového senzoru	29
4 Metody	33
4.1 Výběr geometrie senzoru	33
4.1.1 Rozměry senzoru	33
4.2 Počítačový model v softwaru COMSOL	35
4.2.1 Implementace geometrie	35
4.2.2 Model krve 1	36
4.2.3 Model krve 2	38
4.2.4 Porovnání modelů	42
4.2.5 Ostatní nastavení simulace	44
4.2.6 Výroba senzoru a příslušenství k měření	46
4.3 Metody experimentálního měření	47
4.3.1 Odběr vzorků	48
4.3.2 Experiment č.1	48
4.3.3 Experiment č.2	49
4.3.4 Experiment č.3	49

4.3.5	Experiment pro změření časové odezvy senzoru na skok v koncentraci glukózy	49
4.4	Zpracování dat	50
4.5	Metoda odhadu koncentrace glukózy na základě vytvořeného regresního modelu	51
5	Výsledky	52
5.1	Simulace v programu COMSOL	52
5.1.1	Simulace modelu krve 1	52
5.1.2	Simulace modelu krve 2	55
5.2	Výsledky experimentálního měření	57
5.2.1	Experiment 1	58
5.2.2	Experiment 2	61
5.2.3	Experiment 3	64
5.2.4	Časový průběh změny fáze při přidání glukózy	67
5.3	Porovnání experimentů a simulací	68
5.4	Odhad koncentrace glukózy na základě vytvořeného regresního modelu	71
5.5	Clarkova síťová chybová analýza	72
6	Diskuze	73
7	Závěr	77
A	Obsah přiloženého CD	85

Seznam symbolů a zkratek

Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
\mathbf{p}	$\text{C} \cdot \text{m}$	Elektrický dipólový moment
\mathbf{E}	$\text{V} \cdot \text{m}$	Vektor elektrického pole
\mathbf{P}	$\text{C} \cdot \text{m}^{-2}$	Vektor polarizace
ϵ_0	$8,85 \cdot 10^{-12} \text{ F} \cdot \text{m}^{-1}$	Permitivita vakua
χ	–	Elektrická susceptibilita
\mathbf{D}	$\text{C} \cdot \text{m}^{-2}$	Vektor elektrické indukce
ϵ_s	–	Statická permitivita
E_0	$\text{V} \cdot \text{m}$	Amplituda elektrického pole
D_0	$\text{V} \cdot \text{m}$	Amplituda elektrického indukce
ω	$\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$	Úhlová frekvence
f	Hz	Frekvence
i	–	Imaginární jednotka
δ	rad	Fázový rozdíl
*	–	Označení komplexního charakteru veličiny
ϵ	$\text{F} \cdot \text{m}$	Permitivita
'	–	Označení reálné části komplexní veličiny
"	–	Označení imaginární části komplexní veličiny
W	J	Disipovaná energie v dielektriku
σ_s	$\text{S} \cdot \text{m}$	Statická vodivost
\mathbf{j}	$\text{A} \cdot \text{m}^{-2}$	Vektor proudové hustoty
ϵ_∞	–	Optická permitivita $\omega \rightarrow \infty$
τ	s	Relaxační časová konstanta
$\Delta\epsilon$	–	Velikost disperze
α	–	Parametr popisující rozšíření disperze
C_m	F	Kapacitance membrány
μ	$\text{H} \cdot \text{m}^{-1}$	Permeabilita
β	$\text{rad} \cdot \text{m}^{-1}$	Fázová konstanta šíření
l	m	Délka
φ	°	Fáze vlny
Φ	$\text{rad} \cdot \text{F}$	Citlivost fázové konstanty na změnu kapacity
c_g	$\text{mmol} \cdot \text{l}$	Koncentrace glukózy v krvi
e_{eff}	–	Efektivní permitivita

l	m	Délka vedení
n	–	Počet buněk
dz	m	Délka buňky
η	–	Frakce inkluzí
S_{21}^*	–	S parametr přenosu
$ S_{21} $	dB	Modul S parametru přenosu
Ψ	$^{\circ} \cdot l \cdot \text{mmol}^{-1}$	Citlivost senzoru na změnu koncentrace glukózy
L	H · m	Měrná indukčnost
C	F · m	Měrná kapacita
$p(k)$	–	k -tý parametr odhadů koeficientů polynomu
SS_E	–	Reziduální součet čtverců
α_p	–	Hladina statistické významnosti
R^2	–	Koeficient determinace
R_{adj}^2	–	Upravený koeficient determinace
N	–	Počet naměřených hodnot

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
MTM	Metamateriál
RBC	Červená krvinka (z ang. Red Blood Cell)
CGM	Kontinuální měření glykémie (z ang. Continual Glucose Measurement)
HTK	Hematokrit
DUT	Testované zařízení (z ang. Device Under Test)
CE	Označení shody s normami Evropské unie (z fr. Conformité Européenne)
NIR	Blízké infračervené světlo (z ang. Near Infrared)
SRR	Kruhový šterbinový rezonátor (z ang. Split Ring Resonator)
SMBG	Kontrola hladiny glukózy pacientem (z ang. Self Management Blood Glucose)
SD	Směrodatná odchylka (z ang. Standard Deviation)
MARD	Průměrný absolutní relativní rozdíl (z ang. Mean Absolute Relative Difference)
EGA	Chybová analýza (u ang. Error Grid Analysis)
GLUT1	Typ glukózového přenašeče na membráně červených krvinek
GLUT5	Typ fruktózového přenašeče na membráně červených krvinek
ATP	Adenosintrifosfát
AMP	Adenosinmonofosfát
CC	Cole-Cole (model)
PBS	Fosfátový pufr (z ang. Phosphate Bufferede Saline)
LH	Levotočivý (z ang. Left Handed)
RH	Pravotočivý (z ang. Right Handed)
CRLH	Kompozit pravo/levotočivého vedení (z angl. Composite Right Left Handed)
PLA	Kyselina polymléčná (z ang. Polyactid Acid)
SMA	Typ koaxiálního konektoru (z ang. SubMiniature version A)
RF	Radiofrekvenční
DUT	Měřené vedení (z ang. Device Under Test)
SE	Standardní chyba (z ang. Standard Error)

Seznam obrázků

2.1	Rozdíl v naměřené koncentraci mezi kapilární a venozní krví	17
2.2	Clarkova síťová chybová analýza	19
3.1	Disperze biologické tkáně	21
3.2	Hypotetický model efektu způsobeného změnou koncentrace glukózy . .	24
3.3	Závislost efektivního počtu molekul vody v hydratačním obalu kolem ATP a AMP na jejich koncentraci v roztoku	26
3.4	Závislost relaxačního času na koncentraci glukózy červené krvinky . . .	26
3.5	Příklady různé morfologie červených krvinek	27
3.6	Normalizovaná kapacitance membrány červených krvinek v závislosti na koncentraci glukózy pro bikonkávní erythrocyty a sférocyty	28
3.7	Schéma měření S-parametrů	30
3.8	Ekvivalentní náhradní obvod pro RH, LH a CRLH	30
3.9	Disperzní diagram pro CRLH vedení	32
3.10	Porovnání fázové změny mezi CRLH a RH vedením	32
4.1	Rozměry jedné buňky vedení	33
4.2	Geometrie navrženého senzoru - příložná část	34
4.3	Rozměry geometrie modelu	35
4.4	Rozměry geometrie modelu	35
4.5	Celkový pohled na model	36
4.6	Model 1 - frekvenční závislost permitivity	37
4.7	Model 1 - závislost reálné části permitivity na koncentraci glukózy . . .	37
4.8	Model 2 - cytoplazma krvinek - frekvenční závislost permitivity	39
4.9	Model 2 - cytoplazma krvinek - závislost permitivity na koncentraci glukózy	39
4.10	Model 2: kompletní - frekvenční závislost permitivity krve	40
4.11	Model 2: kompletní po použití směšovací rovnice - závislost reálné části permitivity na koncentraci glukózy	41
4.12	Porovnání obou modelů ve frekvenčním spektru	42
4.13	Porovnání obou modelů v závislosti na koncentraci glukózy	43
4.14	Porovnání vodivostí obou modelů	43
4.15	Umístění dokonalého vodiče v modelu	45
4.16	Rozdělení modelu na konečný počet prvků	45
4.17	Vyrobený senzor	46
4.18	Zasazení senzoru do krabičky	46
4.19	Zapojení měřicí soustavy	47
5.1	Simulace modelu 1 - Citlivost	52
5.2	Simulace modelu 1 - Fáze na zvolených frekvencích GHz	53
5.3	Simulace modelu 1 - $ S_{21} $	53
5.4	Simulace modelu 1 - Fáze	54

5.5	Simulace modelu 2 - Citlivost	55
5.6	Simulace modelu 2 - Fáze na zvolených frekvencích GHz	55
5.7	Simulace modelu 2 - $ S_{21} $	56
5.8	Simulace modelu 2 - Fáze	56
5.9	Experiment 1 - Citlivost	58
5.10	Experiment 1 - $ S_{21} $	58
5.11	Experiment 1 - Fáze	59
5.12	Experiment 1 - Fáze na 1,854 GHz	59
5.13	Experiment 1 - Fáze na 1,938 GHz	60
5.14	Experiment 2 - Citlivost	61
5.15	Experiment 2 - $ S_{21} $	61
5.16	Experiment 2 - Fáze	62
5.17	Experiment 2 - Fáze na 1,868 GHz	62
5.18	Experiment 2 - Fáze na 1,933 GHz	63
5.19	Experiment 3 - Citlivost	64
5.20	Experiment 3 - $ S_{21} $	64
5.21	Experiment 3 - Fáze	65
5.22	Experiment 3 - Fáze na 1,863 GHz	65
5.23	Experiment 3 - Fáze na 1,927 GHz	66
5.24	Časový průběh odezvy senzoru na přidání glukózy	67
5.25	Porovnání citlivostí ze všech experimentálních měření a simulací	68
5.26	Porovnání změřené a simulované fáze	69
5.27	Porovnání změřených a simulovaných parametrů $ S_{21} $	69
5.28	Proložené průběhy závislosti změn fáze na koncentraci glukózy z měření a simulací	70
5.29	Data pro odhad neznámé koncentrace glukózy	71
5.30	Clarkova chybová analýza z naměřených hodnot	72

1 Úvod

Onemocnění Diabetes mellitus (DM) je jednou z hlavních příčin mortality a morbidity v mnoha zemích. V roce 2011 bylo onemocněním DM postiženo 366 milionu lidí a z důvodu stárnutí populace, nezdravého stravování, nedostatku pohybu a obezity je predikován počet nemocných DM na 552 milionů v roce 2030 [1]. DM je patologický stav, kdy tělo nedokáže udržet hodnotu krevní glukózy ve fyziologickém množství. Léčba je v současnosti dle typu DM založena na dietě, měření koncentrace glukózy v krvi, orální medikaci a inzulinových injekcích. Všechny tyto úkony mají negativní vliv na kvalitu života pacienta.

Pacienti s DM typu I a II jsou závislí na měření glukózy několikrát za den za účelem optimalizace léčby a stanovení dávky inzulinu. Nejčastěji využívanými jsou kapesní glukometry měřící glukózu v kapilární krvi invazivně odebrané z konečků prstů.

Invazivní měření s sebou nese několik nevýhod. Mezi ně patří poškození tkáně, strach pacientů z odběru krve a riziko infekce. Klasické glukometry také neumožňují kontinuální měření, a tak nedokáží upozornit pacienta na přicházející stav hypo či hyperglykémie.

Neinvazivní metody by výše uvedené nevýhody neměly, ale jsou stále v rané fázi vývoje. Je zkoumáno velké množství různých metod jako je bioimpedanční spektroskopie, elektromagnetické metody (mikrovlnné), fluorescenční techniky, MIR a NIR spektroskopie, optická koherenční tomografie, Ramanova spektroskopie, reverzní iontoforéza a ultrazvuková technologie [1]. Všechny tyto nové techniky mají určité výhody a nevýhody a zatím nejsou klinicky využívány.

1.1 Přehled současného stavu

Jedním ze slibných přístupů k neinvazivnímu měření glukózy je využití mikrovlnné technologie. Množství glukózy v krvi přímo ovlivňuje její dielektrické vlastnosti, což umožňuje detekci změn pomocí mikrovlnných senzorů [2, 3].

Bylo zjištěno, že D-glukóza specificky ovlivňuje elektrické vlastnosti membrány a cytoplazmy erytrocytů na rozdíl od L-glukózy, která je metabolicky nečinná [2, 4]. Přítomnost glukózy také ovlivňuje iontovou rovnováhu. Empirický vztah pro pokles extracelulární koncentrace Na^+ iontů při zvýšení koncentrace D-glukózy v krvi uveřejnil [5]. Samotná přítomnost glukózy v tekutině výrazně neovlivňuje její dielektrické vlastnosti. V krvi ale působí nepřímo, kde způsobuje další biochemické reakce červených krvinek (RBC)[4,6], které jsou v krvi nejpočetnějšími elementy.

Proto se jako nevhodné ukázalo použití *in vitro* fyziologického roztoku s obsahem glukózy jako modelu krve. Na rozdíl od prasečí krve se na tomto roztoku nedokázala prokázat významná změna měřené veličiny (změna rezonanční frekvence) při zvýšení koncentrace glukózy [7].

Jediné dostupné CC (Cole-Cole) modely dielektrických vlastností krve uveřejnili

[8] a později ho upravili ve své další práci [9] pro frekvenční rozsah 500 MHz až 8 GHz. Tento upřesněný model je výchozím modelem v této práci. Další dostupné studie vytvořily modely pro krevní plazmu s přidanou glukózou až do frekvence 100 GHz [10] a model roztoku glukózy ve vodě a fyziologickém roztoku (500 MHz–67 GHz) [11]. Nejaktuálnější studie [4] uvedla CC model cytoplazmy krvinek pro koncentrace glukózy od 0 do 20 mM, kde ukázali nelineární závislost průběhu permitivity na koncentraci.

Komerčně dostupný (s CE prohlášením o shodě) neinvazivní glukometr je systém GlucoTrack od společnosti Integrity Applications určený pro pre-diabetiky a diabetiky II. typu [12]. Tento systém využívá několik typů senzorů umístěných v klipu na ušní lalůček. Aby zvýšil přesnost, využívá měření tepelných vlastností tkáně (jako je tepelná kapacita a vodivost), fázovou změnu procházející ultrazvukové vlny a také elektromagnetické vlnění k detekci dielektrických změn o neuvedené frekvenci [13].

Druhý komerčně dodávaný neinvazivní glukometr of Firmy Cnoga Medical má také CE prohlášení o shodě a funguje na principu NIR (blízké infračervené světelné) spektroskopie. [14]

Mikrovlnné senzory, které byly navrženy, ale reálně neotestovány udává práce [15], kde byly simulovány na modelu vodného roztoku s glukózou mikropáskový prstencový, jednoduchý spirální a dvojité spirální mikropáskový rezonátor, kde jako nejcitlivější se ukázal jednoduchý spirální rezonátor. V práci [16] byla navržena širokopásmová monopólová anténa na virtuálním složeném modelu tkáně. Disertační práce [17] simulovala 6 různých mikropáskových rezonátorů a porovnávala posuny rezonanční frekvence pro virtuální model složené tkáně, kde největší citlivosti dosáhl jednoduchý spirální mikropáskový rezonátor. U všech zmíněných prací docházelo se zvyšováním koncentrace glukózy ke zvýšení rezonanční frekvence. Další studie provedli měření *in vitro* pomocí mikrovlnných senzorů na bázi mikropáskové obdélníkové antény na fyziologickém roztoku a prasečí krvi [7], mikropáskového vedení na vodném roztoku a lidské krvi [18], vlnovodu na kozí krvi [19], spirálního mikropáskového rezonátoru na fantomu krve [20] a na prasečí krvi [21]. Výsledky těchto studií ukázaly, že posun rezonanční frekvence (zvýšení hodnoty rezonanční frekvence se zvýšením koncentrace) je závislý na koncentraci glukózy a nejlepší senzitivity dosahují spirální mikropáskové rezonátory.

Při měření *in vivo* byly použity senzory na bázi spirálního mikropáskového rezonátoru umístěného na palec při 100 MHz až 5 GHz [22] a na zápěstí při 1,4 GHz [23]. Obě studie ukázaly, že lze odhadovat koncentraci glukózy v krvi a to v reálném čase, ale zdůrazňují potřebu individuální kalibrace každého měřeného subjektu komerčním invazivním glukometrem. Studie [24] využila senzor obsahující 2 oddělené tzv. Split ring rezonátory (SRR) při měření *in vivo* koncentrace glukózy na subjektu po dobu 12 hodin. Senzor ukázal, že dokáže v reálném čase sledovat skutečnou hodnotu (tato studie byla ale provedena pouze na jednom subjektu).

Všechny předešlé práce používali zejména mikropáskové senzory založené na změně rezonanční frekvence při změně permitivity krve nebo poklesu amplitudy modulu

$|S_{11}|$ nebo $|S_{21}|$ parametru.

Žádná z prací ale nevyužívá měření změny fáze S_{21}^* parametru pomocí realizovaného metamateriálového senzoru. Ten by teoreticky měl dosahovat až 10 krát větší senzitivity změny fáze než běžné mikropáskové senzory, což vychází z jeho disperzní charakteristiky (tj. blíže popsána v kapitole 3.6 na str. 29).

1.2 Cíle práce

Cílem práce je otestovat mikrovlnný senzor na bázi metamateriálové struktury schopný detekovat změny koncentrace glukózy v krvi. Jejich výhody spočívají ve velké geometrické flexibilitě (možnost vytvořit velice malých senzorů při zachování delších vlnových délek) a vysoké citlivosti na dielektrické změny měřeného materiálu. Tyto vlastnosti jsou ideální pro vytvoření mikrovlnného senzoru glukózy, který bude mít vysokou citlivost a malý rozměr a v případě měření na reálných subjektech, by se dal umístit na dobře prokrvená místa, jako je ušní lalůček nebo místa s tepnou pod povrchem kůže. Z důvodů nedostatku kvalitních informací, které by kvantifikovali dielektrické změny v závislosti na koncentraci glukózy v krvi, bude provedena série numerických simulací na 2 dostupných virtuálních modelech a následně se porovnají s experimentálním měřením. Princip je založený na měření změny fáze vlny v mikrovlnném pásmu procházející skrz prasečí krev o známé koncentraci glukózy. Cílem experimentálního měření je určit skutečnou závislost měřené veličiny na koncentraci glukózy a diskutovat nejvhodnější frekvenční pásmo pro měření.

2 Popis problematiky měření glukózy v krvi

Glukóza je nejdůležitější sacharid v lidském těle. Po jídle většina glukózy pochází z trávicího procesu. Při hladovění jsou hlavními zdroji glukózy procesy zvané glukoneogeneze (tvorba nové glukózy) a glykogenolýza (štěpení zásobního sacharidu glykogenu na glukózu). Stav s nižší než fyziologickou hodnotou koncentrace krevní glukózy (glykémie) se nazývá *hypoglykémie* a s vyšší hodnotou *hyperglykémie*.

Hypoglykémie může způsobit hypoglykemický šok nebo poruchy nervového systému. Hyperglykémie je zodpovědná za poškození tkáně. Hlavnímu poškození podléhají buňky kapilárního endotelu sítnice, mesangiální buňky v renálních glomerulech, neurony a Schwannovi buňky v periferních nervech. Tyto tkáně totiž nedokáží omezit transport glukózy do buněk, tak aby její vnitřní koncentrace zůstala nízká [25].

Tato kapitola se bude zabývat současným stavem měření glykémie a faktory ovlivňujícími výsledky těchto měření. Dále jsou zmíněny výhody systému kontinuálního měření a na závěr je popsán současný model hodnocení přesnosti glukometrických systémů.

2.1 Současný stav klinického měření glykémie

Jedním z největších pokroků v managementu léčby diabetu bylo vytvoření systému využívající oxidaci glukózy a měření vzniklého peroxidu vodíku, který se váže na reagentie například na testovacím proužku. To se následně vyhodnocuje buď spektrofotometricky nebo ampérometricky a tato metoda umožnila rozšíření kapesních glukometrů určených pro domácí použití - SMBG (Self management blood glucose) [26].

Pro testy určující dlouhodoběji a zpětně stav glykémie se využívá měření koncentrace glykovaného hemoglobinu (HbA1c) v krvi, který reflektuje průměrnou glykémii z období předchozích 8 až 12 týdnů [27]

Pro určení diagnózy DM byl zaveden tzv glukózový toleranční test. Pacientovi je ráno na lačno podáno množství glukózy (nejčastěji 75 g) rozpuštěné ve vodě a měří se koncentrace glukózy po půl hodině až do 2 hodin od podání. Dle výsledků se stanovuje diagnóza a závažnost DM [26].

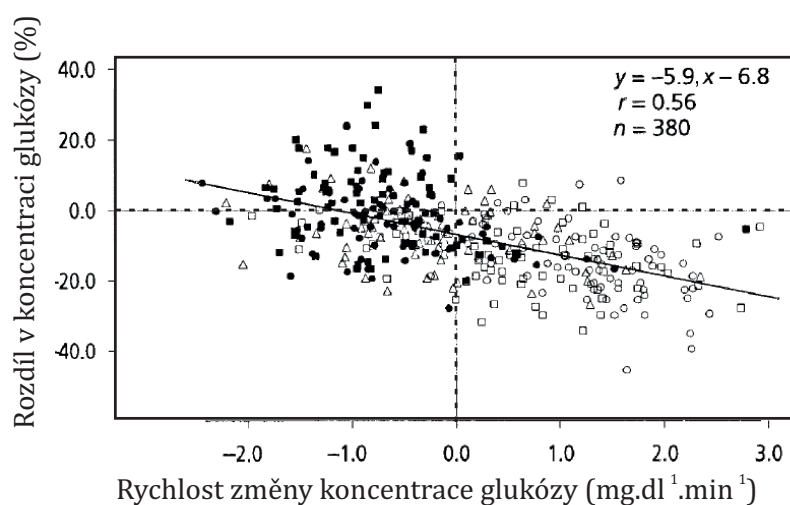
Při laboratorním měření se používá třech základních typů měření: redukční metody, kondenzační metody a enzymatické metody. Redukční metody se laboratorně příliš nepoužívá, kvůli její nespecifitě. U kondenzační metody dochází k několikasupňové reakci zakončené spektrofotometrickým měřením. Výhodou je vysoká citlivost, ale kvůli toxicitě použité reagentie o-toluidinu se od metody opouští [26]. Enzymatické reakce využívají většinou jeden ze 3 enzymů: glukózooxidázu, glukó-1-dehydrogenázu a hexokinázu. Enzym hexokináza je často používána v laboratořích jako referenční metoda [28].

Faktory, které mohou ovlivnit měření glukózy výše uvedenými metodami jsou zejména hypotenze, hematokrit (HTK), stupeň oxygenace, pH a teplota [28].

2.2 Vliv místa odběru na naměřenou koncentraci glukózy a její zpoždění

Nejvyšší koncentrace glukózy se vyskytuje v arteriální krvi a nejnižší v krvi žilní. Kapilární krev ukazuje hodnoty, které jsou mezi těmi naměřenými v arteriální a žilní krvi. Zahřátí konečků prstů způsobí zvýšení průtoku kapilárami, a tudíž přivedení většího množství arteriální krve, čímž zvýší naměřenou koncentraci glukózy a naopak. Jak erytrocyty tak leukocyty obsahují glykolytické enzymy které dokáží způsobit pokles od 5 % za hodinu až po 40 % za 3 hodiny od odběru [26]. Obecně je v plné krvi koncentrace glukózy o 15 % nižší, než u plazmy a tento rozdíl se snižuje se snižujícím se HTK [26].

Čím se koncentrace glukózy v těle rychleji mění, například v důsledku požití velkého množství sacharidů, tím se krev odebraná z konečku prstů (kapilární krev) a krev odebraná z žíly na předloktí a ze stehna více liší [29]. Hodnoty naměřené ve stehně a předloktí se zpožďují za těmi změřenými z konečku prstu. Obrázek 2.1 ukazuje, jak se mění odchylka mezi koncentrací glukózy ve venózní krvi z předloktí a kapilární krvi z prstu v závislosti na rychlosti změny koncentrace.



Obrázek 2.1: Procentuální rozdíl v naměřené koncentraci v krvi odebrané z konečku prstu a z venózní krve z předloktí v závislosti na rychlosti změny krevní glukózy. Body odpovídají změřené koncentraci po podání tekutých sacharidů v čase \circ 60 min, \square 90 min, \triangle 120 min a \bullet 150 min, \blacksquare 180 min. Graf převzat a upraven z [29]

Při kontinuálním měření se využívá měření koncentrace glukózy z intersticiální tekutiny. Zjistilo se, že pro diabetiky I. druhu u tohoto měření dochází k prodlevě, kdy se koncentrace v intersticiální tekutině zpožďuje za odebranou venózní krví. Studie [30] toto zpoždění určila průměrně ($\pm SD$) na $6,7 \pm 5,1$ min.

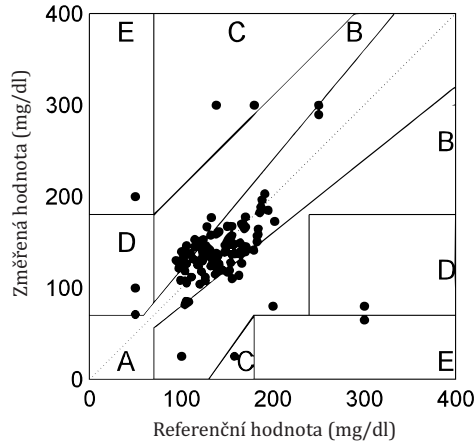
2.3 Současný stav kontinuálního měření glykémie

Pro udržení fyziologických hodnot koncentrace glukózy v krvi, je velice důležité její časté měření. Udržení těchto hodnot je v současnosti jediný způsob, jak může diabetik vést život bez již zmíněných ohrožujících zdravotních komplikací. Čím častěji si pacienti s diabetem I typu měří glykémii, tím mají menší koncentraci glykovaného hemoglobinu (HbA1c) v krvi. Ve studii [31], které se účastnilo 129 pacientů s diabetem I. typu byl celkový čas, ve kterém se krevní hladina cukru pohybovala mimo fyziologické koncentrace (<70 a >180 mg/dL) byl o 114 minut za den nižší u pacientů s CGM (kontinuálním) systémem (377 a 491 min/den). Kontinuální měření zvyšuje také bezpečnost pacienta, jelikož může detekovat větší krátkodobé výkyvy vedoucí k vážné hypo a hyperglykemii. Je to také nezbytný krok k vývoji systému s uzavřenou smyčkou pro dávkování insulinu, který by simuloval normální funkci pankreatu. V současnosti jsou otestovány a schváleny v USA nebo Evropě pouze senzory na principu měření intersticiální tekutiny a impedanční spektroskopii [27].

2.4 Hodnocení přesnosti glukometru

Existují dvě obecně přijímané metriky pro vyhodnocení přesnosti systému pro měření glykémie. Jedním z nich je označován jako MARD (Mean Absolute Relative Difference) a druhým je Clarkova síťová chybová analýza (Clarke Error Grid Analysis - EGA). Obě metriky mají odlišný přístup. MARD nabízí jeden parametr, který je definován jako součet absolutních hodnot rozdílů mezi hodnotou měřenou senzorem a hodnotou referenční. Nízké hodnoty MARD indikují malou průměrnou chybu a tudíž vyšší přesnost. Nejpresnější glukometry určené pro SMBG dosahují MARD hodnoty 6-8 % v porovnání s referenčními přístroji [32]. Při měření senzorem založeném na měření intersticiální tekutiny existuje chyba, která se nedá eliminovat, kvůli časovému zpožděním přenosu glukózy mezi krví a intersticiální tekutinou. [32].

Další metodou je již zmíněná Clarkova chybová analýza (Clarke EGA) [33], která na rozdíl od předchozí čistě matematické metody zohledňuje i klinickou významnost chyby. Graf je rozdělen do 5 regionů (A až E). Body v regionu A má maximální chybu měření 20 % nebo jsou v rozmezí hypoglykémie (<70 mg/dl). Region A je považován za klinicky přesný protože léčba založená na naměřených hodnotách z tohoto regionu vede ke správným klinickým výsledkům. Nejlepší glukometry určené pro SMBG dosahují 96-97 % hodnot v regionu A v porovnání s referenčním měřením. Region B, označovaný za klinicky akceptovatelný, je pak definovaný odchylkou větší než 20 %, ale stále by nemělo dojít k ohrožující léčbě na základě měření. K udávání přesnosti glukometru se většinou používá kombinovaný údaj o A a B regionu. Ukázka Clarkovy EGA je na obrázku 2.2



Obrázek 2.2: Příklad hodnot zanesených do grafu Clarkovi sítové chybové analýzy. Na horizontální ose jsou hodnoty měřené referenční technikou a na vertikální hodnoty z testovaného senzoru, převzato a upraveno z [34]

3 Princip měření krevní glukózy mikrovlnným senzorem

3.1 Dielektrické vlastnosti biologických tkání

Obecně se dají materiály včetně biologických tkání rozlišit na vodivé a nevodivé dle jejich elektrických vlastností. U vodivých materiálů se elektrické náboje mohou volně pohybovat a nevodivé materiály (dielektrika) mají elektrické náboje pevně vázány. Pokud je vodivý materiál umístěn do elektrického pole, na náboje působí síla a pohybují se, dokud není dosaženo nulového elektrického pole uvnitř materiálu. V polárních dielektrikách centrum kladného a záporného náboje není souměrné a vzniká tak elektrický dipólový moment \mathbf{p} . Poté, pokud je aplikováno vnější vektor elektrické pole \mathbf{E} , dipól má tendenci orientovat se tak, aby vytvářel elektrické pole v dielektriku \mathbf{E}_p , které má opačný směr k \mathbf{E} . Tento jev se nazývá *polarizace*.

3.2 Komplexní permitivita a vodivost

Pokud je dielektrikum izotropní a uniformní a podléhá statickému nebo pomalu měnícímu se elektrickému poli, můžeme psát, že vektor polarizace je:

$$\mathbf{P} = \epsilon_0 \chi \mathbf{E}, \quad (3.1)$$

kde \mathbf{P} je vektor polarizace, ϵ_0 je permitivita vakua, χ je dielektrická susceptibilita a \mathbf{E} je vektor elektrického pole. Vektor elektrické indukce, který může být definován jako elektrické pole ovlivněné polarizací, je:

$$\mathbf{D} = \epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P} = \epsilon_0 (1 + \chi) \mathbf{E} = \epsilon_0 \epsilon_s \mathbf{E}, \quad (3.2)$$

kde $\epsilon_s = 1 + \chi$ je statická permitivita (taktéž nazývána dielektrická konstanta, jelikož je nezávislá na intenzitě elektrického pole). Pokud je na dielektrikum aplikováno časově proměnné elektrické pole, vektor polarizace \mathbf{P} není ve fázi s aplikovaným polem \mathbf{E} . Intenzita časově proměnného elektrického pole je

$$E^*(t) = E_0 e^{i\omega t}, \quad (3.3)$$

kde $*$ označuje komplexní charakter, E_0 je amplituda, $\omega = 2\pi f$ je úhlová frekvence, f je frekvence a i je imaginární jednotka. Pokud mikroskopické částice nestíhají aplikované harmonické pole, elektrická indukce bude dána jako

$$D^*(t) = D_0 e^{i(\omega t - \delta(\omega))}, \quad (3.4)$$

kde $\delta(\omega)$ je fázový rozdíl od aplikovaného elektrického pole pro danou frekvenci ω . Využitím vzorce pro vektor statické elektrické indukce 3.2 a rovnic 3.3 a 3.4 můžeme vyjádřit místo statické permitivity frekvenčně závislou komplexní permitivitu jako

$$\epsilon^*(\omega) = \frac{D_0}{\epsilon_0 E_0} e^{-i\delta(\omega)}. \quad (3.5)$$

S využitím Eulerových vztahů pro vyjádření komplexních čísel v exponenciálním tvaru do goniometrických funkcí dostaneme z rovnice 3.4 vztah pro komplexní permitivitu:

$$\epsilon^*(\omega) = \epsilon'(\omega) - i\epsilon''(\omega), \quad (3.6)$$

kde reálná část komplexní permitivity je:

$$\epsilon' = \frac{D_0(\omega)}{\epsilon_0 E_0(\omega)} \cos[\delta(\omega)] \quad (3.7)$$

a imaginární část je:

$$\epsilon'' = \frac{D_0(\omega)}{\epsilon_0 E_0(\omega)} \sin[\delta(\omega)]. \quad (3.8)$$

V harmonickém poli je disipovaná energie za jednotku času pro ideální nevodivé dielektrikum dána jako:

$$W = \frac{1}{2} \omega E_0^2 \epsilon_0 \epsilon''(\omega). \quad (3.9)$$

Reálná dielektrika však vykazují určitou statickou vodivost σ_s , která vede k vektoru proudové hustoty \mathbf{j} která je ve fázi s \mathbf{E} dle:

$$\mathbf{j}(\omega) = \sigma_s \mathbf{E}(\omega). \quad (3.10)$$

Tento elektrický proud způsobuje také disipaci energie v dielektriku a podle Joulova zákona je rovna :

$$W = \frac{1}{2} \sigma_s E_0^2. \quad (3.11)$$

Porovnáním rovnic 3.9 a 3.11 dostáváme, že absorpce energie dielektrikem je dána součtem $\epsilon'' + \sigma_s/\epsilon_0\omega$. Při aplikaci harmonického pole můžeme pro proud psát:

$$j^*(\omega) = \sigma^*(\omega)E^*(\omega), \quad (3.12)$$

kde σ^* je komplexní vodivost, která je s permitivitou spojena dle:

$$\sigma^*(\omega) = i\omega\epsilon_0\epsilon^*(\omega) = \sigma'(\omega) - i\sigma''(\omega), \quad (3.13)$$

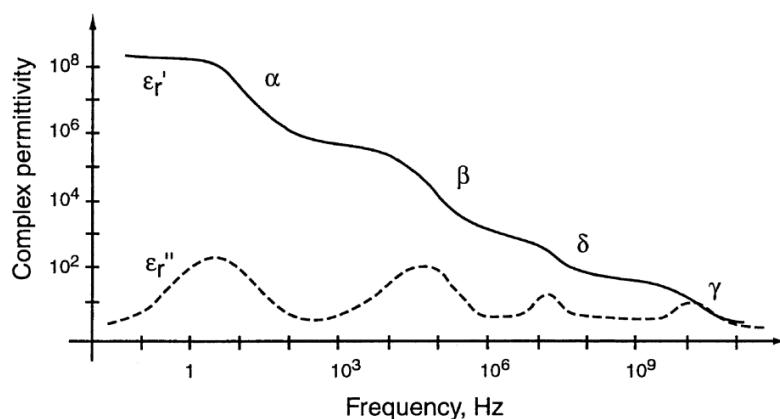
kde reálná část komplexní vodivosti

$$\sigma' = \omega\epsilon_0\epsilon'' \quad (3.14)$$

a imaginární

$$\sigma'' = \omega\epsilon_0\epsilon'. \quad (3.15)$$

Odvození předchozích veličin je převzato z literatury [35]. Obecně jsou ϵ^* a σ^* frekvenčně závislé. Tyto frekvenční změny se nazývají *disperze*. U biologických tkání je popsáno několik typů disperzí na širokém rozmezí frekvencí a jsou znázorněny na obrázku 3.1. Ve tkáni s heterogenní strukturou se se mohou náboje zachytávat na jednotlivých rozhraních. Jak se záporné a kladné ionty pohybují na opačné strany v materiálu, jejich oddělení způsobuje uvnitř v materiálu interní polarizaci, která se pak chová jako velký dipól [36].



Obrázek 3.1: Typy disperzí obecné biologické tkáně, převzato z [37]

Pro frekvence menší než 10 kHz se objevuje α disperze, která je způsobená difúzí iontů na buněčné membráně. Extrémně vysoké hodnoty permitivity odpovídají zachycení nábojů na vnitřních rozhraních [37].

V MHz frekvenční oblasti dochází k β disperzi způsobené polarizací buněčných membrán, polarizací proteinů a ostatních makromolekul.

V GHz oblasti se objevuje γ disperze způsobená polarizací molekul vody, která je hojně přítomná v biologických tkáních.

3.3 Matematické modelování permitivity tkáně

Frekvenční závislost komplexní permitivity (disperze) je možné popsat Debey funkcí [38]:

$$\epsilon^* = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + i\omega\tau}, \quad (3.16)$$

kde ϵ_∞ a ϵ_s odpovídají relativním permitivitám při frekvencích mnohem vyšších a mnohem nižších, než je modelovaná disperze. Další člen, který se objevuje v rovnici je relaxační časová konstanta τ , která popisuje rychlost polarizace, která není v reálném systému nekonečná ($\tau \neq 0$). Ta se dá měřit aplikováním skokové změny elektrického pole a měřením odezvy v časové oblasti [37]. Velikost disperze se také někdy značí $\Delta\epsilon = \epsilon_s - \epsilon_\infty$. Debey funkce popsána v rovnici 3.16 ale neodpovídá reálným biologickým systémům. Ve skutečnosti je šířka disperze větší, než tato funkce předpovídá. Proto se pro biologické systémy používá funkce Cole-Cole [38]:

$$\epsilon^* = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + (i\omega\tau)^{(1-\alpha)}}, \quad (3.17)$$

kde je oproti Debey funkci navíc distribuční parametr α , který popisuje rozšíření disperze. Pokud je $\alpha = 1$ jedná se o jednoduchou Debey funkci. Jedna z fyzikálních interpretací parametru α je že, jednotlivé reorientace dipólů a pohyb iontů se navzájem ovlivňují. Čím větší počet těchto interakcí, tím je α nižší než 1. Pokud vezmeme v úvahu více disperzí, dají se popsat jednoduchým rozšířením předchozí rovnice 3.17 jako [38]:

$$\epsilon^* = \epsilon_\infty + \sum_n \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + (i\omega\tau)^{(1-\alpha)}} + \frac{\sigma_s}{i\omega\epsilon_0}, \quad (3.18)$$

kde je zvláště uveden i příspěvek statické iontové vodivosti σ_s . Pro mikroskopický popis odezvy tkáně na elektrickou stimulaci je potřeba znát vodivosti a relativní permitivity jednotlivých částí tkáně. To je většinou velice problematické kvůli velké variabilitě rozložení a tvaru buněk a složení extra-celulární kapaliny.

V dalších částech tedy práce využívá makroskopický přístup, který je častěji využíván pro popis rozložení elektrického pole v biologickém systému. Je však potřeba dodat, že takto popsané elektrické veličiny u tkání podléhají anizotropii, frekvenční závislosti a mohou se měnit jak v prostoru, tak i v čase [36].

3.4 Dielektrické vlastnosti červených krvinek

Červené krvinky (RBC) jsou nejpočetnější elementy v krevní plazmě, jejichž objem zabírá mezi 33-47% u žen a u mužů 39-57% z celkového objemu krve. Jejich počet závisí na vývojovém stupni organismu a na pohlaví. Počet RBC je u novorozenců $3,9 - 5,5 \cdot 10^{12} / l$, u žen $4,2 - 5,8 \cdot 10^{12} / l$ a u mužů $3,5 - 5,2 \cdot 10^{12} / l$. Velikost jednotlivých erytrocytů není stejná a pohybuje se okolo $7,4 \mu m$ na šířku a $0,8 \mu m$ je tloušťka ve střední části (měřeno v suchém nátěru). Krvinky mají za fyziologických podmínek bikonkávní tvar, který jim umožňuje měnit tvar při průchodu kapilárami. Délka života se pohybuje mezi 110 a 120 dny [39].

3.4.1 Dielektrické vlastnosti v regionu MHz

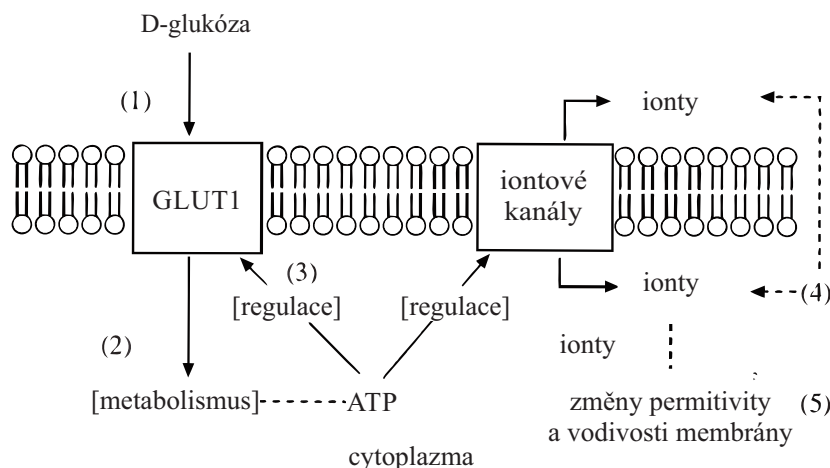
Samotná koncentrace glukózy výrazně neovlivňuje v kHz a MHz oblasti dielektrické spektrum, takže její koncentrace se nedá měřit přímo. Navzdory tomu ale její plazmatická koncentrace ovlivňuje dielektrické vlastnosti RBC a tyto změny se dají detekovat [6].

RBC jsou složeny z membrány a cytoplazmy, přičemž membrána je oproti cytoplazmě nevodivá. To má za následek hromadění náboje a polarizaci membrány, která vede k dobře známé β disperzi v dielektrickém spektru při frekvencích 0.1 – 10 MHz [4]. Studium β disperze vedlo k odhadu tloušťky cytoplazmatické membrány na 3.3 nm, což umožnilo další studium dielektrických vlastností RBC [40].

Nedávno bylo zjištěno, že membránová kapacitance či permitivita je ovlivňována přítomností D-glukózy a je závislá na její koncentraci v extra-celulárním prostoru [2,6,40,41]. Studie se shodují na faktu, že koncentrace biologicky neaktivní L-glukózy neměla na kapacitanci (permitivitu) membrány vliv. To naznačuje, že dielektrické změny membrány nejsou způsobeny pouze samotnou přítomností glukózy, ale její biologickou aktivitou.

Jako první tyto změny pozorovali Hayashi et al. (2002) [2], kteří tento jev vysvětlovali jako změny transportu iontu přes membránové proteiny nebo změny propustnosti membrány, které vedly ke kaskádě reakcí ovlivňujících další přenašeče (např. iontové pumpy). Tyto změny porozity membrány nebo aktivity iontových pump dále přispívaly ke změně permitivity a vodivosti membrány.

Livshits et al. (2009) [6] ve své nedávné práci uvádějí, že glukózový přenašeč GLUT1 hraje klíčovou roli v pozorovaných změnách dielektrických vlastností membrány RBC. Vedl je k tomu experiment, kde pomocí Cytochalasinu B, který inhibuje přenašeč GLUT1, zamezili změnám membránové kapacitance u buněk vystavených působení D-glukózy. Další zjištění studie bylo, že zvyšující koncentrace D-fruktózy, u které je známo, že je přenášena pomocí GLUT5 přenašeče, vykazovala stejný vliv na dielektrické změny membrány jako D-glukóza, tedy zvýšení kapacitance při zvyšující se koncentraci. Autoři uvádí, že hlavní zdroj dielektrických změn je spojený s tvorbou komplexu



Obrázek 3.2: Hypotetický model efektu způsobeného zvyšující se koncentrací glukózy. Import glukózy vede ke kaskádě reakcí uvnitř buňky a přímo či nepřímo ovlivňuje permitivitu a vodivost buněčné membrány. Převzato a upraveno z [2]

GLUT1-ATP. Navázání ATP na GLUT1 přenašeč reguluje transport glukózy. Záporně nabitý ATP mění terciární strukturu GLUT1 a tím inhibuje další vnik glukózy do RBC. Způsobené konformační změny GLUT1 a jejich velký výskyt v membráně RBC (3 - 6 % celkového membránového proteinu [41]) pravděpodobně významně ovlivňují totální dipólový moment membrány [6].

Při výzkumu mechanismu dielektrické odezvy RBC, který byl předmětem zkoumání výše uvedených studií se ukázalo, že kritickou částí experimentů je kontrola nad tvarem (morfologií, viz kap. 3.4.3 na str. 27) zkoumaných buněk, jelikož dielektrické vlastnosti jsou na něm významně závislé [41]. Další problém nastává u výběru vhodného modelu pro reprezentaci buňky, proto se několik studií zaměřilo na erythrocyty ve sférickém tvaru, který umožňuje použití zjednodušeného modelu buňky jako sférické částice v roztoku. Jak se ale ukázalo, použití sférických erythrocytů je značně limitováno, viz obrázek 3.6 na str. 28.

3.4.2 Dielektrické vlastnosti v regionu GHz

V předchozí kapitole byl popsána současná znalost dielektrických vlastností plazmatické membrány RBC, získaných převážně dielektrickou spektroskopií až do MHz oblasti frekvencí. Mikrovlnné senzory, které vykazaly senzitivitu na koncentraci glukózy v krvi, pracovali ale většinou ve vyšším frekvenčním pásmu, ve kterém se již polarizace na membráně neprojevuje (β disperse v rozsahu 0.1 – 10 MHz [35]). V GHz oblasti mikrovln se u biologických tkání projevuje dielektrická odezva vody. Ta se dá obecně popsat jednoduchou Debye funkcí. Pokud ale vodný roztok obsahuje další dipolární či nabitě částice, objeví se symetrické rozšíření rozložení relaxačního času a pro tento popis je třeba Cole-Cole (CC) model.

Bylo zjištěno, že parametry CC modelu, blíže popsány v kap. 3.1, α a τ jsou úzce spjaty s typem rozpuštěné látky a její koncentrací. Existuje závislost mezi α , τ a Kirkwood-Froehlich korelační funkcí B , která dává do souvislosti teplotu T , permitivitu ϵ_s a ϵ_∞ s počtem zapojených dipólů [35]. Tyto parametry byl použit při výzkumu vlivu hydratačních obalů kolem roztoku dipolárních molekul či iontů ve vodě na změny CC parametrů [4]. Kdykoliv molekuly vody interagují s jinou dipólovou nebo nabitou entitou, nastává rozšíření rozložení relaxačního času [35].

Jak už bylo řečeno v předchozí kapitole 3.4.1, ATP má velký vliv na regulaci příjmu glukózy v RBC a na dielektrické vlastnosti membrány. Tím, jaký má vliv koncentrace ATP a AMP na dielektrické vlastnosti vodného roztoku, se zabývali [42]. Hlavním rysem rozpuštění látky v roztoku vody je snížení dielektrické permitivity v porovnání s vodou bez příměsí. Dále se vždy objeví rozšíření rozložení relaxačního času τ a jeho posunu. Pokud je rozpuštěná látka dipólového charakteru, střední hodnota relaxačního času τ se zvyšuje s její koncentrací [43]. Pokud je rozpuštěná látka iontového charakteru, relaxační čas se snižuje, což autoři přisuzují zmenšení mezoskopických vodních shluků do hydratačních obalů kolem iontů [44].

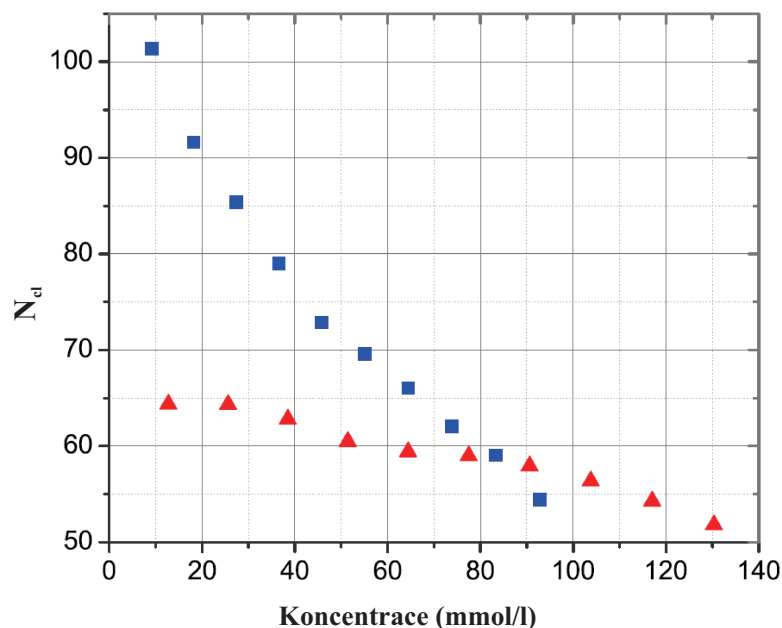
ATP má relativně velký elektrický dipólový moment (230 D) oproti AMP (45 D). Současně se ATP i AMP ve vodném roztoku vyskytuje jako vysoce nabitě částice, tudíž vykazují jak dipólové, tak i iontové chování v CC parametrech. Při nízkých koncentracích ATP nebo AMP se dielektrická odezva chová podobně, jako dipólová molekula a při vyšších koncentracích jako iontová.

ATP také dokáže vázat více vody do svého hydratačního obalu než AMP jak je vidět na obrázku 3.3.

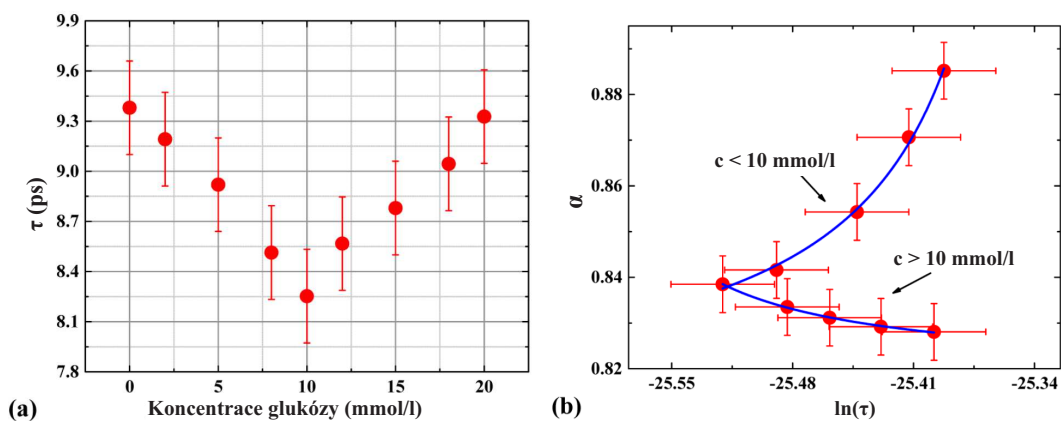
Dielektrické vlastnosti cytoplazmy RBC

Nejaktuálnější studie, zabývající se dielektrickými vlastnostmi cytoplazmy RBC při různé koncentraci glukózy v extracelulární tekutině, byla provedena skupinou Levy et al. 2016 [4], kteří navázali na výsledky výzkum, popsany v předešlé kapitole 3.4.2 [42,43,44]. Měření CC parametrů proběhlo na frekvencích od 500 MHz do 50 GHz. Při těchto frekvencích se plazmatická membrána a polarizace na ní neprojevuje, proto se ve studii nebere v úvahu a uvažuje se pouze efektivní permitivita membrány a cytoplazmy dohromady. Autoři zachovali bikonkávní tvar buněk jejich vhodnou přípravou do PBS roztoku o požadované osmolalitě. Krev byla poté analyzována jako směs 2 materiálů o různých dielektrických vlastnostech při známém objemu obou frakcí. Parametry z této studie byly použity i pro CC model krve v simulacích a je blíže popsán v metodice práce v kapitole 4.2.3 na str. 38. Výsledky jejich měření ukazuje obrázek 3.4.

Nejdůležitější zjištění bylo, že se relaxační čas od 0 do 10 mM koncentrace D-glukózy v roztoku monotónně snižoval, ale od vyšší koncentrace začal opět strmě růst. K výrazným změnám kolem této hodnoty koncentrace glukózy došlo při podobných podmínkách i u několika studií, ve kterých měřili permitivitu membrány, popsanych v



Obrázek 3.3: Závislost efektivního počtu molekul vody (N_{eff}) v hydratačním obalu kolem ATP (■) a AMP (▲) který je tvořen interakcí své dipólové a iontové složky s okolní vodou při 25 °C. Obrázek převzat a upraven z [42]



Obrázek 3.4: (a) Závislost relaxačního času τ na koncentraci D-glukózy v PBS bufferu pro cytoplazmu RBC při 25 °C. (b) Naměřený distribuční parametr α a jeho závislost na naměřeném relaxačním času τ při vzrůstající koncentraci D-glukózy v PBS od 0 do 20 mM. Oba grafy byly převzaty z práce [4]

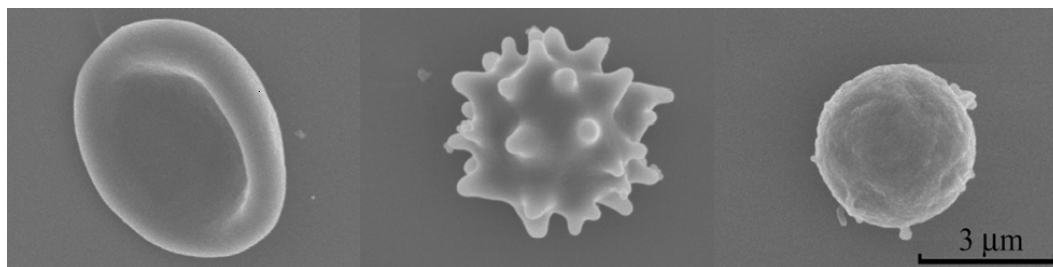
předchozí kap. 3.4.1.

Autoři interpretují výsledek takto. Když buňky začnou přijímat glukózu, společně s glukózou vniká do buňky voda, která ovlivňuje cytoplazmatickou distribuci elektrolytů. Nejprve způsobí jejich naředění v sub-membránových částech a v cytosolu a dále aktivuje iontově závislé procesy určené k vyplavení přebytečně přijaté vody. Metabolismus glukózy vede k dočasnému vzniku metabolitů s nábojem (jako je ATP) a k další reorganizaci iontů. Průběh závislosti α na τ při koncentracích glukózy < 10 mM (obrázek 3.4) je stejný, jako vykazuje roztok iontů ve vodě [44]. Asymptotická hodnota relaxačního času τ je však výrazně vyšší, než jaká se vyskytuje u vody, nebo roztoků iontů ve vodě. Jelikož tato hodnota τ je blízká hodnotě pozorované u vysokých koncentracích ATP a AMP v roztoku, autoři jako možné vysvětlení procesu uvádějí, že dominantním faktorem ovlivňujícím relaxaci dielektrika v obsažených vodních strukturách je výměna molekul vody s hydratačními obaly kolem ATP. Schopnost vázat velké množství vody kolem ATP v porovnání s AMP také ukazuje obrázek 3.3.

Chování systému při koncentraci > 10 mM není dokonale vysvětleno. Okolo kritické koncentrace glukózy 10-12 mM se většina ATP molekul v cytosolu koncentruje okolo membrány, kde interaguje s GLUT1 přenašečem a reguluje jeho aktivitu. Zároveň pokud se zvyšuje koncentrace glukózy v extracelulární tekutině, dochází k transportu Na^+ do buňky, aby byl zachován osmotický tlak. Během těchto jevů se zvyšuje relaxační čas se zvyšující se koncentrací glukózy, což naznačuje zvětšování efektivních dielektrických rozměrů. Jako možné vysvětlení se jeví snaha ATP a současně Na^+ vázat vodu, což ji táhne zpět dovnitř cytoplazmy.

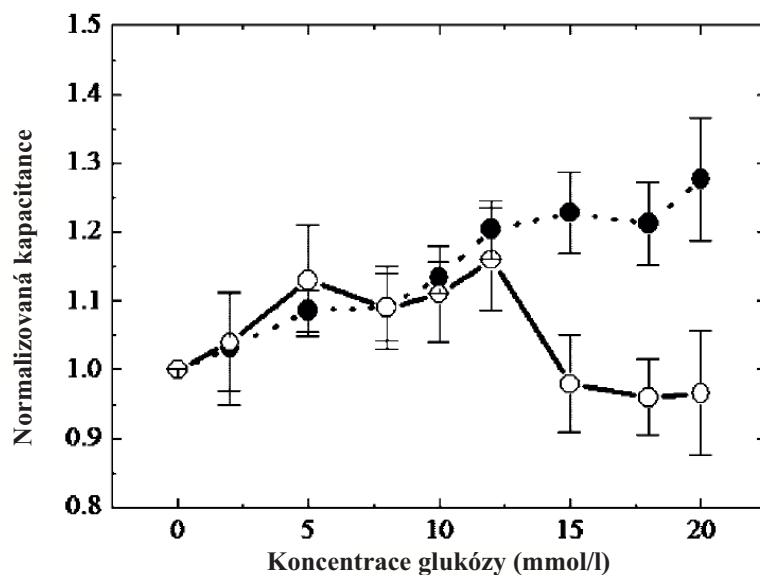
3.4.3 Efekt morfologie

Zdravé buňky mají bikonkávní tvar, který se ale může změnit vlivem nemoci či osmotického tlaku. Příkladem těchto morfologických typů mohou být protažené srpkovité u srpkovité anémie, echinocyty spojené s uremickým syndromem nebo stomatocyty, které se vytvářejí po lokální anestezii chlorpromazinem. Další tvary buněk, které se mohou objevit za určitých podmínek jsou sférocyty či zvětšené diskocyty [35]. Ukázkou některých tvarů pořízených elektronovým mikroskopem ukazuje obrázek 3.5.



Obrázek 3.5: Snímky pořízené elektronovým mikroskopem, zleva doprava je znázorněn fyziologický erytrocyt bikonkávního tvaru, echinocyt a sférocyt. Převzato a upraveno z [45]

Různé tvary RBC vykazují různé dielektrické parametry (např. relaxační čas τ , čehož se dá využít např. při měření kvality konzervované krve nebo při měření pomocí průtokové cytometrie [45]. Studie [6] ukazuje, že při vyšší koncentraci glukózy (>12 mM) je dielektrická odezva výrazně odlišná mezi RBC ve formě sférocytů (získaných pomocí hypotonického roztoku) a normálními RBC. Závislost této odezvy je na obrázku 3.6. Autoři uvádějí, že tento rozdíl může být dán změnami cytoplazmy ve sférocytech, u kterých dochází ke snížení cytoplazmatické koncentrace ATP.



Obrázek 3.6: Normalizovaná kapacitance membrány RBC v závislosti na koncentraci D-glukózy pro normální bikonkávní erythrocyty (●) a sférocyty (○), vytvořené pomocí hypotonického roztoku. Převzato a upraveno z [6]

3.4.4 Agregace červených krvinek

Krev se nechová jako statická suspenze buněk, ale krvinky se shlukují a opět rozpojují v závislosti na podmínkách průtoku. Jedním ze známých typu agregace je tzv. „rouleaux“ formace, kde se skupina krvinek formuje do podoby malých sloupků. Tato agregace je závislá na koncentraci fibrinogenu a globulinu a může indikovat zánětlivé onemocnění. Tento typ agregace výrazně ovlivňuje dielektrickou odezvu krve a může způsobit velmi rychlé změny permitivity ϵ (po 3 minutách od zastavení průtoku se permitivita zvýší až 3 krát na frekvenci 100 kHz [35]). Toto reversibilní momentální zvýšení permitivity způsobené rouleaux formací bylo eliminováno nahrazením plazmy fyziologickým roztokem [35].

3.4.5 Vliv hematokritu na dielektrické parametry

Hematokrit je definován jako podíl erythrocytů na celkovém objemu krve. Určuje se pomocí oddělení RBC od plazmy, nejčastěji centrifugací [46]. Ve frekvenčním pásmu

1 MHz až 1 GHz byl pozorován vliv HTK na efektivní permitivitu u krve krav a ovcí, kdy zvýšením HTK z 20 na 70 % došlo k zvýšení permitivity o 30 % a podobný efekt uvedla i studie na krvi lidské [35].

3.5 Princip funkce mikrovlnného senzoru

Mikrovlnné záření interaguje s materiálem podle jeho molekulárního složení a je možné určit některé vlastnosti tkáně a tělních tekutin s pomocí znalosti jejich dielektrických vlastností [47]. V mikrovlnném pásmu frekvencí tato interakce vychází z orientačního pohybu molekulárních dipólů a translačního pohybu elektrických nábojů (iontů a elektronů). Elektromagnetická vlna se přes tkáň tedy pohybuje pomaleji, než by tomu tak bylo ve vakuu. Hlavním fenoménem, který stojí za schopností mikrovlnných senzorů detekovat biologické analyty, je že všechny mají odlišnou permitivitu v porovnání s vodou nebo vzduchem. Mikrovlnné senzory jsou navrženy k tomu, aby dokázali přeměnit změnu rychlosti elektromagnetické vlny na detekovatelný signál. Z principu funkce detekce není ale možné určit, zda-li určitá změna v rychlosti šíření vlny pochází od konkrétní molekuly. K určení závislosti signálu na koncentraci měřeného analytu je potřeba modelů, které definují permitivitu materiálu přes požadované frekvenční pásmo, jako je již popsána Debye a Cole-Cole funkce (viz kap. 3.3).

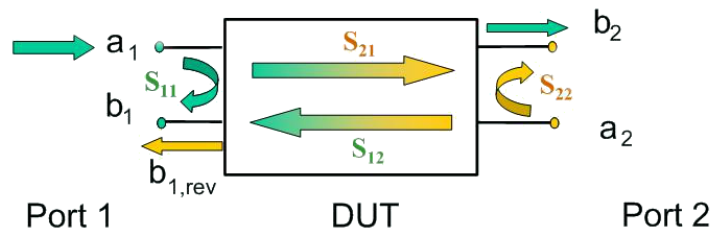
Mikrovlnné senzory jsou obecně složeny ze dvou částí. Ze sensorové části a z části pro zpracování signálu. Sensorová část, je ta, která vhodně vede elektromagnetické záření, tak aby interagovalo s testovanou látkou. Dle pracovní frekvence je můžeme rozlišit na úzkopásmové (rezonanční) a širokopásmové.

Mikrovlnné senzory založené na rezonanční technice využívají toho, že rezonanční frekvence rezonátoru o konstantních rozměrech je dána jeho permitivitou a permeabilitou [47].

Měření probíhá nejčastěji pomocí vektorového analyzátoru. Měřené veličiny se nazývají S parametry (z angl. scattering). Označují se dvěma čísly označující měřený vstup a výstup, např. S_{11}^* parametr udává poměr odražené vlny b_1 ku dopadající vlně a_1 , jak je vidět na obrázku 3.7. Sensor, kterým se zabývá tato práce, obsahu 2 porty, tudíž je možné měřit parametry S_{11}^* , S_{21}^* , S_{21}^* a S_{22}^* . Pro detekci změny dielektrických vlastností, použijeme měření parametru S_{21}^* , který je komplexním číslem popisující přenos vlnění z portu 1 na port 2. Z komplexního čísla S_{21}^* se dá získat informace o modulu $|S_{21}|$ a fáze $\varphi = \angle S_{21}^*$.

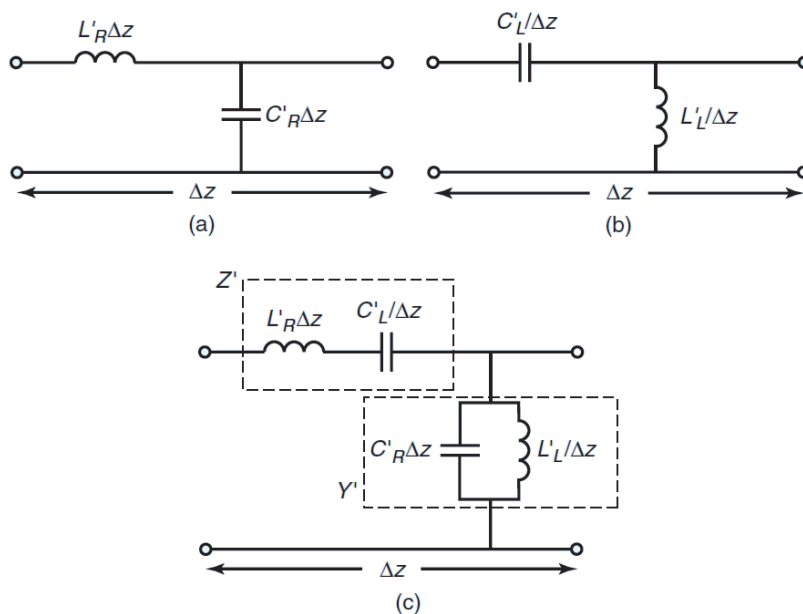
3.6 Princip metamateriálového senzoru

Metamateriály se dají definovat jako umělé struktury, které mohou být navrženy tak, aby měly specifické elektromagnetické vlastnosti, které se jinak přirozeně nevyskytují [49]. Metamateriály mohou vykazovat vlastnosti jako je negativní permitivita ϵ a permeabilita μ . Běžně se nazývají také jako levotočivé (LH z angl. left handed). Pokud



Obrázek 3.7: Schéma měření S-parametrů. DUT je označení měřeného vedení. Obrázek převzat z [48]

použijeme přístup pro přenosové vedení, můžeme LH materiály modelovat jak ukazuje obrázek 3.8. Klasické přenosové vedení se dá obecně nazvat pravotočivým (RH - z angl. right handed). Při vytváření metamateriálových senzorů se k čistě LH vedení můžeme při realizaci pouze přiblížit, jelikož bude vždy obsahovat parazitní kapacitanci a induktanci. Proto, je přesnější takové vedení označovat jako kompozit pravo a levo- točivého vedení CRLH (z angl. composite right/left handed), jehož obvodový model je na obrázku 3.8.



Obrázek 3.8: Ekvivalentní obvodový model přenosového vedení. (a) model RH vedení. (b) LH vedení. (c) kombinované CRLH vedení. L' označuje měrnou indukčnost, C' měrnou kapacitanci. Dolní index R označuje, že je prvek charakteristický pro RH vedení a index L je LH vedení. Δz je délka vedení, převzato a upraveno z [49]

Využívání metamateriálů jako senzorů se ukázalo v určitých aplikacích jako velice výhodné [49]. Hlavními přednostmi jsou flexibilita rozměrů, použité frekvence a široká škála jejich formy (např. planární x 3D, rigidní x flexibilní).

Použití metamateriálů umožňuje výrobu velmi kompaktních senzorů. Kvůli jejich disperzní charakteristice, která je reprezentována fázovou konstantou β , LH vedení

může být kompaktnější než vedení RH protože $\beta_{LH} > \beta_{RH}$ v určitém frekvenčním rozsahu. Stejně tak elektrické délka může být totožná u LH s RH vedením za použitím nižší frekvence [50]. Citlivost na změny měřené látky jsou přímo spojeny se změnou fázové konstanty:

$$\Delta\varphi = \varphi_2 - \varphi_1 = l\beta_2 - l\beta_1 = \Delta\beta \cdot l, \quad (3.19)$$

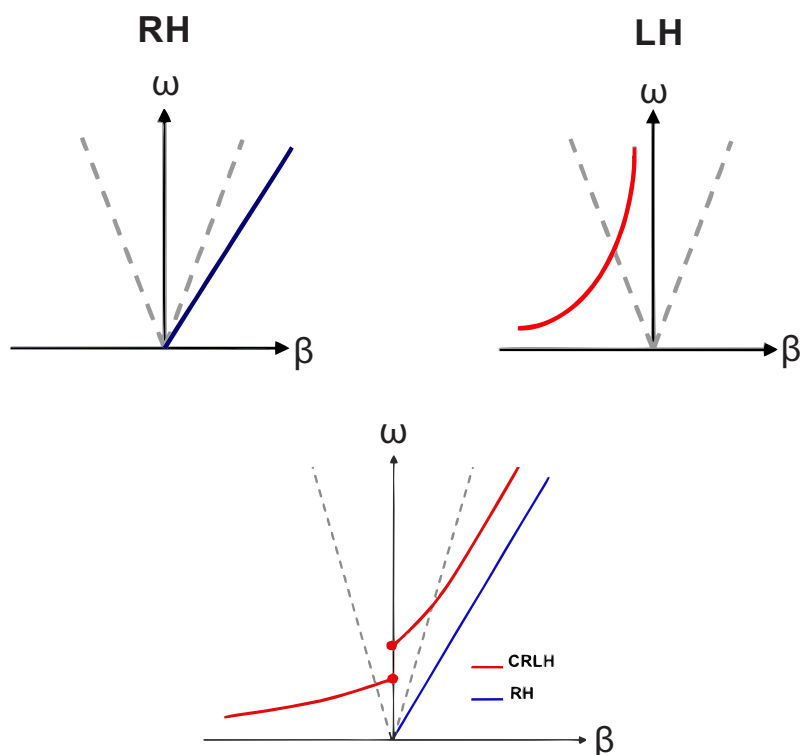
kde $\varphi = \angle S_{21}^*$. Změna fáze v závislosti na malých změnách kapacity může být aproximována [51]:

$$\Delta\varphi \approx l \cdot \frac{\partial\beta}{\partial C} \cdot \Delta C = n \cdot dz \cdot \frac{\partial\beta}{\partial C} \cdot \Delta C, \quad (3.20)$$

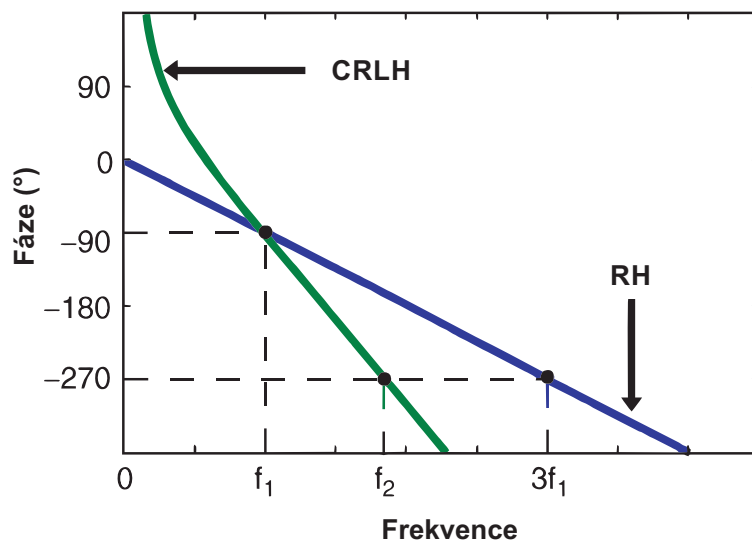
kde l je délka vedení, n je počet buněk a dz je délka buňky. Obecně pro přenosové vedení o nenulových rozměrech, fáze φ závisí pouze na změně C a senzitivita Φ je poté dána:

$$\Phi = \frac{\partial\beta}{\partial C}. \quad (3.21)$$

Bylo ukázáno, že takto dokáží LH struktury vykazovat vyšší senzitivitu na změnu kapacity než RH (obdobně pro induktivní změny, což má význam pouze při měření magnetických materiálů). Toto vychází z disperzní charakteristiky LH vedení, která je na obrázku 3.9. Při změně frekvence je změna fáze u CRLH vedení výrazně větší než u klasického RH vedení jak ukazuje obrázek 3.10. Jelikož je fázový posun úměrný elektrické délce $\beta \cdot l$, stejná senzitivita může být dosažena i při nižších frekvencích v porovnání s RH ekvivalentem [50]. Výrazně vyšší senzitivita na změnu fáze je jednou z hlavních výhod použití metamateriálů v senzorech.



Obrázek 3.9: Disperzní diagram pro RH, LH a CRLH vedení, kde β je fázová konstanta a ω je úhlová frekvence. Převzato a upraveno z [52]



Obrázek 3.10: Obecné porovnání fázové změny mezi CRLH a RH vedením. U fázové změny CRLH vedení je vidět větší změna fáze při stejné změně frekvence, což má za následek větší senzitivitu senzoru. Převzato a upraveno z [49].

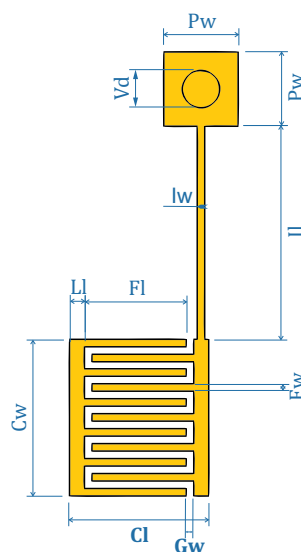
4 Metody

4.1 Výběr geometrie senzoru

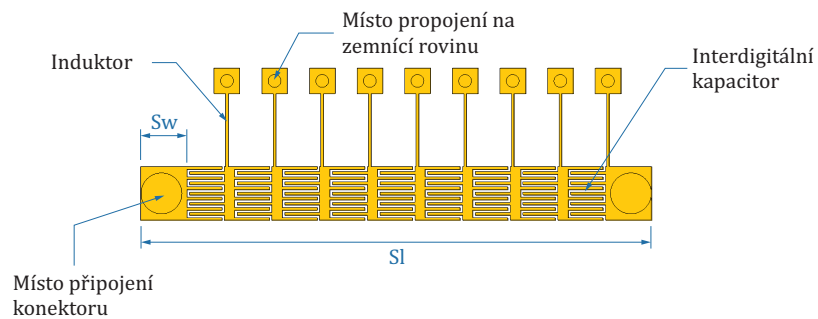
Pro realizaci mikrovlnného senzoru, který by byl na bázi přenosového vedení, se jako vhodná varianta nabízí využití metamateriálové (MTM) struktury (teoreticky popsána v kapitole 3.6). Metamateriálové senzory či antény se často fyzicky realizují jako planární mikropáskové vedení. Vedení je pak podobné tomu konvenčnímu, ale jeho MTM (LH) vlastnosti mu dodávají např. sériově řazené interdigitální (prstové) kapacitory a paralelní indukčnosti propojené na zemnicí rovinu. Pokud použijeme přenosové vedení, tj. dva porty spojené úsekem sensorové části, můžeme měřit S_{21}^* parametr a jeho fázi φ , což nám poskytne informace o dielektrických změnách v měřeném materiálu, přiloženého k senzoru. Kvůli velké geometrické variabilitě MTM struktur existuje velké množství navržených planárních struktur určených pro různé aplikace. Na druhou stranu ale neexistují žádné obecné analytické vztahy určené k výpočtu rozměrů takových struktur. Jan Vrba a David Vrba ve své práci [53] otestovali v numerických simulacích MTM struktury o různém počtu buněk a rozměrech a byla virtuálně určena jejich senzitivita pro změny permitivity přiloženého modelu krve na 2 GHz. Tyto senzory nebyly žádným způsobem reálně testovány. V rámci této práce byl typ geometrie a rozměry z této práce převzaty a implementovány do modelu senzoru v programu COMSOL. Vybrány byly rozměry, které teoreticky vykazovali největší citlivost.

4.1.1 Rozměry senzoru

Horní část senzoru, tj. ta která přiléhá k měřenému vzorku má geometrii dle obrázku 4.2. Reálné rozměry uvedené v tomto obrázku jsou v tabulce 4.1.



Obrázek 4.1: Rozměry jedné buňky (části vedení v senzoru)



Obrázek 4.2: Zvětšená geometrie senzoru

Tabulka 4.1: Hodnoty rozměrů označených na obrázku 4.1 a obrázku 4.2

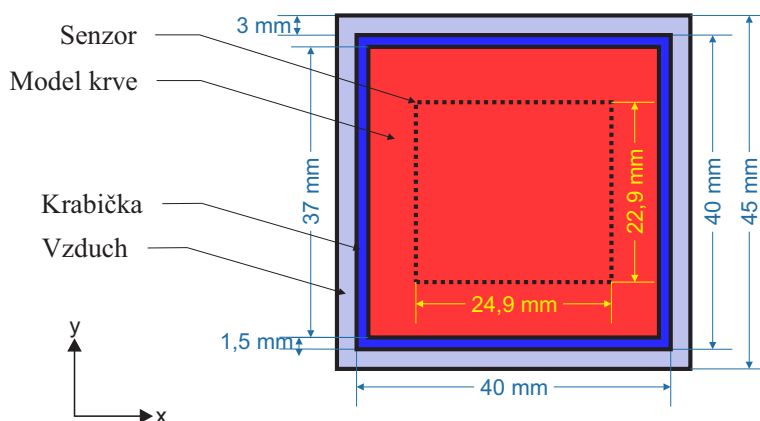
Parametr	Hodnota (mm)	Popis
G_w	0,1	mezera mezi prsty
I_w	0,1	šířka induktoru
V_d	0,5	průměr průpojky
P_w	1,0	velikost plošky pro průpojku
S_w	1,6	šířka vedení u portu
L_l	0,2	délka krajní sekce buňky
S_l	20,0	délka senzoru
C_w	2,1	výška buňky
C_l	1,9	šířka buňky
F_l	1,4	délka prstu
F_w	0,1	šířka prstu
Il	2,9	délka průpojky

4.2 Počítačový model v softwaru COMSOL

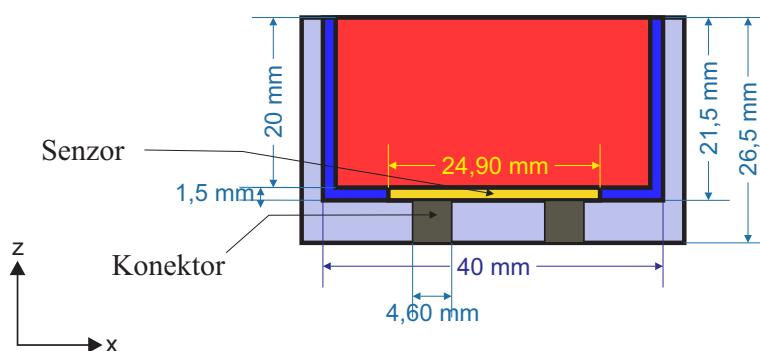
Dále popsané modely vytvořené v programu COMSOL a Matlab jsou nahrány na DVD přiloženém k této práci.

4.2.1 Implementace geometrie

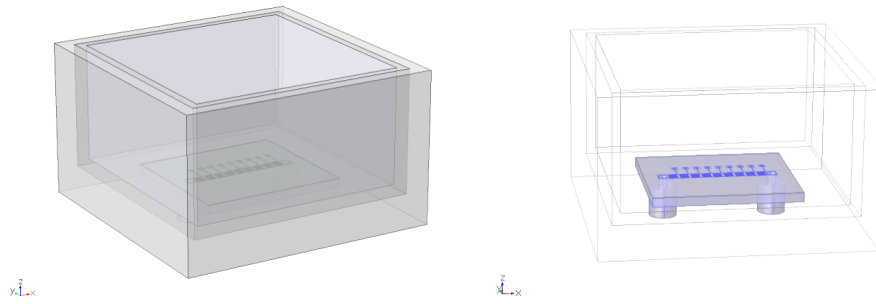
Rozměry uvedené v 4.1.1 byly použity pro vytvoření virtuálního modelu obsahujícího senzor s krabičkou, která je vyplněna modelem krve 1 nebo 2. Celý model zespona a ze stran obklopuje vzduch, tak aby se co nejvíce blížil reálnému měření. Následující obrázek 4.3 a 4.4 ukazují rozložení materiálu a rozměry modelu v simulacích, u kterých byla snaha, co nejvíce se přiblížit reálnému senzoru a jeho zapojení. Příložná část senzoru je v simulacích pokryta 0,1 mm silnou nevodivou vrstvou ze stejného materiálu, jako je substrát (vrstva je součástí skutečného senzoru). Na obrázcích není zakreslena z důvodu malých rozměrů.



Obrázek 4.3: Rozměry geometrie modelu v rovině xy (ze shora)



Obrázek 4.4: Rozměry geometrie modelu v rovině xz (ze strany)



Obrázek 4.5: Celkový pohled na model exportovaný přímo z programu COMSOL, skládající se ze senzoru, plastové krabičky, virtuálního modelu krve a okolního vzduchu. Vpravo je zobrazen samotný senzor s konektory

4.2.2 Model krve 1

Jediný dostupný model závislosti permitivity krve na koncentraci glukózy, který vznikl měřeními z lidské krve zveřejnili [8] a později ho upravili ve své práci [9]. Model vznikl měřeními *in vitro* na 10 zdravých pacientech, kterým se pohybovala koncentrace krevní glukózy od 87 do 330 mg/dl. Měření proběhlo ve frekvenčním rozsahu 500 MHz až 8 GHz. Model vytvořili jako upravený Cole-Cole model druhého řádu:

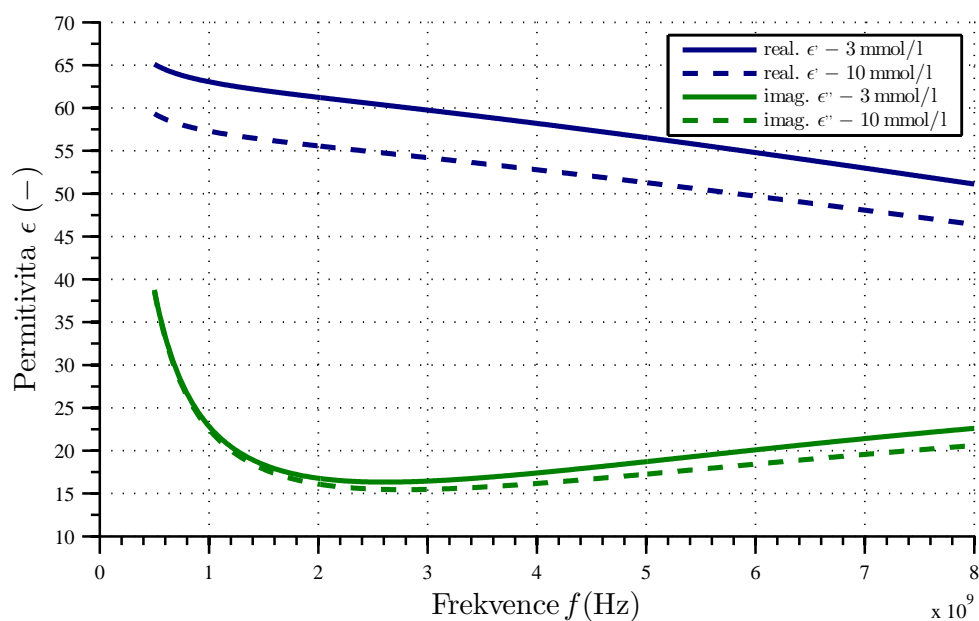
$$\epsilon^* = \epsilon_\infty + \frac{\Delta\epsilon_1 - 0,0462(c_g - 72)}{1 + (i\omega\tau_1)^{(1-\alpha_1)}} + \frac{\Delta\epsilon_2}{1 + (i\omega\tau_2)^{(1-\alpha_2)}} + \frac{\sigma_s}{i\omega\epsilon_0} \quad (4.1)$$

kde c_g je koncentrace glukózy v mg/dl. Ostatní parametry této rovnice se nacházejí v tabulce 4.2 a do rovnice byly dosazeny v základních jednotkách.

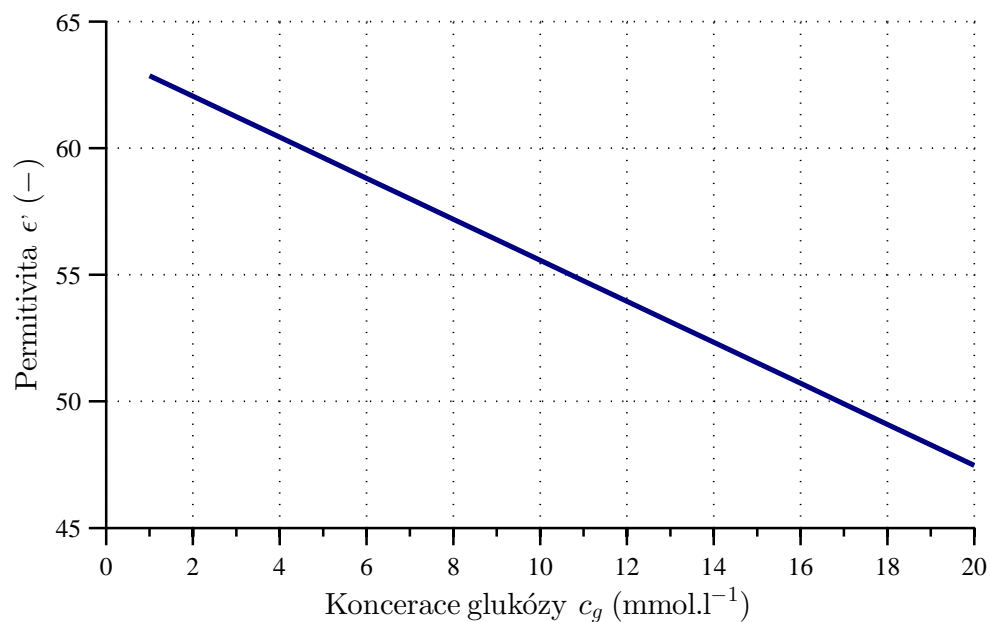
Tabulka 4.2: Parametry Cole-Cole modelu převzaté z [9]

ϵ_∞ (-)	$\Delta\epsilon_1$ (-)	$\Delta\epsilon_2$ (-)	τ_1 (ps)	τ_2 (ns)	α_1 (-)	α_2 (-)	σ_s (S.m)
4	56,875	5200	8,38	132,63	0,064	0,1	0,4

Model byl implementován do prostředí COMSOL Multiphysics pomocí MATLAB funkce, která zajišťovala výpočet komplexní permitivity modelu krve v závislosti na požadované frekvenci a koncentraci glukózy (tyto funkce jsou přiloženy k této práci na CD). Nutno podotknout, že v tomto modelu je permitivita lineární funkcí množství glukózy, jak ukazuje obrázek 4.7. Sami autoři ale uvádějí, že monotónní lineární pokles pozorovali jen u krve s koncentrací od 72 mg/dl (4 mmol/l) do 134 mg/dl (7,4 mmol/l). Při vyšších koncentracích se jim dále permitivita výrazně nesnižovala, přesto použili lineární aproximaci.



Obrázek 4.6: Model 1 - závislost reálné ϵ' a imaginární části ϵ'' komplexní permitivity na frekvenci f vycházející z CC modelu 1 (rovnice 4.1 a tabulky parametrů 4.2) pro 2 různé koncentrace glukózy



Obrázek 4.7: Model 1 - závislost reálné části komplexní permitivity ϵ' na koncentraci glukózy c_g vycházející z CC modelu 1 (rovnice 4.1 a tabulky parametrů 4.2) při frekvenci $f=2$ GHz

4.2.3 Model krve 2

Model 1 v předchozí kapitole je jediný dostupný model, který by vytvořen pro kompletní (plnou) krev. Nejnovější studie [4], zabývající se dielektrickou odezvou krevních elementů je již popsána v kapitole 3.4.2 na str. 25. Autoři vytvořili CC model pouze pro samotnou cytoplazmu krvinek, ale ne pro celou krev. Tento model byl však vytvořen pro větší rozsah koncentrací glukózy tj. od 0 do 20 mmol/l a ve větším frekvenčním pásmu od 500 MHz do 50 GHz. Jak bude dále popsáno, tento model vykazuje nelineární charakteristiky změny permitivity na rozdíl od modelu 1. Pro účely této práce, aby bylo možné porovnat alespoň 2 různé virtuální modely krve, byl vytvořen model jako "mix" dvou Cole-Cole modelů - jedním, který se zabýval pouze cytoplazmou krvinek ([4]) a druhý, který měřil pouze změny permitivity plazmy dle přidané koncentrace glukózy [10]. Tyto 2 modely byly zkombinovány do směšovací rovnice pro výpočet efektivní permitivity ϵ_{eff} [54], která předpokládá bifázickou suspenzi inkluzí mnohem menších než je vlnová délka elektromagnetického pole:

$$\epsilon_{eff} = (\sqrt{\epsilon_k} \cdot \eta + \sqrt{\epsilon_p} \cdot (1 - \eta))^2; \quad (4.2)$$

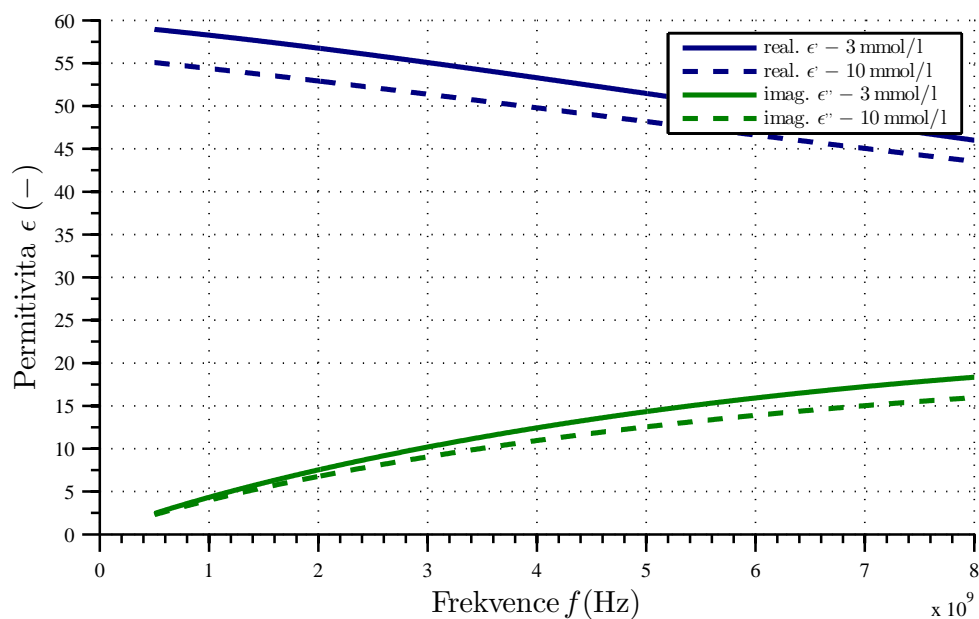
kde ϵ_k permitivita RBC, ϵ_p je permitivita krevní plazmy a η je frakce inkluzí (v našem případě hematokrit) Ostatní krevní elementy jsou zanedbány pro jejich nízký obsah v krvi a nedostatek dat.

Cole-Cole model cytoplazmy červených krvinek

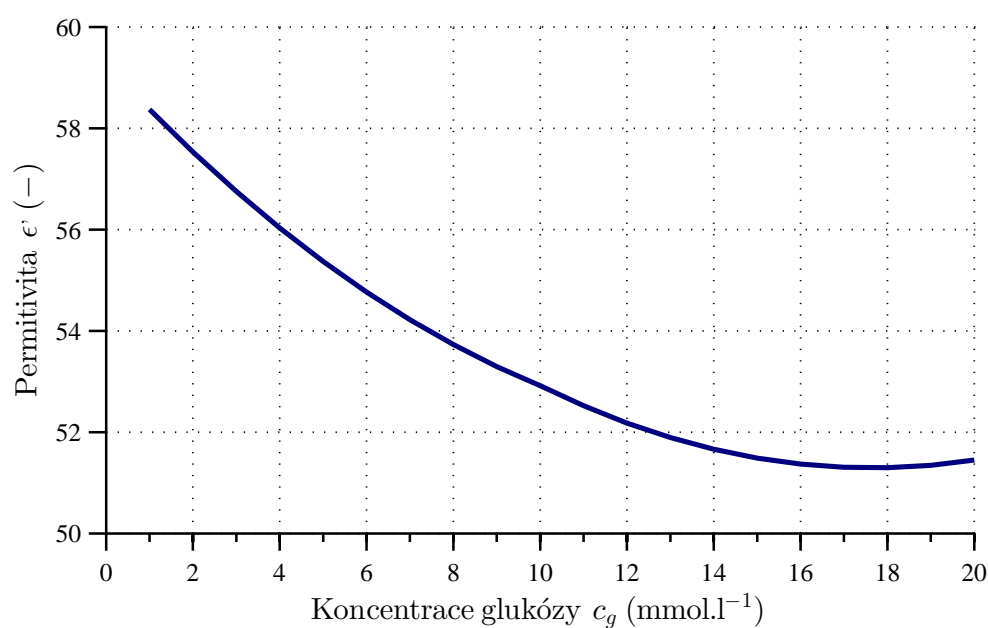
Parametry CC modelu byly převzaty z podpůrných informací ke článku od [4]. Data byla ve formě tabulky, takže aby se dala interpolovat data mezi těmito hodnotami, a aby bylo možné vytvořit analytický model, byly jednotlivé sady parametrů proloženy kvadratickou funkcí v programu MATLAB. Přehled použitých parametrů a jejich funkcí je v tabulce 4.3. Parametr popisující kvalitu proložení SS_E , který je v této tabulce popsán v kapitole 4.4 na str. 50.

Tabulka 4.3: Parametry Cole-Cole modelu cytoplazmy krvinek, kde koncentrace glukózy c_g je v mmol/l. Originální data jsou převzatá z [4], která byla proložena lineární (τ) a kvadratickou ($\Delta\epsilon$ a α) funkcí.

Parametr	Funkce (Hodnota)	Reziduální součet čtverců SS_E
ϵ_∞	5,0033	0
$\Delta\epsilon$	$0,026 \cdot c_g^2 - 0,88 \cdot c_g + 57$	0,1936
τ (ps)	$-0,11 \cdot c_g + 9,4$ pro $c_g < 10$ mmol/l $0,1 \cdot c_g + 7,3$ pro $c_g > 10$ mmol/l	0
α	$0,00019 \cdot c_g^2 - 0,0066 \cdot c_g + 0,88$	0,0016



Obrázek 4.8: Model 2: cytoplazma krvinek - závislost reálné ϵ' a imaginární části ϵ'' komplexní permitivity na frekvenci f vycházející z CC modelu RBC (tabulka 4.3) pro 2 různé koncentrace glukózy



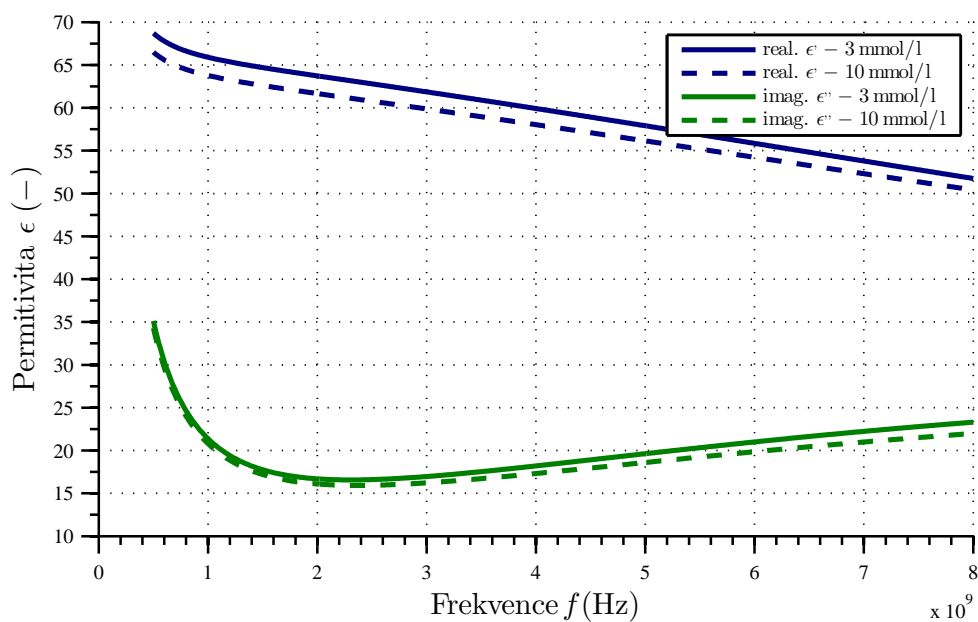
Obrázek 4.9: Model 2: cytoplazma krvinek - závislost reálné části komplexní permitivity RBC ϵ' na koncentraci glukózy c_g vycházející z CC modelu RBC (tabulka 4.3) při frekvenci $f = 2$ GHz

Cole-Cole kombinovaný model červených krvinek a plazmy

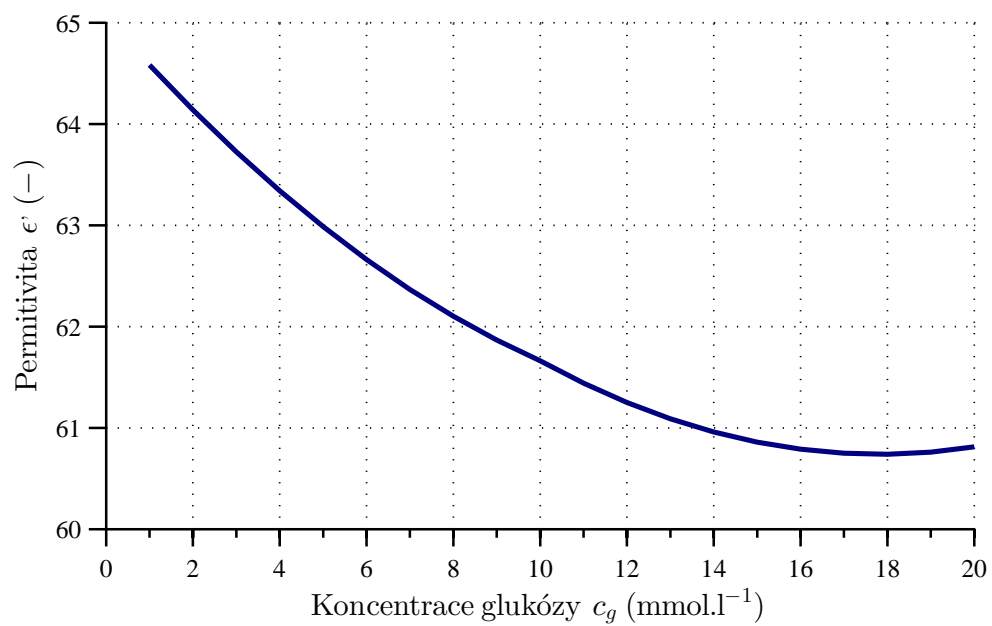
Předchozí model permitivity RBC byl zkombinován pomocí rovnice 4.2 s modelem krevní plazmy bez krevních elementů [10]. Parametry CC modelu plazmy, které se dosazují do rovnice 3.17 jsou v tabulce 4.4

Tabulka 4.4: Funkce popisující parametry Cole-Cole modelu plazmy převzaté z [10]. Koncentrace glukózy c_G je v tomto případě v g/dl

Parametr	Funkce
ϵ_∞	$0,0099 \cdot c_G^2 + 0,047 \cdot c_G + 2.3$
$\Delta\epsilon$	$-0,0093 \cdot c_G^2 - 0,21 \cdot c_G + 71$
τ (s)	$1,2 \cdot 10^{-15} \cdot c_G^2 + 2,3 \cdot 10^{-13} \cdot c_G + 8,7 \cdot 10^{-12}$
α	0,9



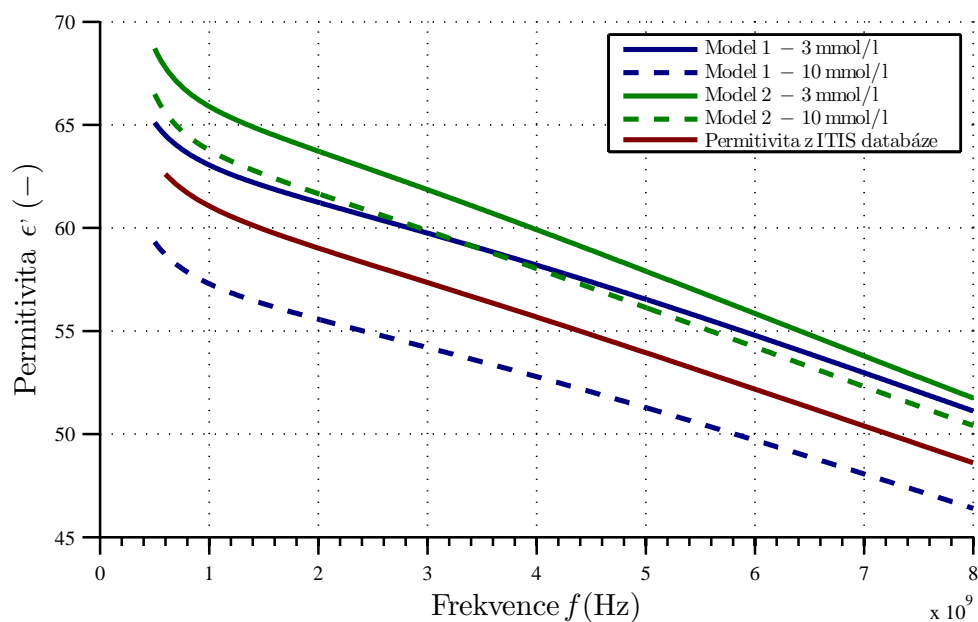
Obrázek 4.10: Model 2: kompletní po použití směšovací rovnice 4.2- závislost reálné ϵ' a imaginární části ϵ'' permitivity na frekvenci f vycházející ze složeného CC modelu (RBC + plazma) pro 2 různé koncentrace glukózy



Obrázek 4.11: Model 2: kompletní po použití směšovací rovnice 4.2 - závislost reálné části permittivity ϵ' na koncentraci glukózy c_g vycházející z kompletního CC modelu při frekvenci $f = 2$ GHz

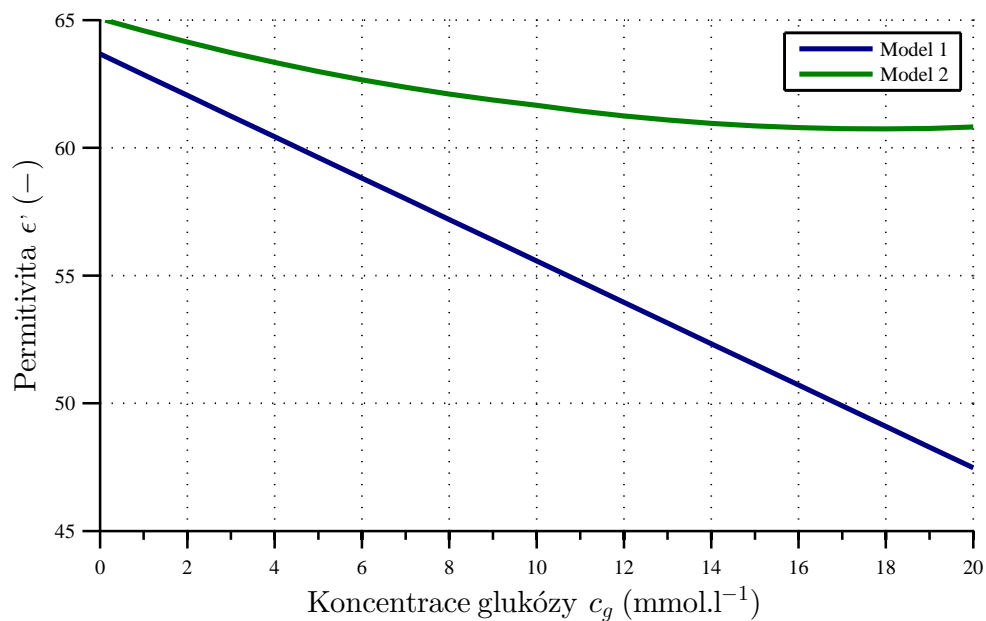
4.2.4 Porovnání modelů

Z následujících obrázků 4.12 a 4.13 je vidět, že se oba modely výrazně liší. Model 1 předpokládá lineární průběh změny permitivity zatímco model 2 předpokládá menší změny permitivity s rostoucí koncentrací glukózy. Model 2 vykazuje vyšší permitivitu. Na obrázku 4.12 je také hodnota permitivity krve z ITIS databáze [55], která sdružuje informace o dielektrických vlastnostech různých tkání, kde ale schází informace o koncentraci glukózy, a proto je použita pouze pro srovnání.

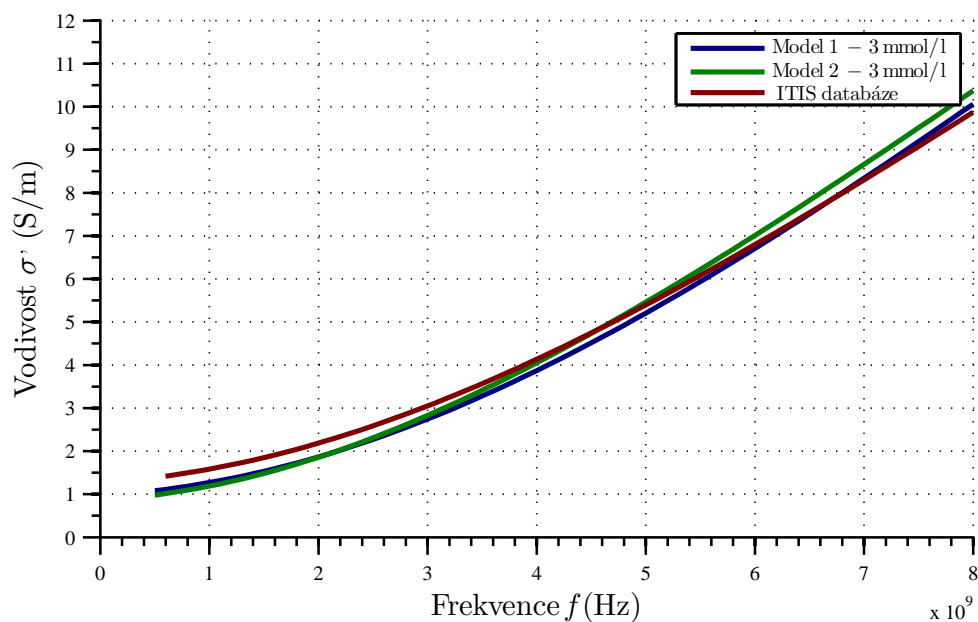


Obrázek 4.12: Porovnání závislosti relativní permitivity na frekvenci pro oba modely pro koncentrace glukózy 3 a 10 mmol/l

V simulacích je potřeba také nastavit vodivost materiálu. Reálná část vodivosti je spočítána dle rovnice 3.14. Na obrázku 4.14 jsou porovnané vodivosti obou modelů a ITIS databáze. Oba modely mají podobnou vodivost, oba ovšem menší, než uvádí ITIS.



Obrázek 4.13: Porovnání závislosti relativní permitivity na koncentraci glukózy při frekvenci $f=2$ GHz pro oba modely



Obrázek 4.14: Porovnání závislosti reálné části vodivosti na frekvenci pro oba modely při koncentraci glukózy 3 mmol/l

4.2.5 Ostatní nastavení simulace

Elektrické parametry jednotlivých částí virtuálního modelu (popsaných v kapitole 4.2.1 na str. 35) jsou v tabulce 4.5. Byly zvoleny tak, aby co nejlépe odpovídali reálně použitým materiálům.

Tabulka 4.5: Elektrické parametry materiálů použitých v COMSOL modelu

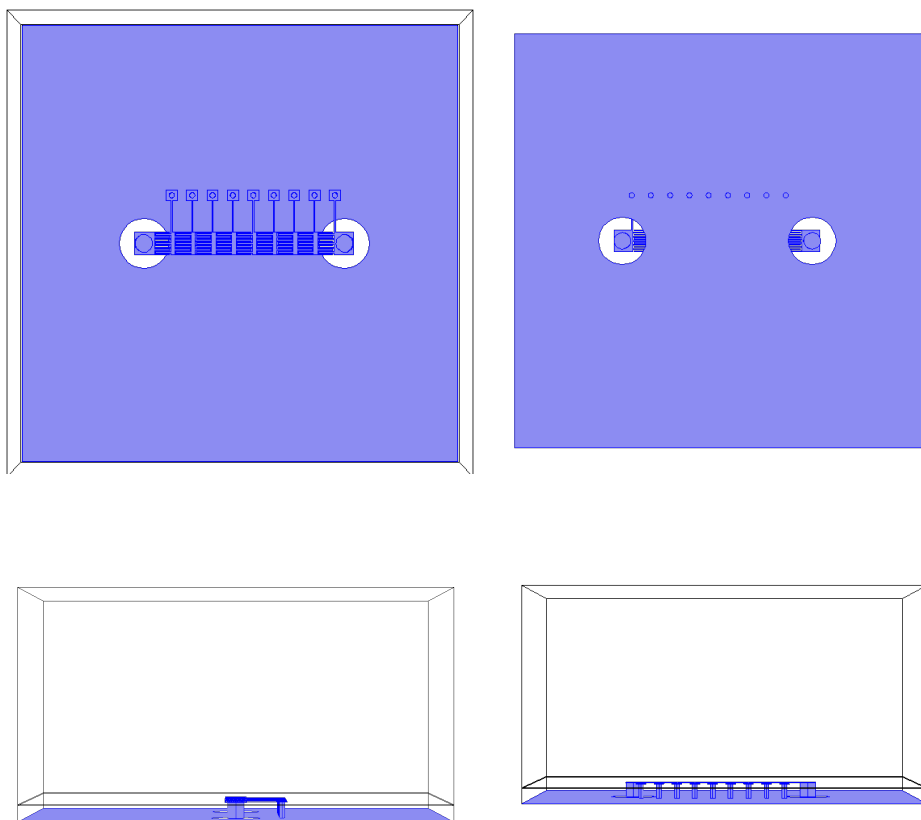
Materiál	Permitivita ϵ'	Vodivost σ (S.m)
Substrát senzoru	3,38	0
Substrát konektoru (teflon)	2,1	0
Model krve	viz kapitolu 4.2.2 a 4.2.3	viz kapitolu 4.2.2 a 4.2.3
PLA krabička [56]	2,75	0
Vzduch	1	0

V programu COMSOL byl použit radiofrekvenční (RF) modul používající metodu konečných prvků [57]. Simulace byla zvolena jako studie ve frekvenční oblasti (Frequency domain study).

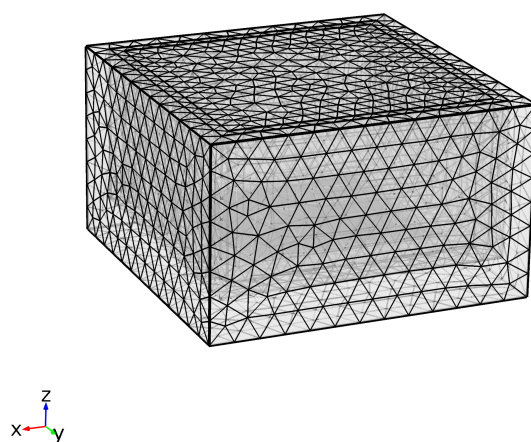
Vodivé části senzoru byly pro zjednodušení zvolené jako dokonalý vodič bez odporu.

Charakteristická impedance obou portů byla nastavena na 50Ω a typ byl určen jako koaxiální. Na portu 1 byla nastavena excitační vlna o amplitudě 1 V a nulové počáteční fázi. Port 2 byl zvolen bez excitační vlny a slouží pro výpočet S_{21}^* parametru. Všechny okrajové plochy modelu (kromě portů) jsou nastaveny jako tzv. Scattering Boundary Conditions, které modelují okraje materiálu nekonečně vzdáleného od zdroje, tudíž nedochází k odrazu na tomto rozhraní [57].

Celkový model byl rozdělen na malé čtyřstěny s maximální velikostí 3,6 mm a s nejmenší velikostí $4,5 \cdot 10^{-4}$ s maximálním relativním rozdílem velikosti mezi okolními elementy 45 %.



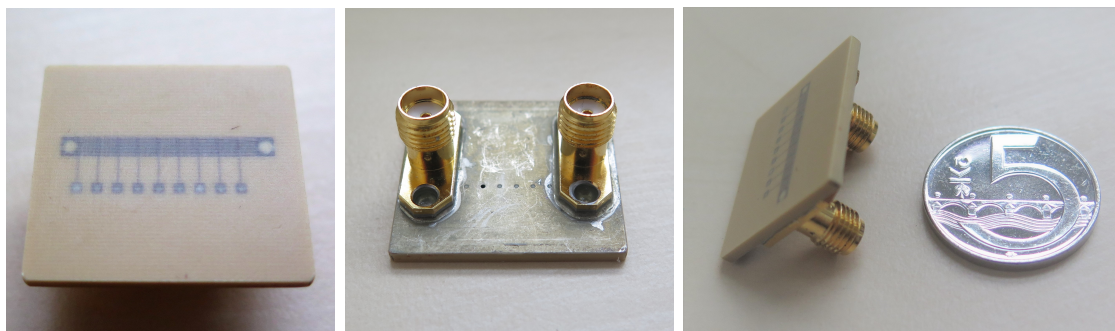
Obrázek 4.15: Umístění dokonalého vodiče do geometrie senzoru při simulaci. Odpovídá vodičům reálného senzoru, pro lepší přehlednost nejsou zobrazeny koaxiální konektory



Obrázek 4.16: Rozdělení model na konečný počet prvků (čtyřstěňů) o celkovém počtu 218 307

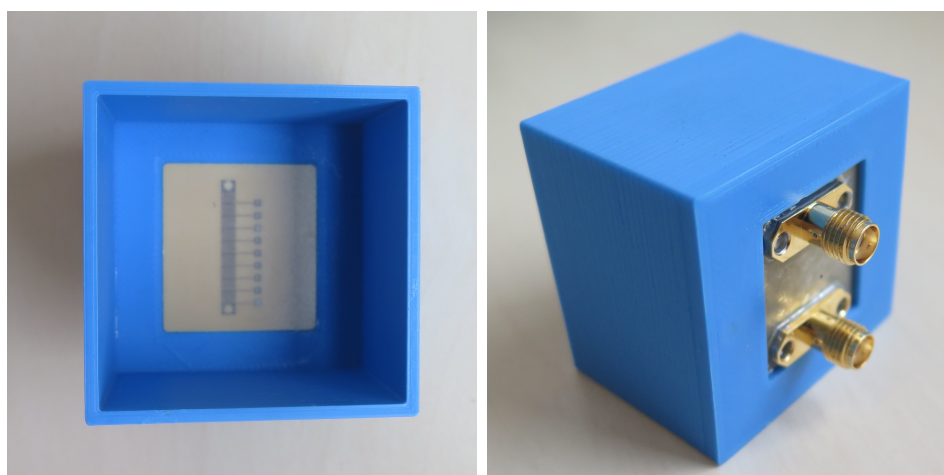
4.2.6 Výroba senzoru a příslušenství k měření

Senzor byl na zakázku vyroben firmou PragoBoard s.r.o. Použitý substrát Rogers RO4003C je určen pro vysokofrekvenční aplikace. Permitivita substrátu je dle výrobce $3,38 \pm 0,05$ a termální koeficient permitivity je $0,0040 \text{ } \%/^{\circ}\text{C}$. Příložná část senzoru je pokrytá nevodivou vrstvou o tloušťce 0,1 mm. Vyrobený senzor je na obrázku 4.17. K senzoru byly v externí laboratoři připájeny 50Ω SMA konektory.



Obrázek 4.17: Vyrobený senzor s připájenými koaxiálními konektory

Pro experimentální měření bylo příslušenství k senzoru vyrobeno na 3D tiskárně Prusa I3 MK2 z materiálu termoplastického polyesteru PLA (polylaktid). Jednalo se o upravenou krabičku pro vsazení senzoru určenou pro nalití krve. Navrženy a vyrobeny byly 2 typy krabiček, jedna pro objem krve 30 ml použitá v experimentu 1 a 2 a druhá pro objem 100 ml použitá v experimentu 3. Obrázek 4.18 ukazuje zasazení senzoru do 30 ml krabičky. Na okraje substrátu senzoru byla aplikována tenká vrstva silikonu, aby se zamezilo vniku kapaliny mezi senzor a krabičku.



Obrázek 4.18: Zasazení senzoru do PLA krabičky určené pro 30 ml krve

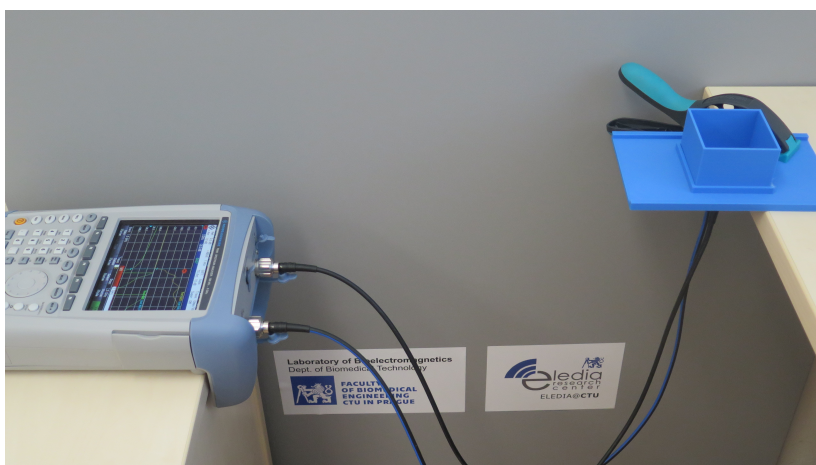
4.3 Metody experimentálního měření

Kvůli lepší dostupnosti byla použita místo lidské krve krev prasečí. Prase se z důvodů blízké fyziologie k člověku velice často využívá pro biomedicínské aplikace jako model [58]. Prase má podobnou fyziologickou hodnotu glykémie na lačno 3,6-5,3 mmol/l [59] jako člověk (dospělý muž) 3,9-5,6 mmol/l [60].

K měření S_{21}^* parametru a jeho fáze byl použit vektorový analyzátor Rohde& Schwarz FSH8.28 schopný měřit v rozsahu 100 kHz až 8 GHz. Přístroj byl po připojení koaxiálních kabelů kalibrován pomocí kalibračního standardu Rhode&Schwarz ZV-Z135 f a plně dvojportové kalibrace.

Ke kontrolnímu měření teploty byl použit teploměr DTM 3000-spezial s rozsahem teplot měření od -20 do 110 °C s rozlišením 0,01 °C a přesností $\pm 0,04$ °C. Zapojení měřicí soustavy je na obrázku 4.19.

Koncentrace glukózy v každé sadě měření byla určena pomocí komerčního glukometru Accu-check Performa Nano, který je určen jak pro použití v domácím prostředí tak pro diagnostické použití *in vitro* profesionálními zdravotníky v klinickém prostředí. Před každým experimentem byl glukometr otestován výrobcem dodávanými kontrolními roztoky o nízké a vysoké koncentraci glukózy. Naměřená hodnota byla pro obě koncentrace v požadovaném rozmezí. Byly použity originální testovací proužky pro plnou krev o HTK mezi 10 a 65 %. Jejich rozsah měření je 0,6-33,3 mmol/l. Přesnost systému je definována klinickými zkouškami, u kterých pro koncentrace nižší než 5,55 mmol/l bylo 97 % výsledků v rozmezí $\pm 0,56$ mmol/l a při koncentraci vyšší než 5,55 mmol/l je 91 % výsledků v rozmezí ± 10 % od skutečné hodnoty. Pro vyloučení náhodných chyb měření byly pro každé měření použity 2 testovací proužky a výsledná hodnota byla určena jako průměr.



Obrázek 4.19: Zapojení měřicí soustavy společné pro všechny experimenty (na obrázku experiment 3 s krabičkou pro 100 ml krve)

4.3.1 Odběr vzorků

Pro měření byla použita prasečí krev, která byla odebrána do plastových nádob s již připraveným roztokem citronanu trisodného (běžně používaný antikoagulant) v koncentraci 0,129 M roztoku ve vodě v poměru 1:9 s krví. Odebírání krve proběhlo za pomoci pracovníků jatek ihned po usmrcení zvířete z krkavice přímo do připraveného roztoku citronanu do maximálního požadovaného objemu, tak aby nedošlo ke strážení krve. Začátek měření proběhl vždy do cca 2 hodin po samotném odběru.

Hematokrit vzorků nebyl měřen a dle literatury [61] je jeho hodnota proměnlivá dle aktuálního stavu prasete. Hodnoty HTK se pohybují v rozmezí 23,5-33 % , s průměrnou hodnotou ($\pm SD$) $27,0 \pm 3,1$ % (měřeno na 69 subjektech), což je hodnota nižší než u člověka (viz kapitolu 3.4.5).

4.3.2 Experiment č.1

Do připravené vodní lázně o teplotě 37 °C byly vloženy nádoby s krví a přidanou D-glukózou, dle požadované koncentrace. Pro navážení potřebného množství glukózy byly použity váhy VWR SM1245Di s rozlišením 0,01 mg při maximální váze 40 g. Jelikož měření neproběhlo okamžitě po přidání glukózy, probíhající příjem glukózy krevními buňkami ovlivňuje koncentraci v čase (snižování), a proto přesnost navážky nebyla důležitá a sloužila pouze k vytvoření přibližné koncentrační řady. Ta byla zvolena tak, aby pokryla hodnoty do cca 30 mmol/l. Hodnoty koncentrace glukózy naměřené před každým měřením série vzorků o jedné koncentraci jsou v tabulce 4.6.

Tabulka 4.6: Změřené hodnoty glukózy v experimentu 1. Koncentrace po přidání 500 mg glukózy do 100 ml krve byla mimo rozsah glukometru (>33 mmol/l)

Pořadí vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8
Změřená konc. glukózy (mmol/l)	4,9	7,8	12	12,3	15,4	21,8	27,7	>33

Prasata mají obecně vyšší teplotu těla než člověk (dle [62] průměrně 38,8 °C). Teplota vodní lázně byla zvolena na 37 °C, tak aby nedošlo k náhodnému překročení nefyziologických hodnot teplot, což by mohlo mít za následek degenerativní změny v krvi.

Před měřením na krvi se vždy změřila koncentrace glukózy komerčním glukometrem. Celé měření proběhlo během 2 hodin od prvního měřeného vzorku. Do připravených krabiček se senzory bylo vždy nalito 25 ml krve o požadované koncentraci. Poté byly na vektorovém analyzátoru získány údaje o parametru S_{21}^* a jeho fáze ve frekvenčním rozsahu od 1,5 do 2,5 GHz.

Krev byla poté odebrána, senzor vypláchnut destilovanou vodou a vysušen. Měření se tímto způsobem opakovalo celkem třikrát pro jednu koncentraci. Naměřená data jsou zobrazena v kapitole 5.2.1 na str. 58.

4.3.3 Experiment č.2

Při druhém experimentu bylo postupováno stejně jako při prvním. Teplota vodní lázně byla opět nastavena na 37 °C. Aby došlo k lepšímu rozmíchání roztoku a nižšímu výkyvu osmolality krve, místo navážky glukózy byl přidán připravený izotonický roztok 5% glukózy v deionizované vodě o osmolalitě přibližně 278 mOsm/l [63]. Na rozdíl od experimentu č.1 byly provedeny celkem 4 měření pro každou koncentraci. Celé měření proběhlo během 2 hodin od prvního měřeného vzorku. Naměřená data jsou zobrazena v kapitole 5.2.2 na str. 61.

Tabulka 4.7: Změřené hodnoty glukózy v experimentu 2 pro jednotlivé vzorky.

Pořadí vzorku	1	2	3	4	5	6	7
Změřená konc. glukózy (mmol/l)	4,5	6,3	8,1	10,6	14,8	19,5	25,2

4.3.4 Experiment č.3

Poslední měření bylo provedeno v klimatizované místnosti při teplotě 23 °C. Konstantní objem a nižší teplota oproti předchozím měření byla zvolena kvůli otestování senzitivity při nižší teplotě a pro lepší kontrolu nad teplotou a objemem vzorku.

Do připravené nádoby se senzorem bylo nalito 100 ml krve bez přidané glukózy, po ustálení teploty (mezi 22 a 23 °C) byly stejně jako při předchozích měřeních získány údaje o parametru S_{21}^* a jeho fáze ve frekvenčním rozsahu od 1,5 GHz do 2,5 GHz. Poté bylo přidáno požadované množství navážené glukózy a krev byla promíchána. Během tohoto časového intervalu byla promíchána ještě v 2., 5. a 10. minutě. Po každém měření byla změřena koncentrace glukózy komerčním glukometrem. Naměřená data jsou zobrazena v kapitole 5.2.3 na straně 64.

Tabulka 4.8: Změřené hodnoty glukózy v experimentu 3 pro jednotlivé vzorky

Pořadí vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Změřená konc. glukózy (mmol/l)	4,8	5,6	7,4	9,6	11,8	13,4	15,4	18,6	22,5

4.3.5 Experiment pro změření časové odezvy senzoru na skok v koncentraci glukózy

Protože data z experimentu 1 a 2 vykazovala opačný průběh změny fáze než předpovídaly simulace založené na modelu 1 i 2, byl na konci 2. experimentu otestován časový průběh změny fáze v závislosti na velké změně plazmatické koncentrace glukózy. Vzorek byl měřen po 6 hodinách po odběru krve, přičemž byl uchovávan při okolní teplotě 23 °C. Krev o objemu 25 ml byla nalita do malé krabičky se senzorem. V průběhu

100 minut byla měřena fáze vektorovým analyzátozem na frekvenci 1,854 GHz. Vždy před měřením byla krev opatrně promíchána, tak aby se příliš nemísila se vzduchem nebo nedošlo k hemolýze. V čase 55 minut od začátku měření bylo ke krvi přidáno 1 ml 5% roztoku glukózy, což odpovídá množství 50 mg. To způsobilo skok v koncentraci glukózy (z 3,6 na 25,7 mmol/l). Průběh změny fáze na tuto změnu je zobrazen na obrázku 5.24 na str. 67.

4.4 Zpracování dat

Data z experimentálních měření byla proložena polynomem 2. stupně (kvadratická regrese) pomocí programu STATISTICA 12 s využitím metody nejmenších čtverců. Regresní přímka byla poté doplněna o 95% interval spolehlivosti. Ten udává s pravděpodobností 95 % střední hodnoty fáze pro danou koncentraci [64]. Typ přímky byl zvolen s ohledem na charakter naměřených dat a na závislosti permitivity na koncentraci glukózy u červených krvinek, kterou popsali v [4] (v této práci na obrázku 4.9 na str. 39). Fáze proložená polynomem 2. stupně má obecně tvar:

$$\varphi(\hat{c}_g) = p(1) \cdot \hat{c}_g^2 + p(2) \cdot \hat{c}_g + p(3), \quad (4.3)$$

kde \hat{c}_g je odhad koncentrace glukózy, $p(k)$ je k -tý parametr odhadu koeficientu polynomu a $\varphi(\hat{c}_g)$ je odhadnutá fáze.

Chyba, které se dopouštíme proložením křivky do naměřených bodů je tím větší, čím jsou měřené body od této křivky vzdálené. Parametr, který tuto chybu dokáže popsat se nazývá reziduální součet čtverců SS_E a odpovídá variabilitě nevysvětlené regresním modelem [64]. Kdyby všechny body leželi na křivce, SS_E by bylo nulové. SS_E je definováno jako:

$$SS_E = \sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y}_i)^2, \quad (4.4)$$

kde N je počet naměřených hodnot, Y_i je naměřená hodnota a \hat{Y}_i je odhadnutá hodnota regresním modelem. Jednotka této veličiny záleží na jednotce prokládaných proměnných (jejich 2. mocnina).

Při tvorbě regresního modelu se pomocí programu STATISTICA 12 také vypočítává koeficient determinace R^2 , který se dá interpretovat jako podíl z celkové variability hodnot závislé proměnné (fáze), který se modelem podařilo vysvětlit. Pro malý soubor analyzovaný dat je doporučováno používat upravený koeficient determinace R_{adj}^2 , který vytváří korekci, pro analýzu malého množství dat, které by jinak způsobily nadhodnocenou hodnotu R^2 [64]. Hladina spolehlivosti pro testy byla zvolena $\alpha_p=0,05$. U výsledků z každého experimentálního měření je poté tabulka s odhadnutými parametry kvadratické křivky včetně standardní chyby SE , hodnoty t -statistiky pro test daného daného regresního koeficientu, pravděpodobnosti p a hodnoty $\pm 95\%$ intervalu spolehlivosti regresního modelu.

4.5 Metoda odhadu koncentrace glukózy na základě vytvořeného regresního modelu

Po získání průběhu závislosti změřené fáze φ na koncentraci glukózy c_g je z proloženého polynomu 2. stupně možné odhadnout koncentraci neznámého vzorku ze znalosti změřené fáze φ a koeficientů použitého polynomu. Z rovnice 4.3 je poté možné určit odhad koncentrace glukózy \hat{c}_g .

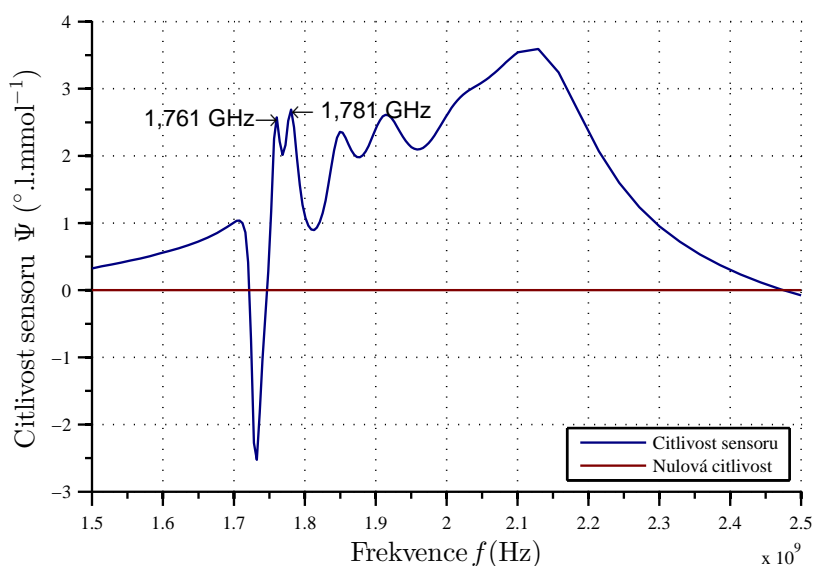
Pro odhad byla použita data z Experimentu 2 (výsledky v kapitole 5.2.2) u kterých bylo získáno nejvíce opakování pro měření na jedné koncentraci (celkem 4). Hodnoty fáze ze 3 měření byly proloženy polynomem 2. stupně dle 4.3 a z dat ze 4. měření byla odhadnuta koncentrace řešením rovnice 4.3.

5 Výsledky

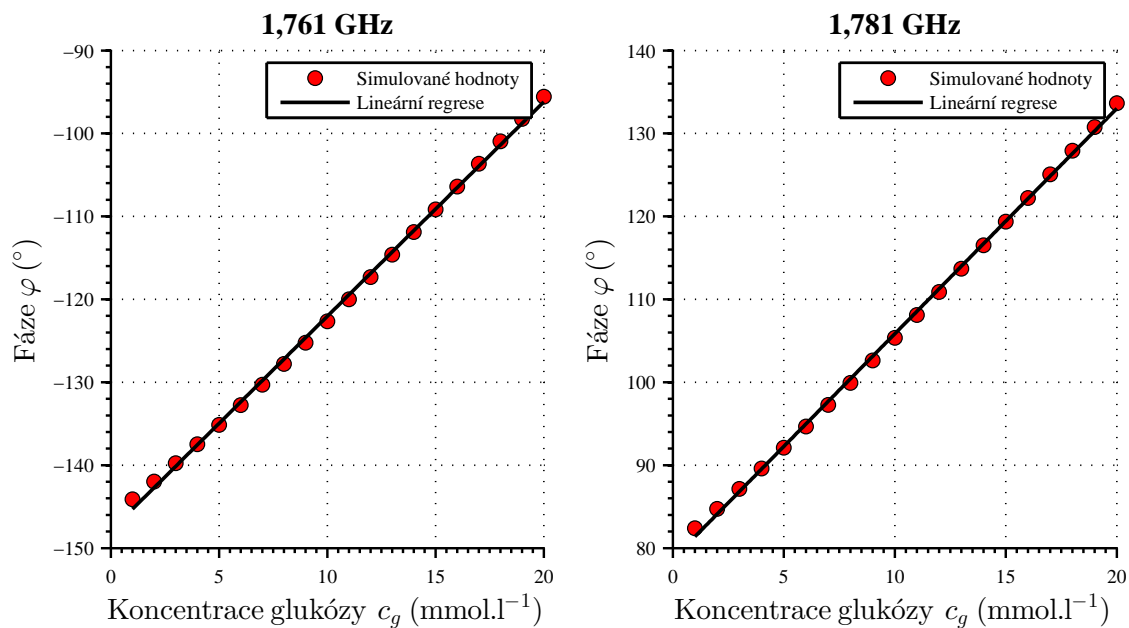
5.1 Simulace v programu COMSOL

Simulováno bylo chování senzoru na 130 frekvencích, které nebyly ekvidistantně rozděleny. Aby se ušetřil výpočetní čas, frekvenční oblast měření, kde se objevují rychlé změny je pokrytá 100 frekvencemi (od 1,7 GHz až do 2,1 GHz) a na zbytek (mezi 1.5 GHz až 1,7 GHz a 2,1 GHz až 2,5 GHz) připadlo 30 frekvencí. Modely byly nastaveny pro koncentrace glukózy 3,9 a 15 mmol/l a po nalezení vhodné citlivé frekvenční oblasti byla provedena simulace na této frekvenci pro koncentrace 1 až 20 mmol/l.

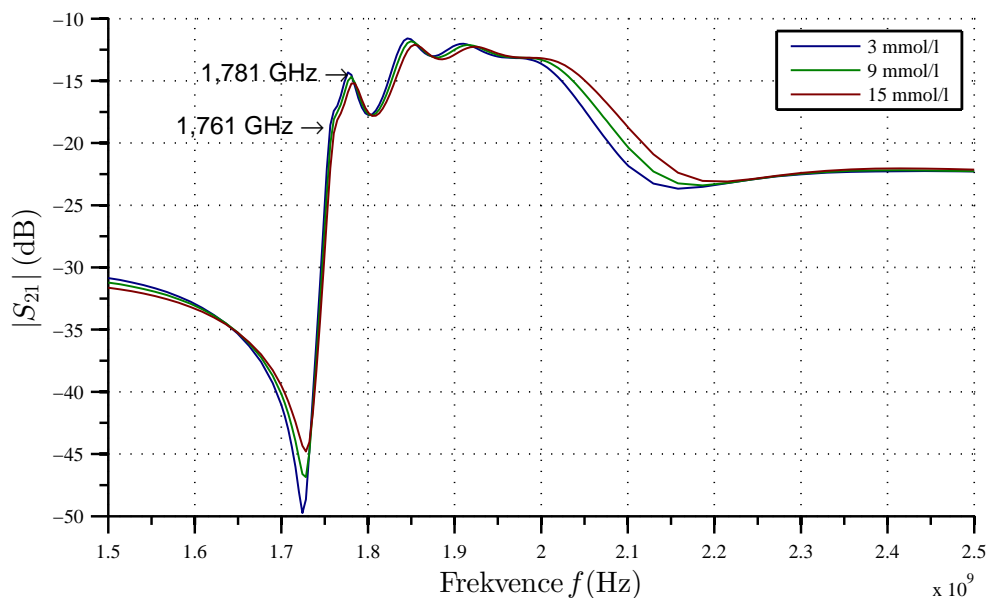
5.1.1 Simulace modelu krve 1



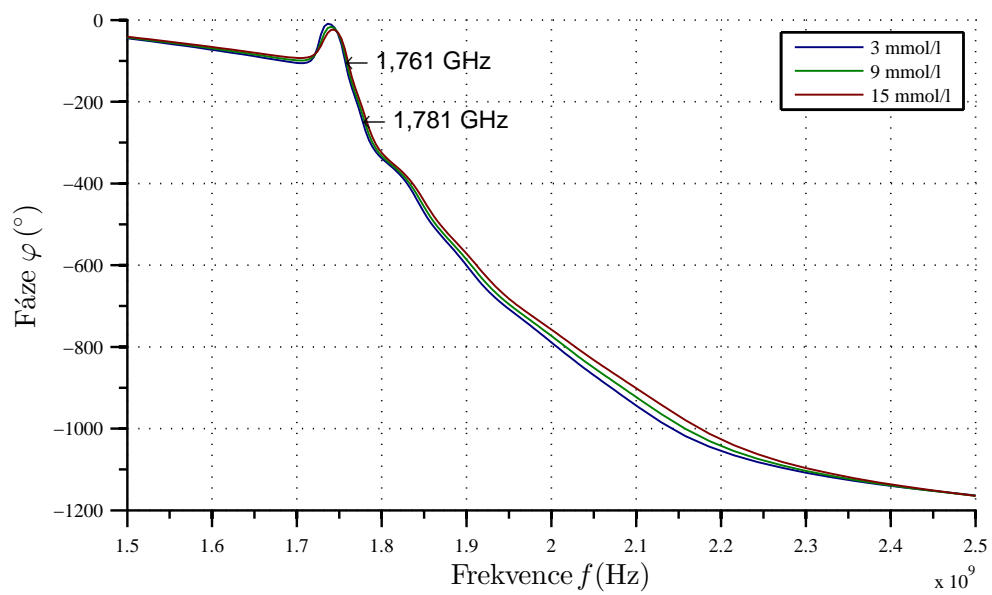
Obrázek 5.1: Simulace modelu 1 - Citlivost senzoru pro dané frekvence, vypočítána jako změna fáze při změně koncentrace glukózy c_g ze 3 na 15 mmol/l



Obrázek 5.2: Simulace modelu 1 - Závislost fáze S_{21}^* parametru φ parametru na koncentraci c_g pro frekvenci 1,761 GHz a 1,781 GHz. Parametry proložené křivky jsou v tabulce 5.8 na str. 70

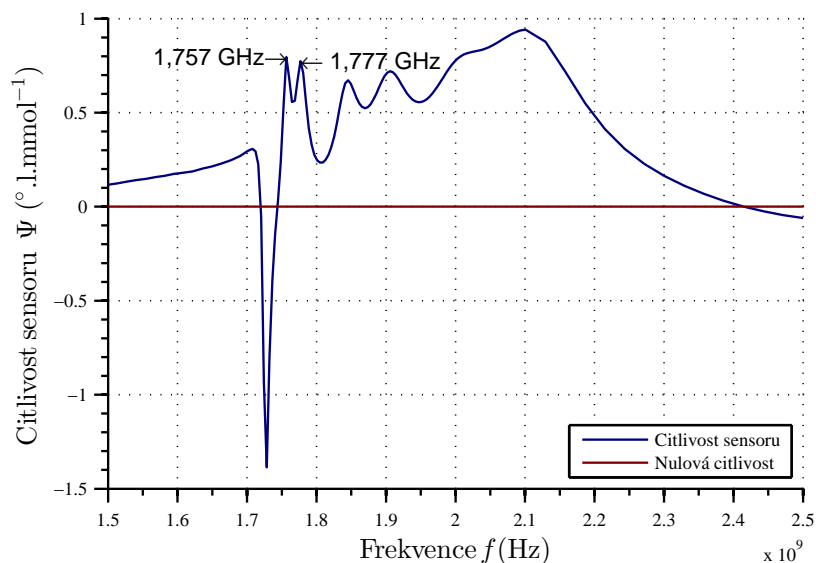


Obrázek 5.3: Simulace modelu 1 - Závislost $|S_{21}|$ na frekvenci pro 3 různé koncentrace glukózy c_g

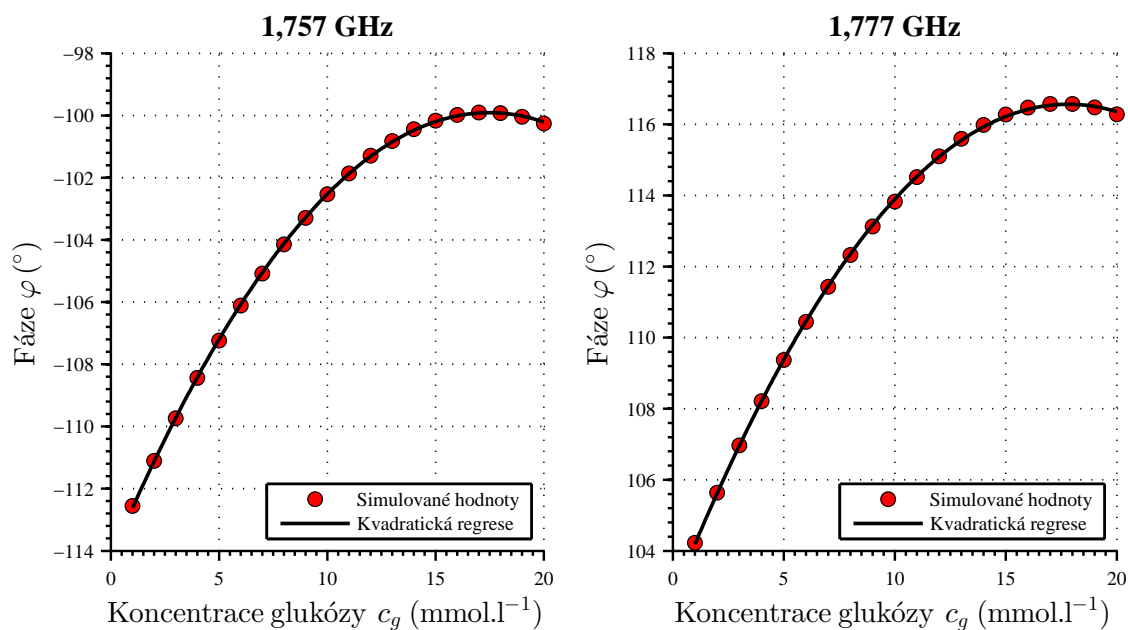


Obrázek 5.4: Simulace modelu 1 - Závislost fáze φ na frekvenci pro 3 různé koncentrace glukózy c_g

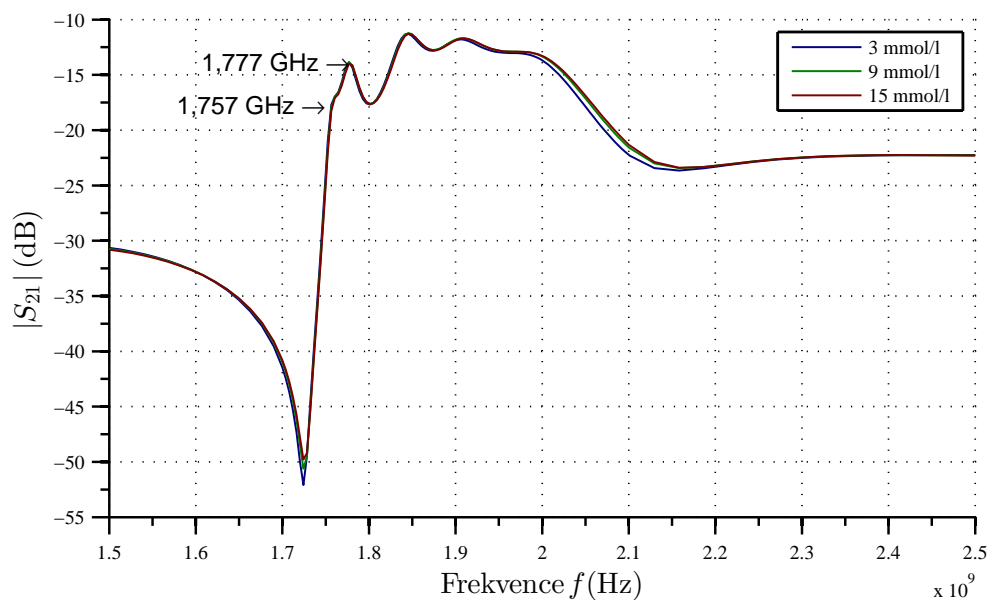
5.1.2 Simulace modelu krve 2



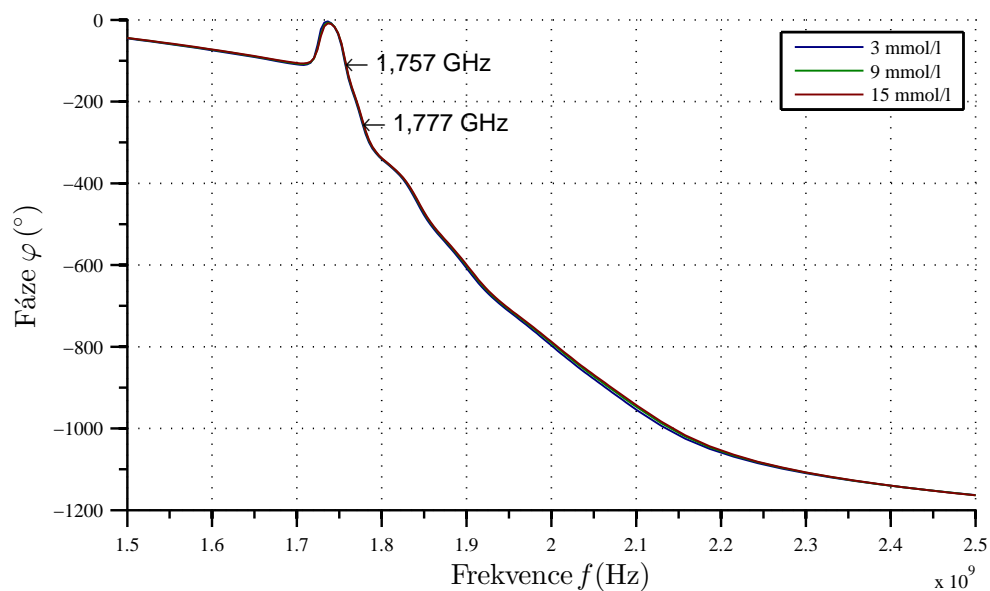
Obrázek 5.5: Simulace modelu 2 - Cítlivost senzoru pro dané frekvence, vypočítána jako změna fáze při změně koncentrace glukózy c_g ze 3 na 15 mmol/l



Obrázek 5.6: Simulace modelu 2 - Závislost fáze S_{21}^* parametru φ na koncentraci c_g pro frekvenci 1,757 GHz a 1,777 GHz. Parametry proložené křivky jsou v tabulce 5.8 na str. 70



Obrázek 5.7: Simulace modelu 2 - Závislost $|S_{21}|$ parametru na frekvenci pro 3 různé koncentrace glukózy c_g



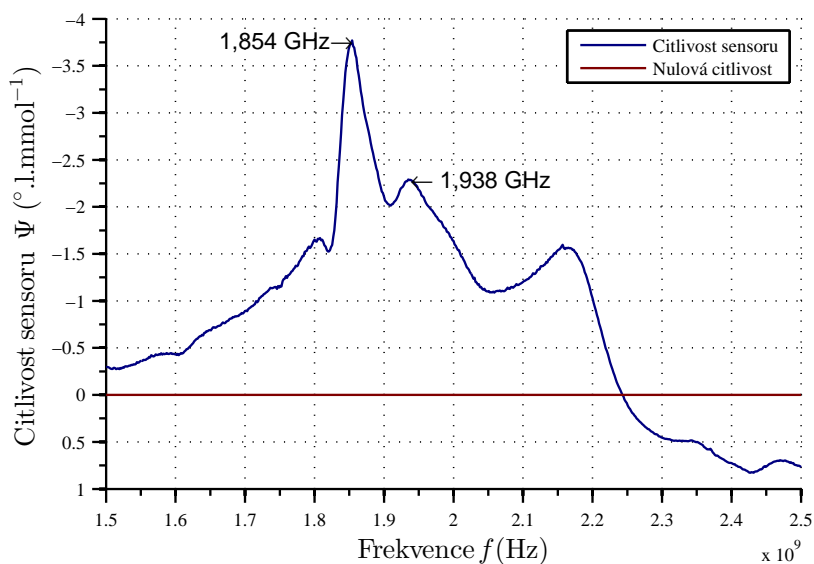
Obrázek 5.8: Simulace modelu 2 - Závislost fáze φ na frekvenci pro 3 různé koncentrace glukózy c_g

5.2 Výsledky experimentálního měření

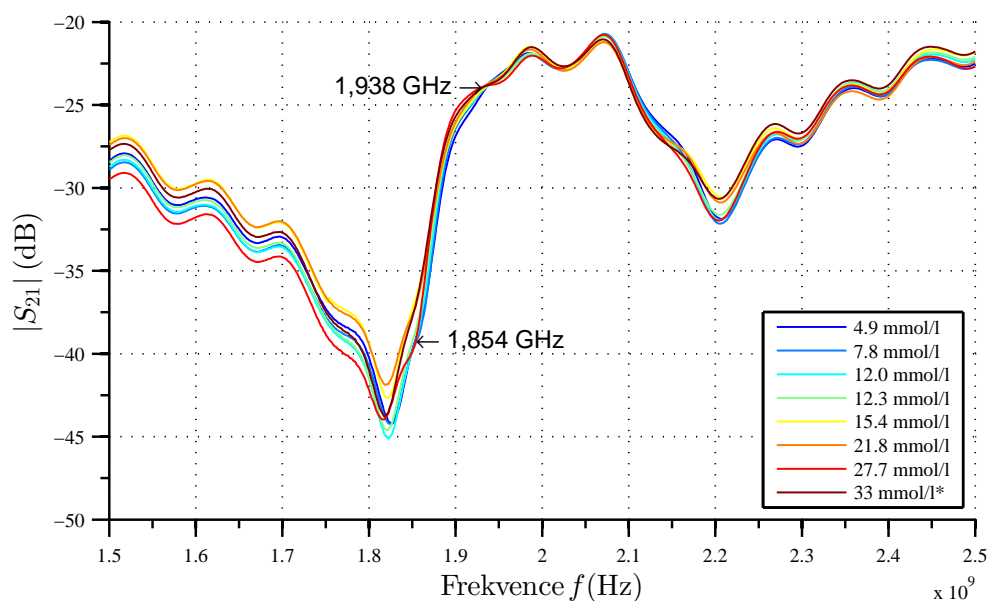
Data získaná z vektorového analyzátoru a glukometru byla vyhodnocena a zpracována do následujících grafů. V případě experimentu 1 a 2 jsou zobrazeny hodnoty získané jako aritmetický průměr přes všechna provedená měření na dané koncentraci. Z průběhů fáze pro různé koncentrace byla určena citlivost senzoru. Ta je určena jako rozdíl změřené fáze mezi koncentracemi přibližně 5 a 15 mmol/l (v každém měření byly lehce odlišné) vydělený tímto rozsahem koncentrací. Průběhy citlivostí v této kapitole nám říkají, o kolik stupňů se změnila fáze na dané frekvenci při změně koncentrace o 1 mmol/l. Rozmezí koncentrací pro výpočet citlivostí, tj. do 15 mmol/l je zvoleno pro lineární charakteristiku tohoto rozmezí, jak bude vidět v následujících grafech. Na závislosti průběhu citlivosti na frekvenci můžeme pozorovat lokální maxima, která vykazují vysokou citlivost. Tyto maxima se nacházejí v místech, kde fáze dosahuje největšího poklesu s rostoucí frekvencí. V těchto maximech byly zvoleny vždy 2 frekvence, na kterých bylo měření důkladněji analyzováno (viz např. obrázek 5.12 a 5.13). Tyto frekvence jsou označeny v grafech šipkami.

5.2.1 Experiment 1

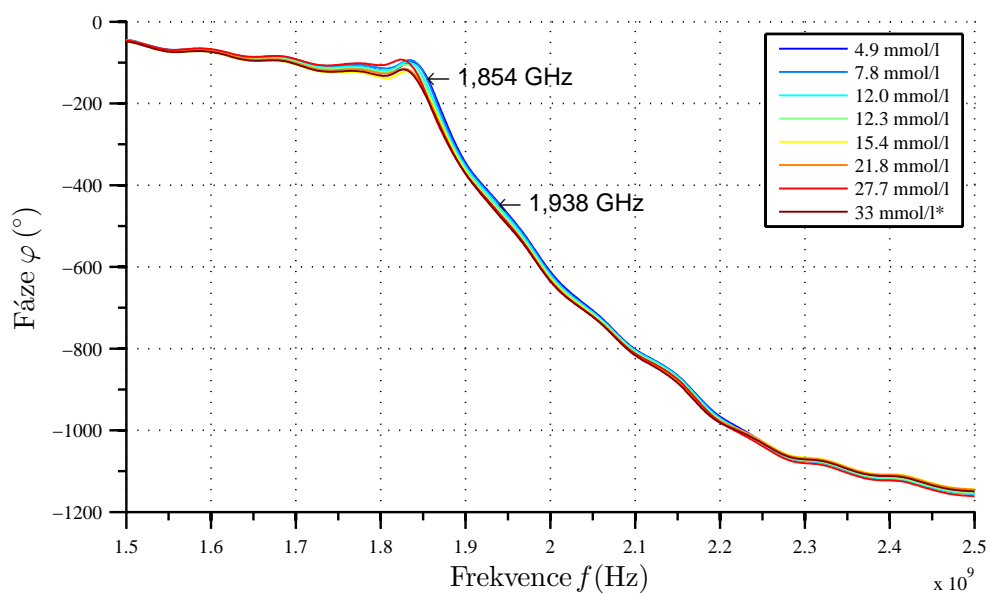
V této kapitole jsou výsledky měření popsány v metodách v kapitole 4.3.2 na str. 48. Měření proběhlo pro koncentrace od 4,9 do 27,7 mmol/l. V následujících grafech se objevují i data změřená pro koncentraci 33 mmol/l označená hvězdičkou. To je proto, že tato hodnota nebyla změřena, ale označuje její minimální možnou hodnotu (hodnota maximální koncentrace měřitelná použitým glukometrem)



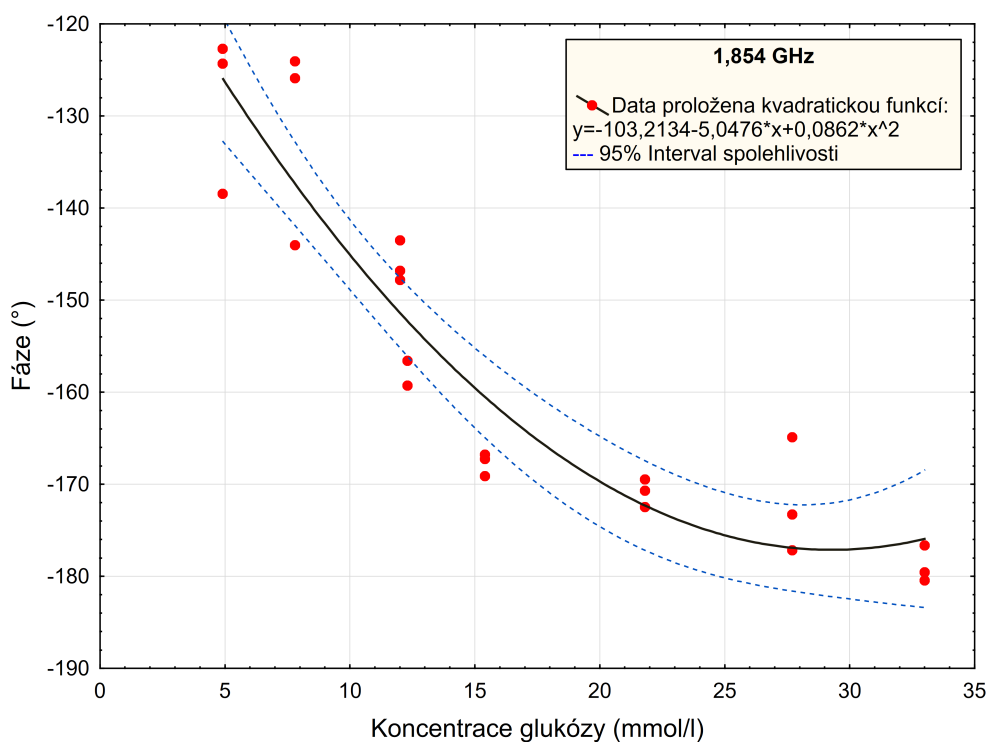
Obrázek 5.9: Experiment 1 - Citlivost senzoru, vypočítaná jako změna změřené fáze φ při změně koncentrace glukózy c_g ze 4,9 na 15,4 mmol/l



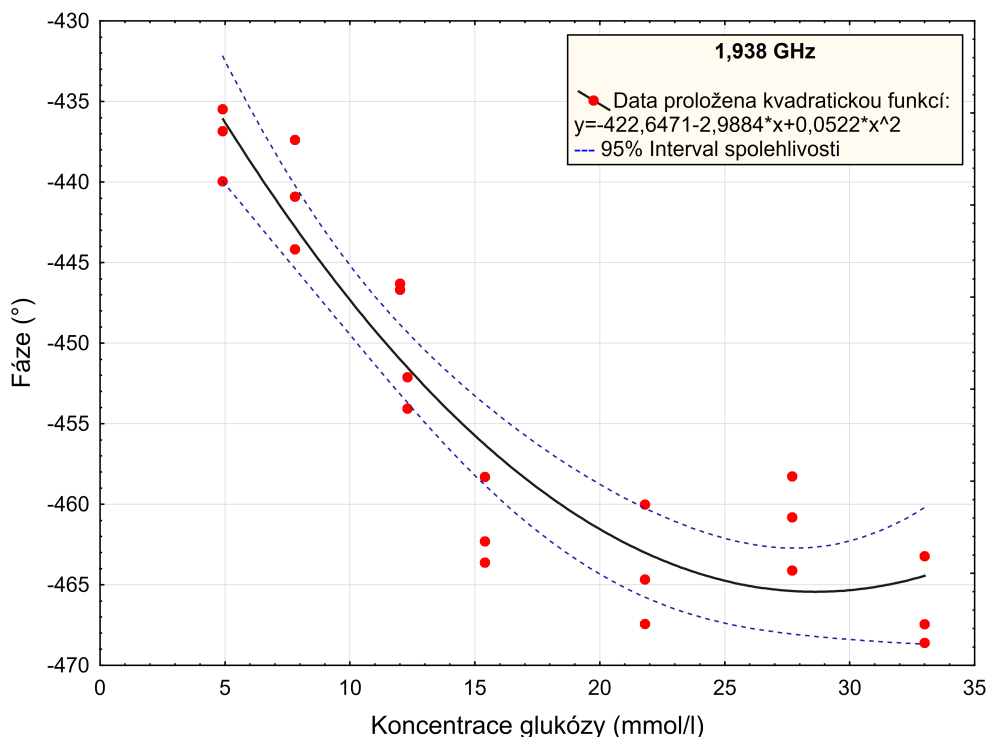
Obrázek 5.10: Experiment 1 - Závislost $|S_{21}|$ parametru na frekvenci pro 8 různých koncentrací glukózy c_g



Obrázek 5.11: Experiment 1 - Závislost změřené fáze φ na frekvenci pro 8 různých koncentrací glukózy c_g



Obrázek 5.12: Experiment 1 - Závislost změřené fáze S_{21}^* parametru φ na frekvenci $f = 1,854$ GHz pro 8 různých koncentrací glukózy c_g pro všechna provedená měření



Obrázek 5.13: Experiment 1 - Závislost změřené fáze S_{21}^* parametru φ na frekvenci $f = 1,938$ GHz pro 8 různých koncentrací glukózy c_g pro všechna provedená měření

Tabulka 5.1: Experiment 1 - Tabulka odhadů parametrů regresního modelu pro $f=1,854$ GHz, $N=24$, $R_{adj}^2=0,859$. Význam údajů v této tabulce je popsán v kapitole 4.4

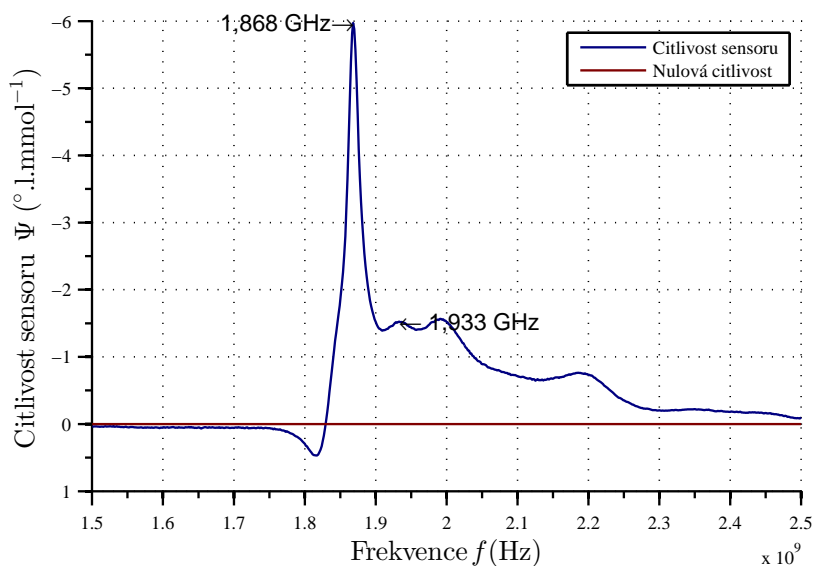
Koeficienty	Hodnota	SE	t	p	-95% int. spol.	+95% int. spol.
$p(3)$	-103,213	6,334	-16,295	0,000000	-116,385	-90,042
$p(2)$	-5,048	0,790	-6,390	0,000002	-6,690	-3,405
$p(1)$	0,086	0,020	4,239	0,000366	0,044	0,129

Tabulka 5.2: Experiment 1 - Tabulka odhadů parametrů regresního modelu pro $f=1,938$ GHz, $N=24$, $R_{adj}^2=0,861$. Význam údajů v této tabulce je popsán v kapitole 4.4

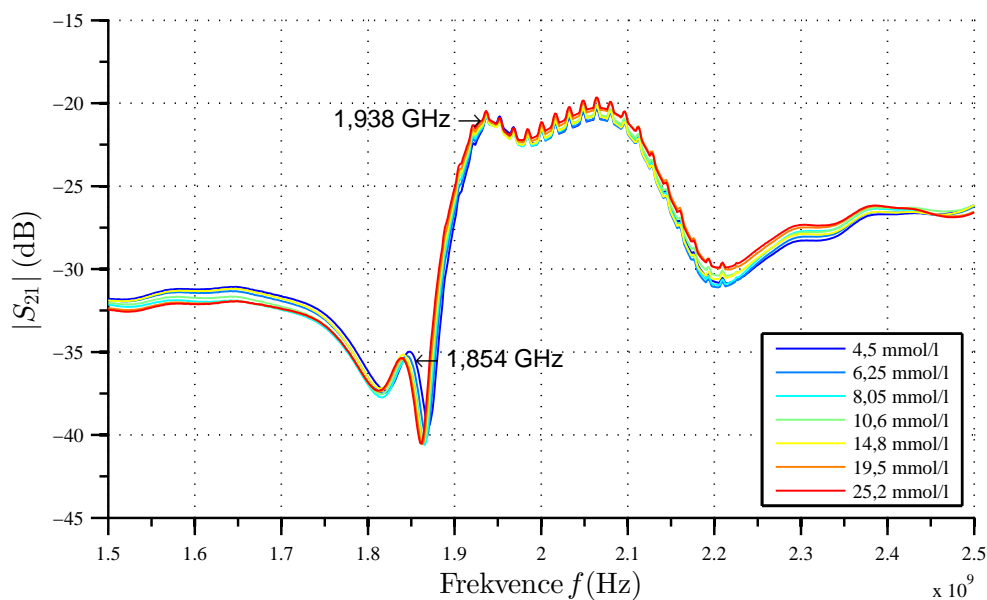
Koeficienty	Hodnota	SE	t	p	-95% int. spol.	+95% int. spol.
$p(3)$	-422,647	3,598	-117,478	0,000000	-430,129	-415,165
$p(2)$	-2,988	0,449	-6,660	0,000001	-3,921	-2,055
$p(1)$	0,052	0,011	4,519	0,000188	0,028	0,076

5.2.2 Experiment 2

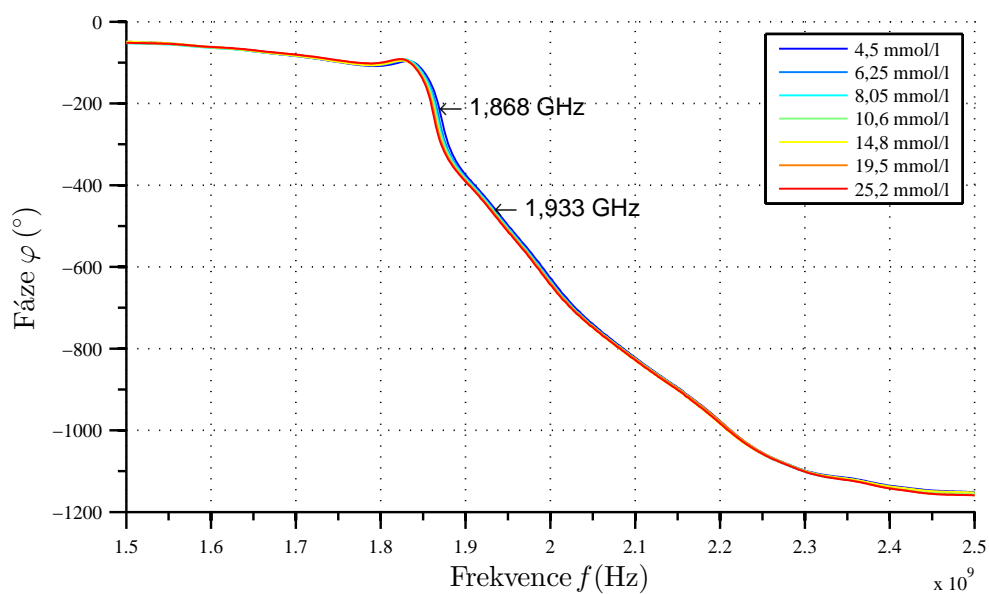
V této kapitole jsou výsledky měření popsány v metodách v kapitole 4.3.3 na str. 49. Měření bylo provedeno pro 7 koncentrací v rozsahu 4,5 až 25,2 mmol/l.



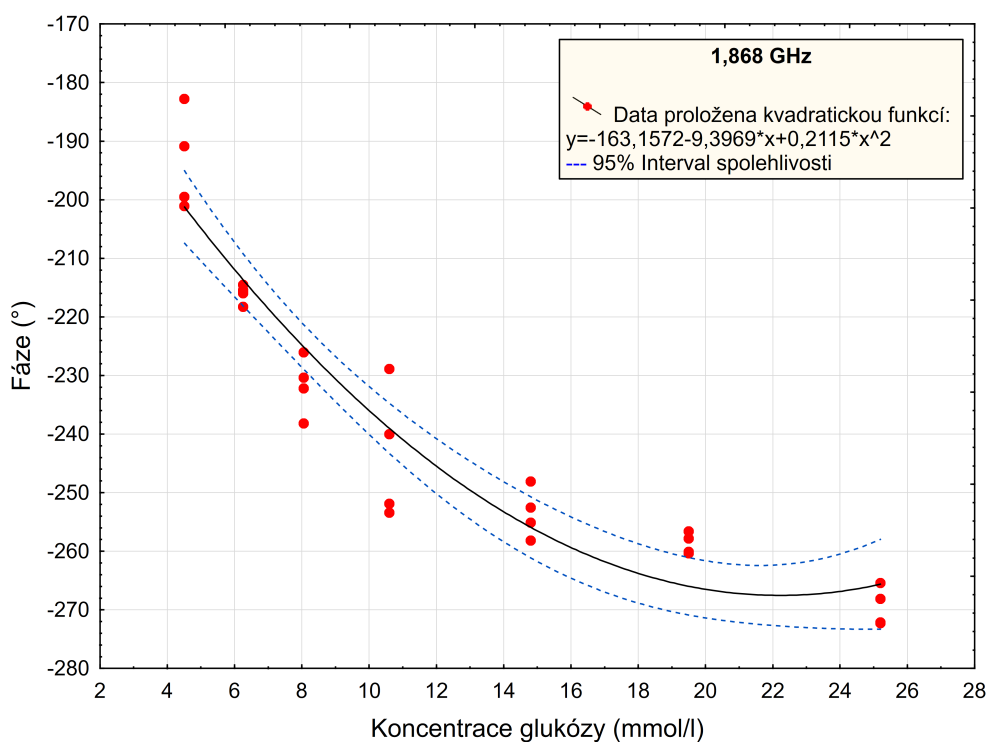
Obrázek 5.14: Experiment 2 - Citlivost senzoru, vypočítaného jako změna fáze při změně koncentrace glukózy c_g ze 4,5 na 14,8 mmol/l



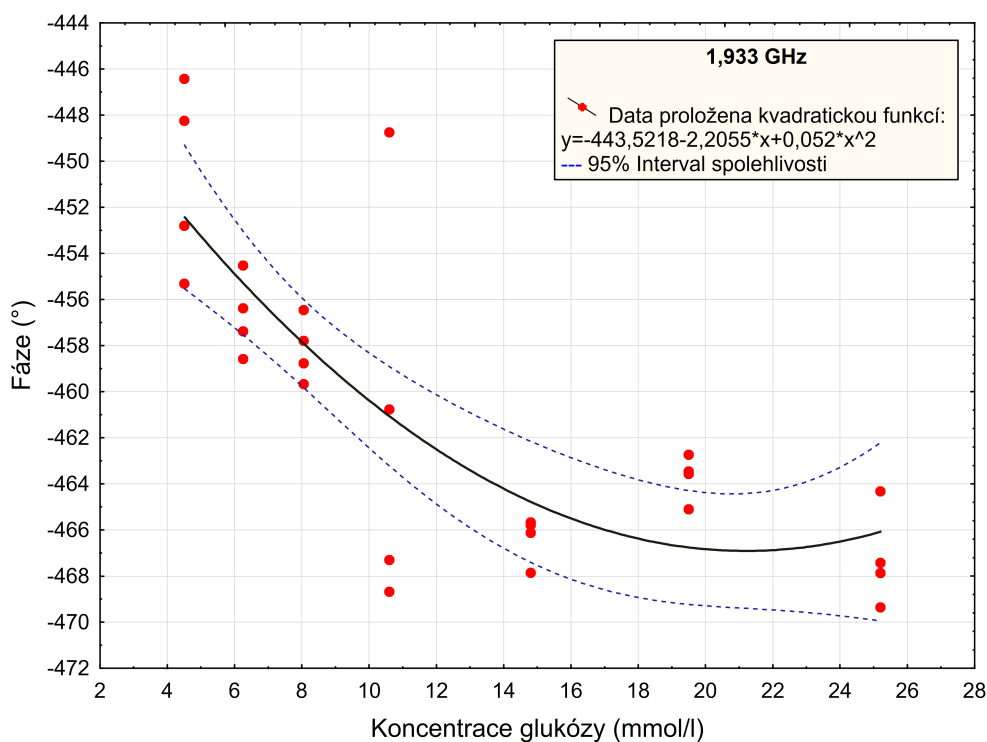
Obrázek 5.15: Experiment 2 - Závislost $|S_{21}|$ parametru na frekvenci f pro 7 různých koncentrací glukózy c_g



Obrázek 5.16: Experiment 2 - Závislost změřené fáze φ na frekvenci pro 7 různých koncentrací glukózy c_g



Obrázek 5.17: Experiment 2 - Závislost změřené fáze φ na frekvenci $f = 1,868$ GHz pro 7 různých koncentrací glukózy c_g pro všechna provedená měření



Obrázek 5.18: Experiment 2 - Závislost změřené fáze φ na frekvenci $f = 1,933$ GHz pro 7 různých koncentrací glukózy c_g a všechna provedená měření

Tabulka 5.3: Experiment 2 - Tabulka odhadů parametrů regresního modelu pro $f=1,868$ GHz, $N=28$, $R_{adj}^2=0,902$. Význam údajů v této tabulce je popsán v kapitole 4.4

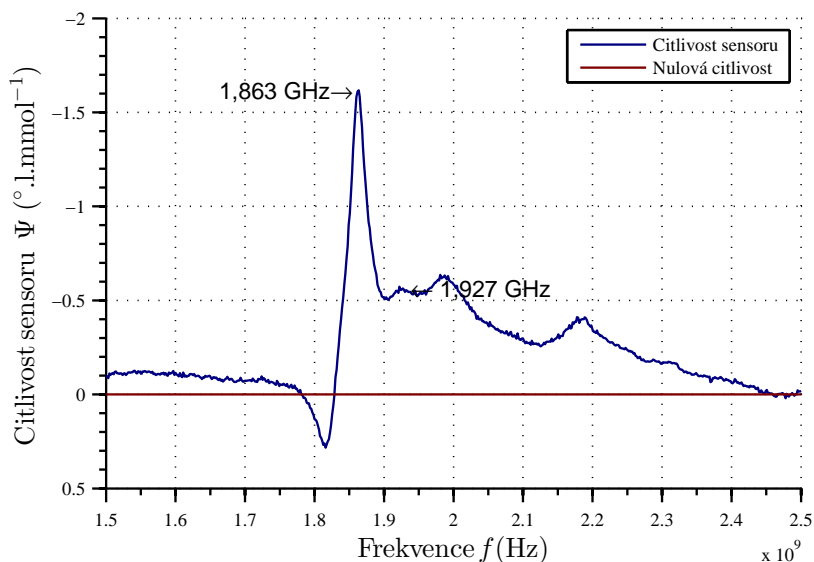
Koeficienty	Hodnota	SE	t	p	-95% int. spol.	+95% int. spol.
$p(3)$	-163,157	6,861	-23,782	0,000000	-177,287	-149,028
$p(2)$	-9,397	1,123	-8,368	0,000000	-11,710	-7,084
$p(1)$	0,212	0,038	5,632	0,000007	0,134	0,289

Tabulka 5.4: Experiment 2 - Tabulka odhadů parametrů regresního modelu pro $f=1,933$ GHz, $N=28$, $R_{adj}^2=0,622$. Význam údajů v této tabulce je popsán v kapitole 4.4

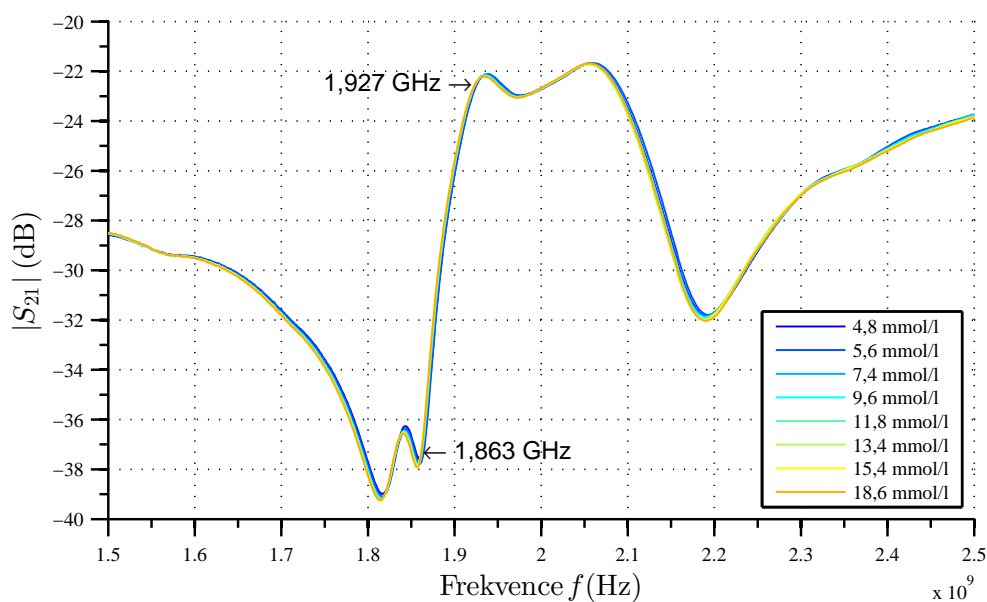
Koeficienty	Parametr	SE	t	p	-95% int. spol.	+95% int. spol.
$p(3)$	-443,522	3,458	-128,248	0,000000	-450,644	-436,399
$p(2)$	-2,205	0,566	-3,896	0,000647	-3,371	-1,040
$p(1)$	0,052	0,018	2,747	0,010994	0,013	0,091

5.2.3 Experiment 3

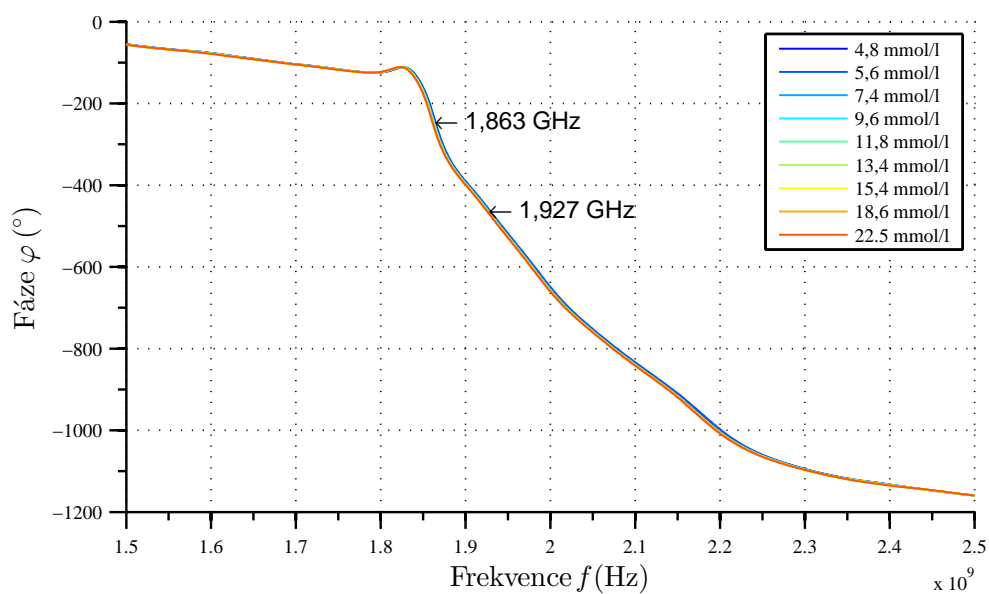
Na rozdíl od předchozích měření byla provedena pouze jedna série měření, tudíž je na obrázku 5.22 a 5.23 vidět, že interval spolehlivosti pro regresní přímkou je širší v porovnání s předchozími měřeními (menší množství měřených dat)



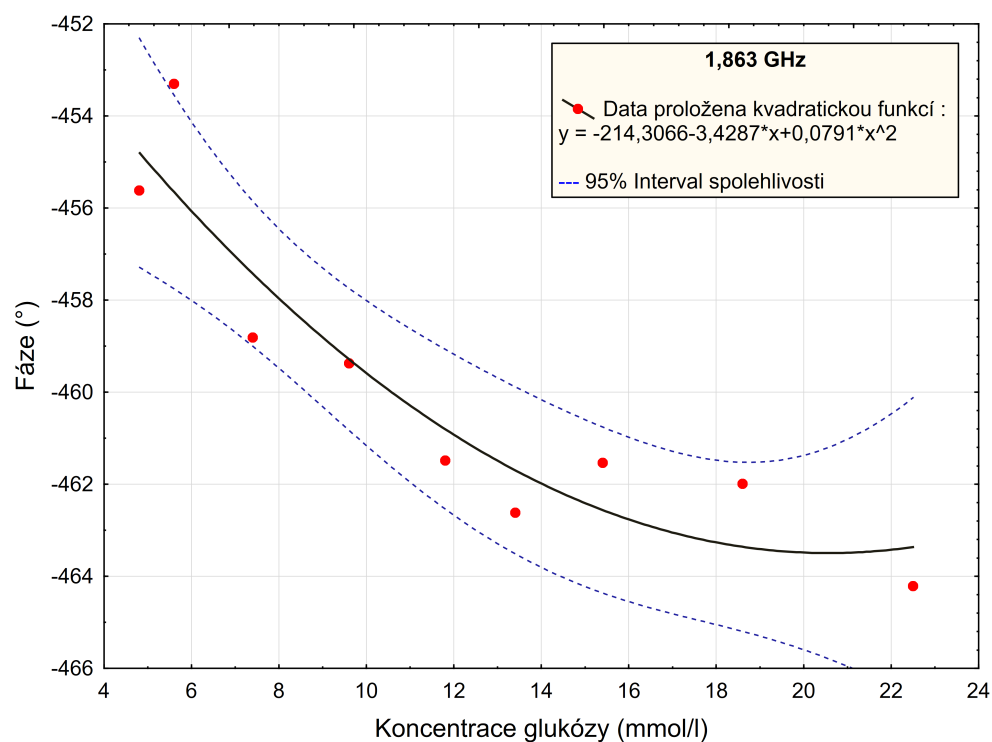
Obrázek 5.19: Experiment 3 - Citlivost senzoru, vypočítaného jako změna fáze při změně koncentrace glukózy c_g ze 4,8 na 15,4 mmol/l



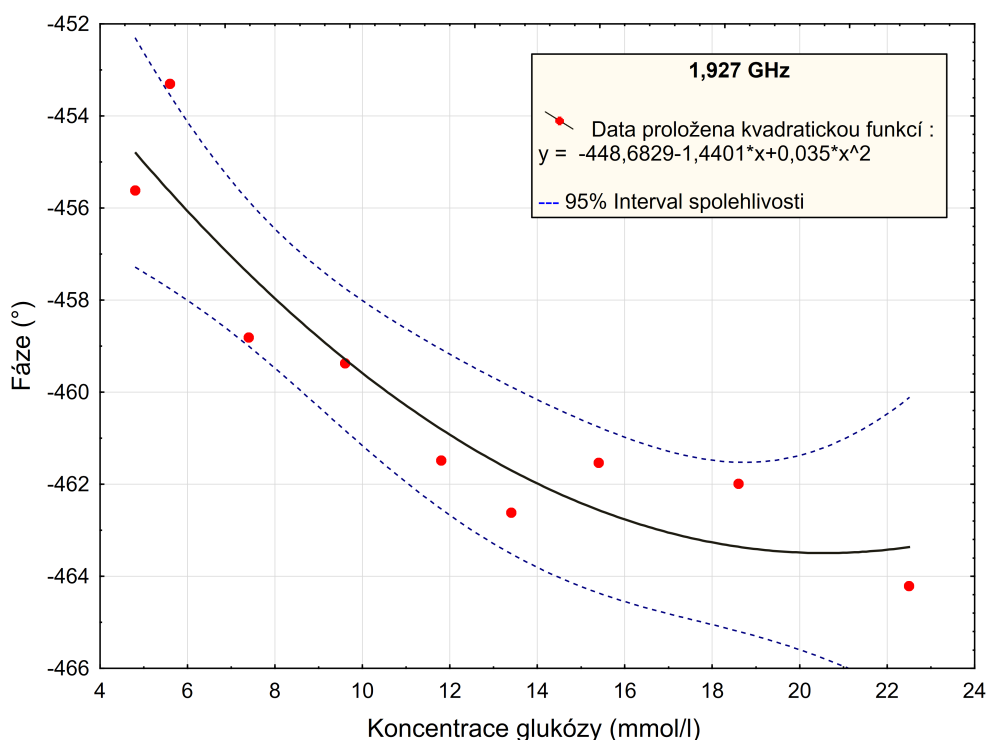
Obrázek 5.20: Experiment 3 - Závislost $|S_{21}|$ parametru na frekvenci pro 9 různých koncentrací glukózy c_g



Obrázek 5.21: Experiment 3 - Závislost změřené fáze S_{21}^* parametru φ na frekvenci pro 9 různých koncentrací glukózy c_g



Obrázek 5.22: Experiment 3 - Závislost změřené fáze S_{21}^* parametru φ na frekvenci $f = 1,863$ GHz pro 9 různých koncentrací glukózy c_g pro všechna provedená měření



Obrázek 5.23: Experiment 3 - Závislost změřené fáze S_{21}^* parametru φ na frekvenci $f = 1,927$ GHz pro 9 různých koncentrací glukózy c_g pro všechna provedená měření

Tabulka 5.5: Experiment 3 - Tabulka odhadů parametrů regresního modelu pro $f=1,863$ GHz, $N=9$, $R_{adj}^2=0,912$. Význam údajů v této tabulce je popsán v kapitole 4.4

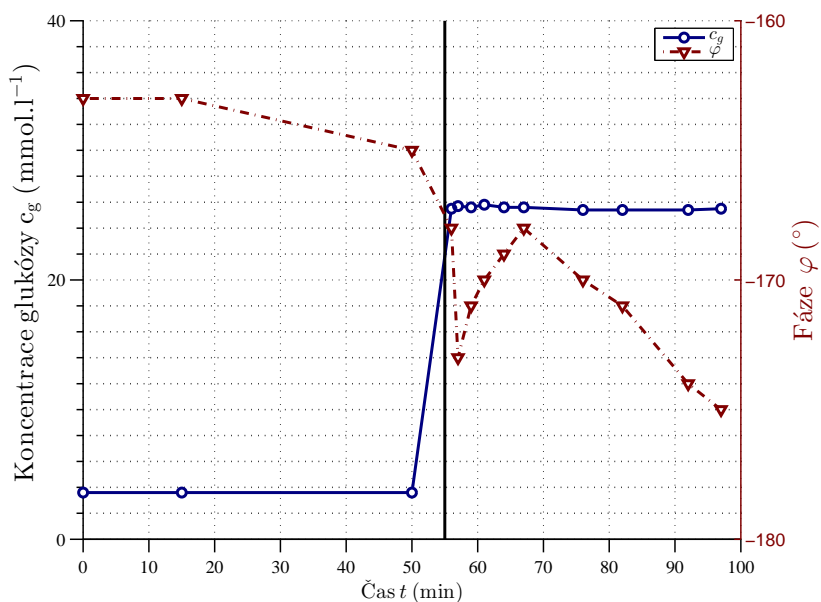
Koeficienty	Parametr	SE	t	p	-95% int. spol.	+95% int. spol.
$p(3)$	-214,307	4,529	-47,322	0,000000	-225,388	-203,225
$p(2)$	-3,429	0,770	-4,454	0,004310	-5,312	-1,545
$p(1)$	0,079	0,029	2,774	0,032226	0,009	0,149

Tabulka 5.6: Experiment 3 - Tabulka odhadů parametrů regresního modelu pro $f=1,927$ GHz, $N=9$, $R_{adj}^2=0,823$. Význam údajů v této tabulce je popsán v kapitole 4.4

Koeficienty	Parametr	SE	t	p	-95% int. spol.	+95% int. spol.
$p(3)$	-448,683	2,603	-172,353	0,000000	-455,053	-442,313
$p(2)$	-1,440	0,442	-3,254	0,017369	-2,523	-0,357
$p(1)$	0,035	0,016	2,135	0,076665	-0,005	0,075

5.2.4 Časový průběh změny fáze při přidání glukózy

Pro ověření, jaká je časová odezva senzoru na skok v koncentraci glukózy ve vzorku (jednorázové přidání isotonického 5% roztoku glukózy) byl na jednom vzorku krve naměřen následující časový průběh (obrázek 5.24)



Obrázek 5.24: Časový průběh změřené fáze φ při zvýšení koncentrace glukózy z 3,6 mmol/l na 25,6 mmol/l v čase $t=55$ min (označeno vertikální čarou)

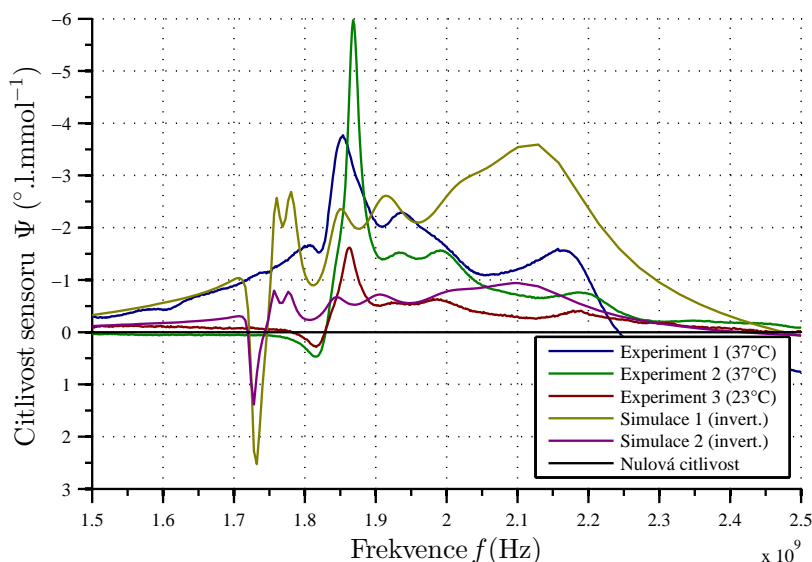
5.3 Porovnání experimentů a simulací

V této kapitole jsou porovnány vybrané výsledky ze simulací a experimentálních měření.

Na obrázku 5.25 je zobrazena citlivost senzoru určena ze 3 různých měření (vzorky z různých prasat) a simulací modelu 1 a 2 pro nejnižší naměřenou/simulovanou koncentraci (koncentrace v rozmezí 3 až 5 mmol/l). Simulace zahrnuté do tohoto grafu jsou invertovány podle vertikální osy, jelikož předpovídají opačný průběh, než který byl při experimentech pozorován. To bylo provedeno kvůli jednoduššímu vizuálnímu porovnání frekvenční závislosti citlivosti. Přehled maximálních citlivostí v předpokládaném frekvenčním pásmu (tj. v oblasti, kde fáze v závislosti na frekvenci nejrychleji klesá) uvádí tabulka 5.7.

Tabulka 5.7: Přehled citlivostí na zvolených frekvencích pro změřená data a simulace. Frekvence jsou zvoleny jako první lokální maximum citlivosti v místě rychlého poklesu fáze s frekvencí

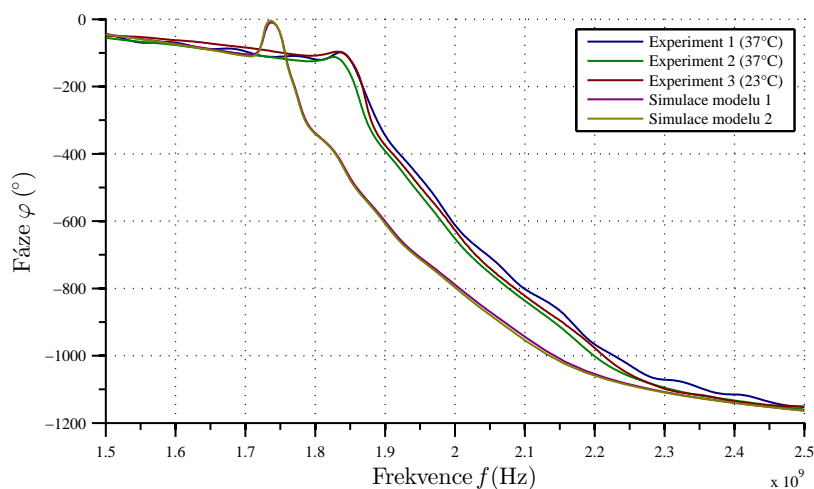
Zdroj dat	Citlivost na zvolené frekvenci ($^{\circ} \cdot \text{l} \cdot \text{mmol}^{-1}$)	Frekvence (GHz)
Experiment 1	-3,77	1,854
Experiment 2	-5,97	1,863
Experiment 3	-1,62	1,868
Simulace 1	3,080	1,761
Simulace 2	0,954	1,757



Obrázek 5.25: Porovnání citlivostí ze všech experimentálních měření a simulací. Citlivosti vycházející ze simulací byly invertovány podle horizontální osy, kvůli možnosti porovnání, protože předpovídají opačný průběh, než měla všechna experimentální měření.

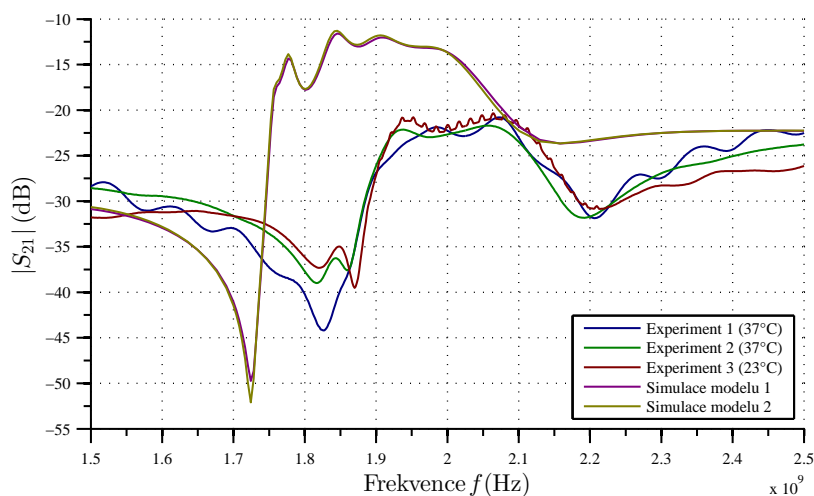
Obrázek 5.26 ukazuje porovnání naměřené a simulované fáze φ ve frekvenčním

pásmu od 1,5 do 2,5 GHz.



Obrázek 5.26: Porovnání změřené a simulované fáze pro frekvence od 1,5 do 2,5 GHz

Obrázek 5.27 ukazuje porovnání naměřené a simulované fáze φ ve frekvenčním pásmu. Data z obou simulací dosáhly vyšší hodnoty přenosu, charakterizovaného $|S_{21}|$ parametrem (přes -15 dB) oproti experimentálnímu měření (do -20 dB).



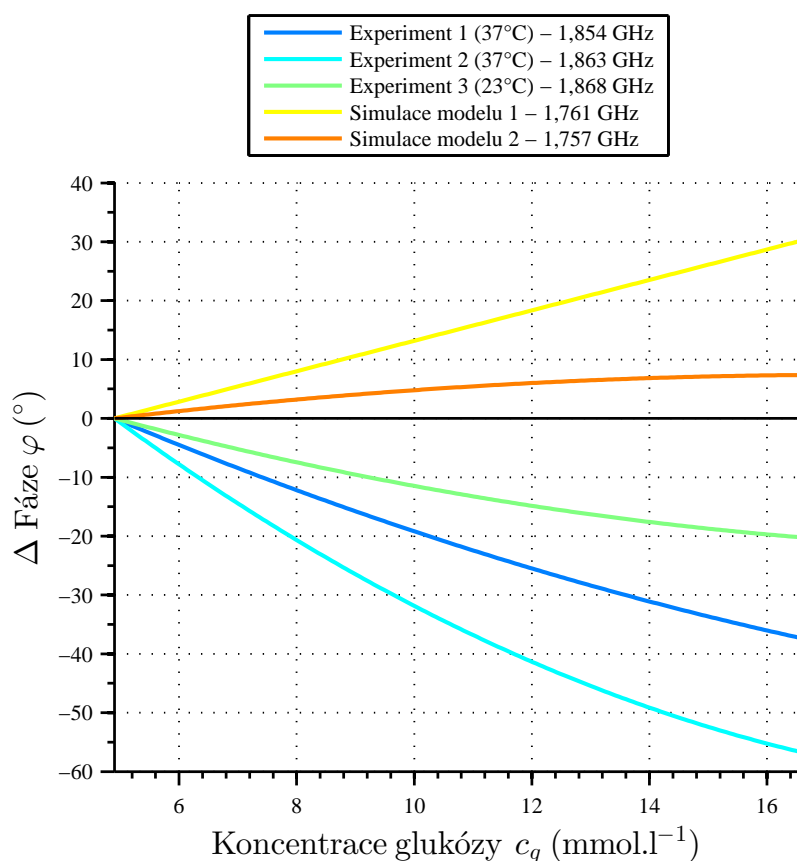
Obrázek 5.27: Porovnání změřených a simulovaných parametrů $|S_{21}|$ pro frekvence od 1,5 do 2,5 GHz

V kapitole 5.1 a 5.2 jsou zobrazeny simulované a měřené průběhy závislosti fáze na koncentraci glukózy pro zvolené frekvence vykazující vysokou citlivost. Data z modelu 1 byla proložena lineární regresní přímkou a ostatní simulace a měření polynomem 2. stupně (kvadratická regrese). Parametry regresních modelů jsou zobrazeny v tabulce 5.8. Na obrázku 5.28 jsou průběhy získané dosazením koeficientů v tabulce 5.8 do rovnice 4.3. Poslední koeficient, který určuje posun ve vertikální ose, byl pro účely vykreslení zvolen jako 0, jelikož je potřeba porovnat průběh změny fáze a ne její absolutní hodnotu, která pro tento účel nemá význam. Pro graf byl zvolen rozsah koncentrací

od 4,8 do 18,6 mmol/l, v němž jsou platné všechny proložené přímky (společný rozsah měření pro všechny experimenty) a nedochází tím tak k extrapolaci dat mimo změřené rozsahy.

Tabulka 5.8: Přehled parametrů regresních přímek na zvolených frekvencích pro změřená data a simulace. Frekvence jsou zvoleny jako první lokální maximum citlivosti v místě rychlého poklesu fáze s frekvencí a jsou označeny ve výsledcích k jednotlivých měření šipkami v grafech

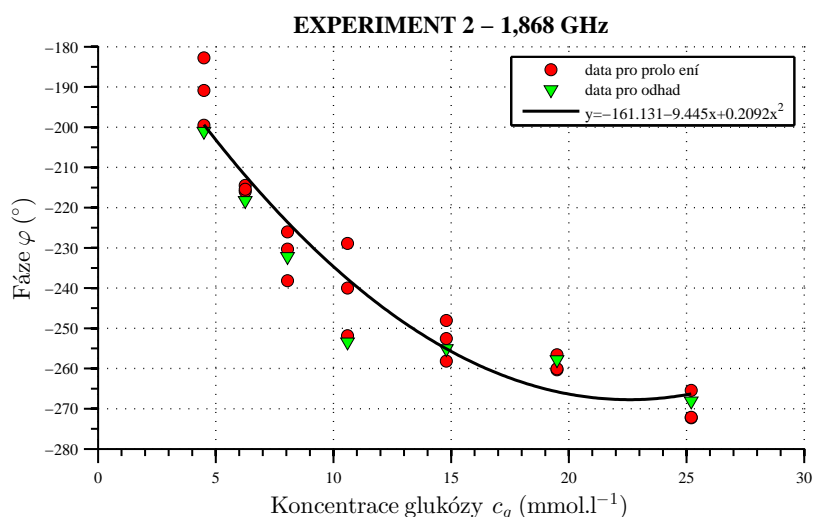
Zdroj dat	$p(1)$	$p(1)$	$p(3)$	Res. součet SS_E	Rozsah c_g (mmol/l)	f (GHz)
Exp. 1	0,086	-5,048	-103,213	1065,50	4,9 - 33	1,854
Exp. 2	0,212	-9,397	-163,157	1595,52	4,5 - 25,2	1,863
Exp. 3	0,079	-3,429	-214,307	39,75	4,8 - 16,6	1,868
Sim. 1	0	2,584	-147,886	5,23	1 - 20	1,761
Sim. 2	-0,047	1,636	-114,212	0,018	1 - 20	1,757



Obrázek 5.28: Proložené průběhy závislosti změn fáze na koncentraci glukózy z měření a simulací. Křivky mají parametry z tabulky 5.8, kde poslední parametr určující posun ve vertikální ose je upraven tak, aby všechny křivky měly počáteční změnu fáze nulovou v koncentraci 4,9 mmol/l pro lepší vizuální porovnání

5.4 Odhad koncentrace glukózy na základě vytvořeného regresního modelu

Odhad byl proveden podle metody v kapitole 4.5 na str. 51. Použity byly pouze data z prvních 3 měření z každé koncentrace. Poslední čtvrté měření nebylo započítáno do regresní analýzy, a proto se předpis funkce kvadratické křivky mírně liší oproti výsledkům v kapitole 5.2.2



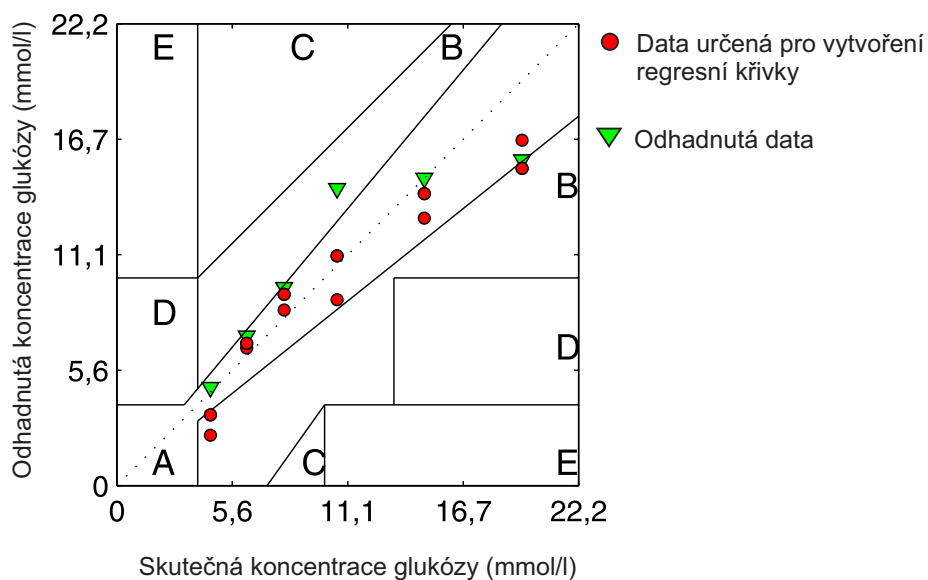
Obrázek 5.29: Data pro odhad neznámé koncentrace glukózy získaná z Experimentu 2 (výsledky v kapitole 5.2.2). Červeně jsou označena data, která byla použita k proložení polynomu a zeleně jsou označena data na kterých byl proveden odhad

Tabulka 5.9: Hodnoty odhadnuté koncentrace glukózy \hat{c}_g , její absolutní chyba $\Delta\hat{c}_g$ a relativní chyba $\delta\hat{c}_g$ vůči skutečné koncentraci naměřené glukometrem c_g

Reál. c_g (mmol/l)	Odhad. \hat{c}_g (mmol/l)	$\Delta\hat{c}_g$ (mmol/l)	$\delta\hat{c}_g$ (%)
4,5	4,51	0,01	0,3
6,25	6,76	0,51	8,2
8,05	10,68	2,63	32,7
10,6	13,86	3,26	30,7
14,8	15,81	1,01	6,8
19,5	16,52	2,98	15,3
25,2	22,57	2,63	10,4

5.5 Clarkova síťová chybová analýza

Pro znázornění přesnosti byla naměřená a odhadnutá data zanesena do Clarkovi EGA (chybová analýza) na obrázku 5.30. Tento graf běžně slouží k vyhodnocení přesnosti glukometrických systému a je teoreticky popsán v kapitole 2.4 na str. 18



Obrázek 5.30: Clarkova chybová analýza. Zobrazena jsou odhadnutá data a ostatní data, která sloužila pro vytvoření regresní křivky. 83 % odhadnutých dat je v zóně A a 17 % v zóně B. Ostatní data se nacházela ze 75 % v zóně A a z 25 % v zóně B.

6 Diskuze

Realizace senzoru

Po vytvoření numerického modelu v programu COMSOL Multiphysics byly provedeny simulace na virtuálních modelech krve. Jako plně dostatečné pro následná experimentální měření se ukázalo frekvenční pásmo v rozsahu 1,5 až 2,5 GHz, které pokrývá všechny zajímavé regiony. Substrát senzoru a jeho pokovení byly vyrobeny externí firmou, kvůli velice malým rozměrům vodičů (např. mezery mezi prsty byly 0,1 mm). Skutečné rozměry byly před experimentálním měření zkontrolovány, avšak, kvůli přítomnosti 0,1 mm krycí vrstvy přes sensorovou část, nemohla být zkontrolována celá geometrie senzoru. Pokud je přítomná odchylka ve vzdálenosti vodičů, může přispět k odlišným výsledkům simulací a experimentálního měření. Jelikož ale tvar závislosti $|S_{21}|$ a fáze φ na frekvenci je velice podobný (kromě posunu ve frekvenční oblasti k nižším frekvencím), dá se předpokládat, že senzor byl vyroben dle návrhu.

Pokovení senzoru se nedostává do kontaktu s měřenou krví, kvůli přítomnosti již zmíněné krycí vrstvy. Ta je stejně jako substrát vyrobena z uhlovodíkového keramického laminátu. K tomuto materiálu nejsou dostupné informace o biokompatibilitě, jelikož není přímo určen pro styk s biologickou tkání. Protože je senzor obecně nejcitlivější v místech blíže samotnému vedení (v tomto případě na krycí vrstvě senzoru okolo vodivých ploch), hydratace, adsorpce proteinů a jiné chemické změny způsobené stykem s krevní plazmou mohou ovlivňovat měření a způsobovat chybu. Při experimentu 1 a 2 byla však krev ve styku se senzorem vždy po krátkou dobu (max. 1 minutu) a mezi každým měřením byla kontaktní plocha opláchnuta destilovanou vodou a mechanicky osušena. To by mělo vliv tohoto jevu omezit.

Manipulace se vzorky

Měření na plné krvi se ukázalo v některých případech jako problematické. Literatura neuvádí, jaký mají různé typy antikoagulantů vliv na dielektrické vlastnosti krve. Kvůli dostupnosti a jednoduché manipulaci byl zvolen citrát sodný, který ovšem krev naředí a způsobí snížení hodnoty HTK. Jelikož váže z krve vápenaté ionty, může být ovlivněna dielektrická odezva krve na koncentraci glukózy. Krev se ale při experimentech ani jednou nesrazila.

Vliv na změny permitivity má také agregace krvinek, např. rouleaux formace popsána již v kapitole 3.4.4 na str. 28 . Jelikož byla používána plná krev, při zastavení průtoku se RBC reverzibilně shlukují a ovlivňují výslednou permitivitu. Toto by se dalo odstranit centrifugací a nahrazením plazmy fyziologickým roztokem (shlukování je ovlivňováno zejména přítomností fibrinogenu a globulinu v plazmě), což nebylo z časových a technických důvodů provedeno. Nalítí krve do krabičky senzoru bylo považováno za dostatečné promíchání krve, i když agregace krvinek nemůže být při tako-

vémto uspořádání experimentu kontrolována v reálném čase. Na druhou stranu byla snaha se vyvarovat nadměrnému míchání a protřepávání vzorků, což by mohlo způsobit hemolýzu.

Výsledky experimentálních měření jsou ovlivněny i hematokritem odebrané krve. Protože byla použita krev celkem ze 3 prasat, hematokrit se v každém měření mohl lišit a obecně je nižší než u člověka. Rozsah HTK u prasete je 23,5-33 % a u člověka 33-47 % u žen a u mužů 39-57 % (viz kapitola 4.3.1 na str. 48). Jelikož je celkový objem RBC nižší, dalo by se očekávat, že při vyšším HTK (v lidské krvi) by se dosáhlo větších změn permitivity a tedy větší změny fáze měřené senzorem.

Porovnání simulací a měření

Model krve 1 vykazuje lineární charakteristiku změny permitivity s koncentrací glukózy, která se v simulaci projevuje jako lineární změna fáze. Model 1 jako jediný vykazoval tento lineární průběh. Model krve 2 a všechny experimentální měření vykazují nelineární závislost. Všechny vypočítané parametry regresních křivek u experimentálního měření dosáhli statistické významnosti ($\alpha_p > p$). Pro všechny experimenty bylo společné, že průběh naměřené fáze je přibližně lineární, až do koncentrace okolo 15 mmol/l. S dále zvyšující se koncentrací nebyly pozorovány výraznější změny měřené fáze. Přítomnost takového zlomového bodu v průběhu naměřené fáze odpovídá závislosti permitivity na koncentraci glukózy u cytoplazmy krvinek (součást modelu 2), jak ukazuje obrázek 4.9 na str. 39.

Pro simulace byly použity modely 1 a 2 popsány v kapitole 4.2.2 a 4.2.3. Simulovaný průběh změny fáze při změně koncentrace glukózy vyšel opačně (tj. zvyšování fáze se zvyšováním koncentrace), než bylo pozorováno u všech experimentálních měření (viz kapitola 5.28). To platilo pro oba použité modely.

Důvod není zřejmý. Jedním z rozdílů mezi experimentálním měřením provedeným v rámci této práce a měřením, na základě něhož byl vytvořen Model 1, je použití prasečí krve. Autoři Modelu 1 použili lidskou krev odebranou do EDTA zkumavek. Ke krvi nebyla přidána glukóza uměle, ale rozdílné koncentrace pocházeli od různých pacientů (zdravých i diabetiků). Není známa teplota, při které měření proběhlo.

Naproti tomu, při vytváření modelu cytoplazmy RBC (hlavní součást Modelu 2), autoři použili jiný postup manipulace s krví. Použily krev zdravých pacientů odebranou do zkumavek s heparinem (68 IU), která byla centrifugována a její plazma nahrazená fosfátovým bufferem (PBS) a měření proběhlo při 25°C. Není tedy jasné, jestli tyto odchylky v metodice přípravy vzorků nebo použití krve jiného druhu, mohlo mít za následek opačný průběh, než modely předpovídají.

Další faktor, který by mohl mít na rozdílný průběh vliv je časová závislost změn dielektrických vlastností. Změna permitivity není způsobena pouhou přítomností glukózy v krevní plazmě, ale odráží celkově vyvolané biochemické změny v krvi včetně přítomnosti všech iontů a meziproductů a jejich interakcí s všudypřítomnou vodou. Kinema-

tika změn permitivity krve v závislosti na koncentraci glukózy není známa.

Proto bylo provedeno měření časové odezvy senzoru na skok v koncentraci glukózy, jehož výsledky jsou na obrázku 5.24 na str. 67. Je vidět, že změna nebyla monotónní. Došlo k rychlému poklesu fáze a po cca 2 minutách se opět začala zvyšovat. Po asi 10 minutách zvyšování fáze se průběh otočil a dalších 30 minut se již fáze snižovala. To značí důležitost znalosti časového průběhu těchto změn, které zatím nikdo nepublikoval. Experiment byl však proveden pouze na 1 vzorku krve, tedy by bylo potřeba dalších měření k vytvoření závěru o tomto pozorování. Nabízí se to však jako jeden z možných důvodů, proč experimenty vyšly jinak než simulace.

Měření 1 a 2 provedené při 37 °C vykazaly vyšší citlivosti senzoru (viz tabulku 5.7 na str.68), než jaké vyšly v simulacích a při experimentu 3 (23 ° C). To naznačuje, že teplota může ovlivňovat nejen samotnou permitivitu krve (což platí pro všechny materiály s obsahem vody) ale také ovlivňovat velikost změny vyvolané přítomností glukózy.

Z obrázku 5.26 na str. 69, je vidět , že pro všechny experimenty měla fáze velice podobnou závislost na frekvenci. Simulace byly podobného průběhu, avšak posunutého k nižším frekvencím.

Na dalším obrázku 5.27 v experimentech změřené $|S_{21}|$ parametry mají podobný průběh, zejména ve frekvenčním pásmu od 1,9 GHz do 2,2 GHz. Maximální dosažená hodnota $|S_{21}|$ byla v experimentech okolo -22 dB, kdežto pro simulace okolo -11 dB. Stejně tak jako u průběhu fáze, byl průběh $|S_{21}|$ parametrů posunut k nižším frekvencím.

Při experimentu 2 se objevilo na frekvenci od cca 1,9 po 2,2 GHz pravidelné rušení pozorovatelné na $|S_{21}|$ parametru. Jeho původ není znám. Mohlo by to být vlivem použití momentového klíče na konektory při kalibraci, který byl však dle vědomí autora práce vždy použit stejně. I přes rušení měl průběh $|S_{21}|$ parametru podobný tvar, jako u všech dalších experimentů. Na blíže analyzované frekvenci 1,933 GHz, která se nacházela v popsáném pásmu, rušení nejspíše způsobilo větší rozptyl některých hodnot naměřené fáze (viz obrázek 5.18)

Odhad koncentrace glukózy

Data zobrazená v 5.29 posloužila k vytvoření kvadratické regresní křivky. Data ze čtvrtého měření nebyla použita do regresní analýzy, aby mohla být následně odhadnuta jejich koncentrace a porovnána s reálně změřenou koncentrací. Tabulka 5.9 ukazuje, že největší relativní chyba, která vznikla při odhadu byla 32,7 %. Po zanesení dat do grafu Clarkovi chybové analýzy je vidět, že se data koncentrují kolem diagonály a jsou pouze v zónách A a B.

Vhodnost použité frekvence

Při všech experimentech byla pozorována frekvenční oblast, vykazující mnohem vyšší citlivost, než ostatní frekvence. Ve všech případech je tato oblast na začátku rychlého poklesu fáze (v grafech označeny šipkou). Na této frekvenci je senzor nejcitlivější na dielektrické změny. Při 2. experimentu byla změna fáze při zvýšení koncentrace z 5 na 18 mmol/l až 60° (počítáno z regresní přímky).

Na druhou stranu na této frekvenci je modul parametru přenosu ($|S_{21}|$) velice malý - přibližně -40, -35 a -38 dB pro experimenty 1,2 a 3. Oproti tomu druhé označené frekvence s citlivostí menší, měly naměřené $|S_{21}|$ parametrů okolo -23, -21 a -22 dB. I když první označené frekvence měly citlivost několikanásobně větší, nízká hodnota přenosu by mohla v budoucnu při vytváření samostatného systému využívající tento typ senzoru být problém.

7 Závěr

V rámci této diplomové práce byl vytvořen model v programu COMSOL multiphysics, který byl následně porovnán s experimentálním měřením. Model obsahoval senzor přiložený k virtuálnímu modelu krve, určující závislost permitivity na koncentraci glukózy. Před vytvořením modelů byl tento senzor již vyroben. Pro simulaci byly použity 2 různé modely krve. Na vyrobeném senzoru byly provedeny celkem 3 série experimentů s použitím prasečí krve. Jak v simulacích, tak i v experimentech byla měřena závislost parametru přenosu S_{21}^* (respektive jeho modulu $|S_{21}|$) a jeho fáze φ na frekvenci od 1,5 GHz do 2,5 GHz a jejich závislost na koncentraci glukózy. U simulací i reálných měření byla pozorována frekvenční oblast s lokální výrazně vyšší citlivostí na změny koncentrace glukózy. U každé simulace a měření byla na těchto zvolených frekvencích provedena regresní analýza pro určení závislosti fáze na koncentraci glukózy. U simulace s použitím Modelu krve 1 byla pozorována lineární závislost. U simulace s použitím Modelu krve 2 byla závislost nelineární. Experimentální měření vykazovala také nelineární charakteristiku a byla proložena kvadratickou křivkou s konfidenčními intervaly. Všechny vypočítané parametry regresních křivek u experimentálního měření dosáhli statistické významnosti ($\alpha_p > p$). Směr průběhu změny fáze byl u simulací opačný, než při experimentálním měření, což bylo diskutováno. Při experimentech se dosáhlo citlivosti (změny fáze na změnu koncentrace glukózy) od $-1,62$ do $-5,97$ °.l.mmol⁻¹. Při simulacích se na zvolených frekvencích dosáhlo citlivosti od $0,9$ do $3,08$ °.l.mmol⁻¹. Data naměřená v experimentu 2 byla použita pro odhad koncentrace glukózy pomocí vytvořeného regresního modelu a výsledky tohoto odhadu byly zpracovány Clarkovou chybovou analýzou, kde 83 % hodnot bylo v zóně A a 17 % bylo v zóně B. Senzor vykázal vysokou citlivost na dielektrické změny krve. Při 2. experimentu byla změna fáze při zvýšení koncentrace z 5 na 18 mmol/l až 60° (počítáno z regresní přímky). S vyšší citlivostí senzoru rostl i rozptyl hodnot (porovnáním experimentálních měření na nejcitlivější frekvenci), což naznačuje, že tyto odchylky byly způsobeny spíše rozdílnou permitivitou vzorků, než jinými externími vlivy rušení. Interpretace naměřených dat se ale zdá obtížná. Velice užitečné by byly informace o kinematice dielektrických změn v závislosti na koncentraci glukózy a agregaci krvinek (např. v závislosti na rychlosti průtoku), nebo vlivu použitého antikoagulantu. Kvůli vysoké citlivosti by se tento typ senzoru dal využít pro velké množství aplikací, kde je potřeba v reálném čase detekovat chemicko-fyzikální změny testovaného materiálu. K ještě výraznějšímu rozšíření možností senzoru pro měření *in vitro* by došlo po nanesení vrstvy schopné specificky vázat analyty, tím ovlivňovat permitivitu této vrstvy, což by bylo následně opět nepřímo měřeno změnou fáze vlny. V další fázi vývoje neinvazivního senzoru glukózy by bylo vhodné provést měření na lidských subjektech, kterým by byla zároveň invazivní cestou měřena glykémie. U měření *in vivo*, by ve větší míře mohly odpadnout neznámé vlivy jako agregace krvinek, působení antikoagulantu, teplotních změn a různého objemu

testovaného vzorku. Na druhou stranu se dá očekávat chyba způsobená proměnlivým tlakem senzoru na měřený subjekt.

Reference

- [1] SO, Chi-Fuk, et al. *Recent advances in noninvasive glucose monitoring*. Medical Devices: Evidence and Research, 2012.
- [2] HAYASHI, Yoshihito, Leonid LIVSHITS, Andreas CADUFF a Yuri FELDMAN. 2003. *Dielectric spectroscopy study of specific glucose influence on human erythrocyte membranes*. Journal of Physics D: Applied Physics. 36(4): 369-374.
- [3] FREER, Benjamin, Jayanti VENKATARAMAN, Johannes NEHRING, Robert WEIGEL, Georg FISCHER a Dietmar KISSINGER. 2010. *Feasibility study for non-invasive blood glucose monitoring: Noninvasive Applications*. 2010 IEEE Antennas and Propagation Society International Symposium [online]. IEEE, 16(4): 1-4
- [4] LEVY, Evgeniya, et al. *Dielectric Response of Cytoplasmic Water and Its Connection to the Vitality of Human Red Blood Cells: I. Glucose Concentration Influence*. The Journal of Physical Chemistry B, 2016, 120.39: 10214-10220.
- [5] BOOTHROYD, Peter, Leonid PHAM, Andreas CADUFF a Yuri FELDMAN. 2003. *Dielectric spectroscopy study of specific glucose influence on human erythrocyte membranes*. Journal of Physics D Applied Physics. 36(4) 369-374.
- [6] LIVSHITS, Leonid, et al. *The role of GLUT1 in the sugar-induced dielectric response of human erythrocytes*. The Journal of Physical Chemistry B, 2009, 113.7: 2212-2220.
- [7] VRBA, Jan, Jakub KARCH, David VRBA, Robert WEIGEL, Georg FISCHER a Dietmar KISSINGER. 2015. *Phantoms for Development of Microwave Sensors for Noninvasive Blood Glucose Monitoring: Noninvasive Applications*. International Journal of Antennas and Propagation [online]. IEEE, 2015(4): 1-5 [cit. 2015-05-18]
- [8] VENKATARAMAN, Jayanti; FREER, Benjamin. *Feasibility of non-invasive blood glucose monitoring: In-vitro measurements and phantom models*. In: Antennas and Propagation (APSURSI), 2011 IEEE International Symposium on. IEEE, 2011. p. 603-606.
- [9] ADHYAPAK, Anoop; SIDLEY, Matthew; VENKATARAMAN, Jayanti. *Analytical model for real time, noninvasive estimation of blood glucose level*. In: Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2014 36th Annual International Conference of the IEEE. IEEE, 2014. p. 5020-5023.
- [10] KARACOLAK, Tutku, Elaine C. MORELAND, Erdem TOPSAKAL a Yuri FELDMAN. 2013. *Cole-cole model for glucose-dependent dielectric properties of blood*

- plasma for continuous glucose monitoring*. Microwave and Optical Technology Letters. 55(5): 1160-1164.
- [11] SMULDERS, Peter F. M., Martin G. BUYSSE, Mingda D. HUANG a Yuri FELDMAN. 2013. *Dielectric properties of glucose solutions in the 0.5–67 GHz range*. Microwave and Optical Technology Letters. 55(8): 1916-1917
- [12] Integrity Applications: GlucoTrack [online]. [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://www.integrity-app.com/pressreleases/glucotrack-maker-presents-scientific-data-demonstrating-reliable-accuracy-and-precision>
- [13] HARMAN-BOEHM, Ilana, et al. *Noninvasive glucose monitoring: increasing accuracy by combination of multi-technology and multi-sensors*. Journal of diabetes science and technology, 2010, 4.3: 583-595.
- [14] Cnoga Medical [online]. [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://cnogacare.co/news/>
- [15] MULEY, Apurva A.; GHONGADE, Rajesh B. *Design and simulate an antenna for aqueous glucose measurement*. In: India Conference (INDICON), 2014 Annual IEEE. IEEE, 2014. p. 1-6.
- [16] FREER, Benjamin; VENKATARAMAN, Jayanti. *Feasibility study for non-invasive blood glucose monitoring*. In: Antennas and Propagation Society International Symposium (APSURSI), 2010 IEEE. IEEE, 2010. p. 1-4.
- [17] GREEN, Eric C. *Design of a microwave sensor for non-invasive determination of blood-glucose concentration*. 2005. PhD Thesis.
- [18] HOFMANN, Maximilian, Georg FISCHER, Robert WEIGEL a Dietmar KISSINGER. 2013. *Microwave-Based Noninvasive Concentration Measurements for Biomedical Applications*. IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques [online]. IEEE, 61(5): 2195-2204
- [19] KIM, Seungwan, Jongchel KIM, Kyoungchul KIM, Jung-Ha LEE, Arsen BABAJANYAN, Barry FRIEDMAN a Kiejin LEE. 2014. *In vitro monitoring of goat-blood glycemia with a microwave biosensor*. Current Applied Physics [online]. IEEE, 14(4): 563-569
- [20] YILMAZ, Tuba, Robert FOSTER, Yang HAO, Jung-Ha LEE, Arsen BABAJANYAN, Barry FRIEDMAN a Kiejin LEE. 2014. *Towards Accurate Dielectric Property Retrieval of Biological Tissues for Blood Glucose Monitoring*. IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques [online]. IEEE, 62(12): 3193-3204

- [21] MELIKYAN, Harutyun, Emma DANIELYAN, Seungwan KIM, Jongchel KIM, Arsen BABAJANYAN, Jungha LEE, Barry FRIEDMAN a Kiejin LEE. 2012. *Non-invasive in vitro sensing of d-glucose in pig blood*. Medical Engineering [online]. IEEE, 34(3): 299-304
- [22] JEAN, B.R., E.C. GREEN a M.J. MCCLUNG. 2008. *A microwave frequency sensor for non-invasive blood-glucose measurement*. 2008 IEEE Sensors Applications Symposium [online]. IEEE, : 4-7
- [23] SIDLEY, Matthew; VENKATARAMAN, Jayanti. *Non-invasive estimation of blood glucose a feasibility study*. In: Applied Electromagnetics Conference (AEMC), 2013 IEEE. IEEE, 2013. p. 1-2.
- [24] CHOI, Heungjae, Jack NYLON, Stephen LUZIO, Jan BEUTLER, Adrian PORCH a Dietmar KISSINGER. 2014. *Design of continuous non-invasive blood glucose monitoring sensor based on a microwave split ring resonator: Noninvasive Applications*. 2014 IEEE MTT-S International Microwave Workshop Series on RF and Wireless Technologies for Biomedical and Healthcare Applications (IMWS-Bio2014) [online]. IEEE, 2015(4): 1-3
- [25] BROWNLEE, Michael. *The pathobiology of diabetic complications*. Diabetes, 2005, 54.6: 1615-1625.
- [26] McMillin JM. Blood Glucose. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 141.
- [27] GIRARDIN, Céline M., et al. *Continuous glucose monitoring: A review of biochemical perspectives and clinical use in type 1 diabetes*. Clinical biochemistry, 2009, 42.3: 136-142.
- [28] DUNGAN, Kathleen, et al. *Glucose measurement: confounding issues in setting targets for inpatient management*. Diabetes care, 2007, 30.2: 403-409.
- [29] ELLISON, John M., et al. *Rapid changes in postprandial blood glucose produce concentration differences at finger, forearm, and thigh sampling sites*. Diabetes Care, 2002, 25.6: 961-964.
- [30] BOYNE, Michael S., et al. *Timing of changes in interstitial and venous blood glucose measured with a continuous subcutaneous glucose sensor*. Diabetes, 2003, 52.11: 2790-2794.
- [31] JUVENILE DIABETES RESEARCH FOUNDATION CONTINUOUS GLUCOSE MONITORING STUDY GROUP, et al. *The effect of continuous glucose monitoring in well-controlled type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2009, 32.8: 1378-1383.

- [32] PEYSER, Thomas, et al. *The artificial pancreas: current status and future prospects in the management of diabetes*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2014, 1311.1: 102-123.
- [33] CLARKE, William L., et al. Evaluating the clinical accuracy of two continuous glucose sensors using Continuous glucose–error grid analysis. Diabetes Care, 2005, 28.10: 2412-2417.
- [34] Clarke error grid. <https://www.mathworks.com/matlabcentral/mlc-downloads/downloads/submissions/20545/versions/10/screenshot.png> [online]. [cit. 2016-11-27].
- [35] RAICU, Valerica; FELDMAN, Yuri. *Dielectric relaxation in biological systems: Physical principles, methods, and applications*. Oxford University Press, USA, 2015.
- [36] MIKLAVČIČ, Damijan; PAVŠELJ, Nataša; HART, Francis X. *Electric properties of tissues*. Wiley encyclopedia of biomedical engineering, 2006.
- [37] MARTINSEN, Orjan G.; GRIMNES, Sverre; SCHWAN, Herman P. *Interface phenomena and dielectric properties of biological tissue*. Encyclopedia of surface and colloid science, 2002, 20: 2643-2653.
- [38] GABRIEL, Sami; LAU, R. W.; GABRIEL, Camelia. *The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues*. Physics in medicine and biology, 1996, 41.11: 2271
- [39] LANGMEIER, Miloš. *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.
- [40] LIVSHITS, L., et al. *Dielectric response of biconcave erythrocyte membranes to D-and L-glucose*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2006, 40.1: 15.
- [41] COLELLA, L., et al. *Microelectrode-based dielectric spectroscopy of glucose effect on erythrocytes*. Bioelectrochemistry, 2012, 85: 14-20.
- [42] PUZENKO, Alexander, et al. *Dielectric spectra broadening as a signature for dipole-matrix interaction. III. Water in adenosine monophosphate adenosine-5-triphosphate solutions*. The Journal of chemical physics, 2012, 137.19: 194502.
- [43] LEVY, Evgeniya, et al. *Dielectric spectra broadening as the signature of dipole-matrix interaction. I. Water in nonionic solutions*. The Journal of chemical physics, 2012, 136.11: 114502.
- [44] LEVY, Evgeniya, et al. *Dielectric spectra broadening as the signature of dipole-matrix interaction. II. Water in ionic solutions*. The Journal of chemical physics, 2012, 136.11: 114503.

- [45] HAYASHI, Y., et al. *Dielectric inspection of erythrocytes*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2010, 356.11: 757-762.
- [46] "Hematocrit."Merriam-Webster.com. Accessed February 9, 2017. <https://www.merriam-webster.com/dictionary/hematocrit>. [online]. [cit. 2016-11-28].
- [47] GUARIN, Gustavo, Maximilian HOFMANN, Johannes NEHRING, Robert WEIGEL, Georg FISCHER a Dietmar KISSINGER. 2015. *Miniature Microwave Biosensors: Noninvasive Applications*. IEEE Microwave Magazine [online]. 16(4): 71-86
- [48] VNA measurement . Dostupné z: <http://www.av.it.pt/medidas/data/Manuais>[online]. [cit. 2017-04-16]
- [49] LAI, Anthony; ITOH, Tatsuo; CALOZ, Christophe. *Composite right/left-handed transmission line metamaterials*. IEEE microwave magazine, 2004, 5.3: 34-50.
- [50] PUENTES, Margarita, et al. *Metamaterials in microwave sensing applications*. In: Sensors, 2010 IEEE. IEEE, 2010. p. 2166-2171.
- [51] DAMM, C., et al. *Artificial transmission lines for high sensitive microwave sensors*. In: Sensors, 2009 IEEE. IEEE, 2009. p. 755-758.
- [52] LAI, Anthony. *Left-handed metamaterials for microwave Engineering applications*. Departement of Electrical Engineering UCLA, 2009.
- [53] VRBA, D.; VRBA, J. A *Microwave Metamaterial Inspired Sensor for Non-Invasive Blood Glucose Monitoring*. Radioengineering, 2015.
- [54] KRASZEWSKI, A. *Prediction of the dielectric properties of two-phase mixtures*. Journal of Microwave Power, 1977, 12.3: 216-222.
- [55] TISSUE PROPERTIES: Tissue Frequency Chart. ITIS Foundation [online]. [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <https://www.itis.ethz.ch/virtual-population/tissue-properties/database/tissue-frequency-chart/>
- [56] FELÍCIO, João M.; FERNANDES, Carlos A.; COSTA, Jorge R. *Complex permittivity and anisotropy measurement of 3D-printed PLA at microwaves and millimeter-waves*. In: Applied Electromagnetics and Communications (ICECOM), 2016 22nd International Conference on. IEEE, 2016. p. 1-6.
- [57] MULTIPHYSICS, COMSOL. COMSOL multiphysics user guide (Version 4.3 a). COMSOL, AB, 2012, 39-40.
- [58] SWINDLE, M. M., et al. *Swine as models in biomedical research and toxicology testing*. Veterinary pathology, 2012, 49.2: 344-356.

- [59] JACKSON, P. G. G.; COCKCROFT, P. D. *Appendix 3: Laboratory reference values: Biochemistry*. Clinical Examination of Farm Animals. Malden, MA: Wiley-Blackwell, 2002, 303-305.
- [60] Glukóza [online]. [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: <http://www.toplekar.cz/laboratorni-hodnoty/glukoza.html>
- [61] HANNON, John P.; BOSSONE, C. A.; WADE, C. E. *Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research*. Laboratory animal science, 1990, 40.3: 293-298.
- [62] KING, G. J.; WILLOUGHBY, R. A.; HACKER, R. R. *Fluctuations in rectal temperature of swine at parturition*. The Canadian Veterinary Journal, 1972, 13.3: 72.
- [63] Glukóza 5% Viaflo [online]. [cit. 2017-04-21] http://www.baxter.cz/pro_odborniky_ve_zdravotnictvi/infuzni_terapie/glukoza_5_Viaflo/index.html].
- [64] LEPŠ, Jan a Petr ŠMILAUER. *Biostatistika*. České Budějovice: Nakladatelství Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 2016. Natura. ISBN 9788073945879.

A Obsah příloženého CD

Formát pdf:

- Abstrakt česky
- Abstrakt anglicky
- Klíčová slova česky i anglicky
- Zadání diplomové práce
- Kompletní diplomová práce

Ostatní:

- COMSOL modely včetně MATLAB funkcí k výpočtu permitivity a vodivosti modelu 1 a 2