



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ
FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra biomedicínské techniky

**In vitro měření koncentrace glukózy v krvi
pomocí MTM senzoru**

**In Vitro Measurement of Blood-Glucose
Concentration With MTM Sensor**

Bakalářská práce

Studijní program:	Biomedicínská a klinická technika
Studijní obor:	Biomedicínský technik
Autor práce:	David Štěrba
Vedoucí práce:	doc. Dr. Ing. Jan Vrba, M.Sc.

Kladno 2018

Katedra biomedicínské techniky

Akademický rok: 2017/2018

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **David Štěřba**
Obor: Biomedicínský technik
Téma: **In vitro měření koncentrace glukózy v krvi pomocí MTM senzoru**
Téma anglicky: In Vitro Measurement of Blood-Glucose Concentration With MTM Sensor

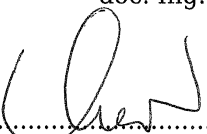
Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

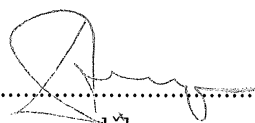
Sestavte vhodnou metodiku přípravy vzorků prasečí krve-glukóza o různých koncentracích. Připravte odpovídající koncentrační řadu. Provedte měření koeficientu přenosu S21 pro vzorky prasečí krev-glukóza pomocí MTM senzoru pro minimálně 7 různých koncentrací v rozsahu od minimální možné koncentrace do cca. 25 mmol/l. Pro každou koncentraci provedte minimálně 3 měření. Vyhodnoťte závislosti změny fáze S21 na koncentraci glukózy v krvi. Experimentální data vynesete do grafu, ve kterém naměřená data doplňte o regresní analýzu a interval spolehlivosti. Provedte Clarkovu síťovou chybovou analýzu. Dále provedte měření časové změny S21 pro vzorky krve, do kterých přidáte různé koncentrace glukózy.

Seznam odborné literatury:

- [1] D. M. Pozar, Microwave Engineering, ed. 3, Wiley John + Sons, 2004, ISBN 0471448788
[2] Schueler, M., Mandel, C., Puentes, M., Jakoby, R., Metamaterial Inspired Microwave Sensors, IEEE Microwave Magazine, ročník 2, číslo 13, 2012, 57-68 s.

Zadání platné do: 20.09.2019
Vedoucí: doc. Dr.-Ing. Jan Vrba, M.Sc.
Konzultant: doc. Ing. David Vrba, Ph.D.


.....
vedoucí katedry / pracoviště


.....
děkan

V Kladně dne 19.02.2018

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „In vitro měření koncentrace glukózy v krvi pomocí MTM senzoru“ vypracoval samostatně a použil k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k tomuto textu. 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 18. 5. 2018

David Štěrba

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval mému vedoucímu práce doc. Dr. Ing. Janu Vrbovi, MSc. za skvělé vedení, připomínky, rady, poskytnutí odborné literatury a pomoci při experimentech, Ing. Strnadové za pomoc, připomínky a poskytnutí přístrojů a prostor pro přípravu krve na měření. Také bych rád poděkoval své rodině za veškerou podporu, své přítelkyni Ing. Lucii Roškotové a kamarádovi Ing. Pavlu Spurnému za motivaci a psychickou podporu. Bez těchto lidí by nemohla tato práce vzniknout.

ABSTRAKT

In vitro měření koncentrace glukózy v krvi pomocí MTM senzoru

Koncentrace glukózy v krvi ovlivňuje dielektrické vlastnosti, které krev vykazuje. Toho je možné využít pro neinvazivní měření glykémie pomocí mikrovlnných senzorů. Tato bakalářská práce se zabývá měřením parametru přenosu S_{21} a jeho změny v závislosti na koncentraci glukózy. Měření proběhlo na plné krvi a roztocích izolovaných červených krvinek s PBS a glukózou. Koncentrace glukózy ve vzorcích se pohybovala od nejnižší možné až do 25 mmol/l. Pro měření roztoků s izolovanými krvinkami byl vytvořen systém pro udržení konstantní teploty vzorku a možností oběhu vzorku v měřící cele. Naměřená data byla doplněna regresní analýzou a podle rovnice regresní křivky byly odhadnuty koncentrace glukózy ve vzorku. Odhady byly aplikovány do Clarkovy chybové síťové analýzy. Z této analýzy vyšlo, že měření plné krve bylo přesnější. Však výsledky měření roztoků izolovaných erytrocytů, PBS a glukózy více odpovídají modelům krve, které byly provedeny dříve.

Klíčová slova

Neinvazivní měření glukózy, mikrovlnný senzor, metamateriálový senzor

ABSTRACT

In Vitro Measurement of Blood-Glucose Concentration With MTM Sensor

The blood glucose concentration affects the dielectric properties that blood shows. This can be used for non-invasive blood glucose measurement using microwave sensors. This bachelor thesis deals with the measurement of the transfer parameter S_{21} and its changes in relation to the glucose concentration. Measurements were performed on whole blood and solutions of isolated red blood cells with PBS and glucose. The glucose concentration in the samples ranged from the lowest possible up to 25 mmol/l. For the measurement of isolated blood cells, a system was developed to maintain a constant sample temperature and sample circulation in the measuring cell. The measured data was supplemented by regression analysis and the glucose concentration in the sample was estimated according to the regression curve equation. Estimates were applied to Clark's error grid analysis. This analysis showed that the measurement of whole blood was more accurate. However, the results of measurements of isolated erythrocytes, PBS and glucose solutions more closely correspond to those of the blood that were performed earlier.

Key words

Non-invasive glucose measurement, microwave sensor, metamaterial sensor

Obsah

Úvod	14
Přehled současného stavu	14
Cíle práce	16
2 Teoretický základ	17
2.1 Klinické stanovování hladiny glukózy	17
2.2 Kontinuální stanovování hladiny glukózy	18
2.3 Stanovení přesnosti glukometru	18
2.4 Biologické materiály v elektrickém poli	20
2.4.1 Permittivita tkání	20
2.5 Dielektrické vlastnosti erytrocytů	22
2.5.1 Regulace přenosu glukózy do erytrocytů	23
2.5.2 Dielektrické vlastnosti v GHz frekvencí	23
2.5.3 Dielektrické vlastnosti cytoplazmy erytrocytů	23
2.5.4 Efekt morfologie	24
2.5.5 Agregace erytrocytů	24
2.6 Princip mikrovlnných senzorů	25
2.7 Princip metamateriálových senzorů	25
3 Metody	27
3.1 Odběr krve	27
3.2 Měření plné krve	28
3.2.1 Příprava roztoků glukózy	28
3.2.2 Měření parametru přenosu S_{21}	28
3.2.3 Měření časové odezvy parametru S_{21}	29
3.3 Měření roztoků krvinek, PBS a glukózy	29
3.3.1 Měřicí sestava	30
3.3.2 Úprava krve a příprava vzorků	31
3.3.3 Průběh měření	32
3.4 Zpracování dat	34

4	Výsledky	35
4.1	Měření plné krve	35
4.1.1	Měření parametru přenosu S_{21}	35
4.1.2	Měření časové odezvy parametru S_{21}	37
4.2	Měření roztoků krvinek, PBS a glukózy	40
4.2.1	Měření parametru přenosu S_{21}	40
4.2.2	Měření časové odezvy parametru S_{21}	42
5	Diskuze	43
5.1	Manipulace se vzorky	43
5.2	Měření plné krve	43
5.3	Měření izolovaných krvinek	44
	Závěr	46
A	Výkresy měřicí sestavy	51
B	Grafy závislosti fáze φ na frekvenci f pro různé koncentrace	53

Seznam symbolů a zkratk

Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
S_{21}	—	S parametr přenosu
E	$V \cdot m$	Amplituda elektrického pole
ε_0	$8,85 \cdot 10^{-12} F \cdot m^{-1}$	Permitivita vakua
ε_r	—	Relativní permitivita
D	$C \cdot m^{-1}$	Elektrická indukce
*	—	Komplexní charakter
,	—	Reálná část komplexní vel.
”	—	Imaginární část komplexní vel.
σ	$S \cdot m$	Statická vodivost
ω	$rad \cdot s^{-1}$	Úhlová frekvence
τ	s	Relaxační časová konstanta
α	—	Parametr popisující rozšíření disperze
j	$j = \sqrt{-1}$	Imaginární jednotka
$c_{g,luk}$	mmol/l	koncentrace glukózy
$ S_{21} $	dB	Modul S parametru přenosu
φ	°	Fáze S parametru přenosu
μ	$H \cdot m^{-1}$	Permeabilita
n	—	Index lomu
Φ	$^{\circ} \cdot l \cdot mmol^{-1}$	Citlivost senzoru na změnu koncentrace

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
MTM	Metamateriál
DM	Diabetes mellitus
NIR	Blízké infračervené záření (z angl. Near-Infrared)
ATP	Adenosin trifosfát
ADP	Adenosin difosfát
AMP	Adenosin monofosfát
GD	glukóza-1-dehydrogenáza
CGM	Kontinuální monitorování glukózy (z angl. Continuous Glucose Monitoring)
EGA	Síťová chybová analýza (z angl. Error Grid Analysis)
RBC	Červené krvinky (z angl. Red Blood Cells)
GLUT1	Membránový přenašeč glukózy červených krvinek
ESR	Vyšetření sedimentace krvinek (z angl. Erythrocyte Sedimentation Rate)
LH	Levotočivé vedení (z angl. Left-handed)
RH	Pravotočivé vedení (z angl. Right-handed)
CRLH	Kompozit pravo a levotočivého vedení (z angl. Composite Right-Left Handed)
PBS	Fosfátový fyziologický roztok (z angl. Phosphate Buffered Saline)

Seznam obrázků

2.1	Rozdělení grafu Clarkovy chybové analýzy	19
2.2	Ukázka vyhodnocení výsledků EGA	19
2.3	Závislost komplexní permitivity na frekvenci	22
2.4	Různé tvary erytrocytů	24
2.5	S-parametry dvouportového senzoru	26
2.6	El. model LH, RH a CRLH vedení	26
3.1	Senzor	27
3.2	Sestava pro měření plné krve	28
3.3	Sestava v SolidWorks	30
3.4	Vnitřní rozložení sestavy	31
3.5	Sestava pro ohřev vzorků	31
3.6	Zapojená sestava ohřevu	32
3.7	Detail zapojené sestavy	33
4.1	Změna změřené fáze φ při změně koncentrace glukózy	35
4.2	Závislost změřené fáze na frekvenci	35
4.3	Závislost změřené fáze φ S_2^*1 parametru na frekvenci $f = 1,862$ GHz	36
4.4	Graf Clarkovy chybové síťové analýzy plné krve	36
4.5	Změna změřené fáze φ z první a poslední minuty roztoku 2	37
4.6	Závislost změřené fáze na čase roztoku 2	37
4.7	Vývoj koncentrace glukózy v čase roztoku 2	38
4.8	Změna změřené fáze φ z první a poslední minuty roztoku 6	38
4.9	Závislost změřené fáze na čase roztoku 6	39
4.10	Vývoj koncentrace glukózy v čase roztoku 6	39
4.11	Citlivost senzoru.	40
4.12	Závislost zprůměrované změřené fáze φ na frekvenci f	40
4.13	Závislost změřené fáze φ S_2^*1 parametru na koncentraci glukózy	41
4.14	Graf Clarkovy chybové síťové analýzy izolovaných krvinek	41
4.15	Změna změřené fáze φ z první a poslední minuty vzorku 4	42
4.16	Závislost změřené fáze na čase devíti vzorků	42
A.1	Výkres sestavy – boční stěny	51
A.2	Výkres sestavy – horní podstava	51

A.3	Výkres sestavy – dolní podstava	52
A.4	Výkres sestavy – díl pro upevnění senzoru	52
B.1	Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro $c = 0$ mmol/l	53
B.2	Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro $c = 2$ mmol/l	53
B.3	Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro $c = 4$ mmol/l	54
B.4	Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro $c = 6$ mmol/l	54
B.5	Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro $c = 8$ mmol/l	55
B.6	Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro $c = 10$ mmol/l	55
B.7	Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro $c = 12$ mmol/l	56
B.8	Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro $c = 14$ mmol/l	56
B.9	Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro $c = 16$ mmol/l	57
B.10	Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro $c = 18$ mmol/l	57

Seznam tabulek

3.1	Navážky zásobních roztoků glukózy	29
3.2	Naměřené hodnoty glykemie vzorků	29
3.3	Tabulka objemů a koncentrací roztoků smíchaných glukózy s PBS . .	33

Úvod

Podle Světové zdravotnické organizace v roce 2014 trpělo onemocněním Diabetes mellitus (zkr. DM) asi 8,5 % světové populace [1], přičemž většina postižených je z ekonomicky vyspělých států. To je také důvod, proč se DM považuje za civilizační chorobu. Dá se předpokládat, že procento lidí postižených touto nemocí se bude v budoucnu dále zvyšovat [2], dokud nebude vyvinuta dostupná a efektivní léčba. Do té doby je potřeba snaha pacientům s DM minimalizovat rizika spojená s tímto onemocněním a zvýšit jejich osobní komfort.

DM je chronické onemocnění způsobené nedostatečnou produkcí inzulínu slinivkou břišní a/nebo nedostačující účinností vlastního produkovaného inzulínu. Tyto projevy mají za následek nárůst hladiny glukózy v krvi, která při vychýlení z normálních hodnot dále poškozuje a ohrožuje správnou funkci mnoho orgánů a systémů v těle, převážně pak cévní a nervový systém. Aby pacienti předcházeli nefyziologickým a nebezpečným hodnotám koncentrace glukózy, je vyžadováno její měření několikrát denně.

V současné době je standardní metodou pro stanovení glukózy v krvi enzymatická reakce vzorku s glukooxidázou za vzniku kyseliny glukonové a peroxidu vodíku, následné odečtení změny proudu mezi elektrodami na testovacím proužku nebo po reakci s kyslíkem v kolorimetrickém zobrazení. Tato metoda vyžaduje před každým měřením nový vpich pro odebrání kapky kapilární krve, což je pro pacienta namáhavé a přináší různá rizika, jako například poškození tkáně či riziko infekce v místě vpichu. S touto metodou není možné kontinuální a on-line měření glykémie, které by výrazně eliminovalo výkyvy glykémie mimo normální interval hodnot.

Přehled současného stavu

Senzory pracující na principu mikrovlnného měření dielektrických vlastností biomateriálů mohou být budoucím řešením a perspektivní, jednoduchou a účinnou metodou ve stanovování glukózy v krvi. Hlavní výhody takových senzorů jsou neinvazivnost měření a možnost kontinuálního sledování glykémie a tím i včasné upravení hladiny glukózy v pacientově krvi.

V současné době je na trhu několik glukometrů, které umožňují neinvazivní sta-

novení koncentrace glukózy, využívající různé technologie a principy měření. Jedním z nich je systém GlucoTrack firmy Integrity Applications. Tento systém je určen pro pacienty s pre-diabetem a s diabetem II. typu. GlucoTrack používá tři na sobě nezávislé principy měření. Jsou to ultrazvukové, elektromagnetické a stanovení měřením teploty. Hodnoty jsou pomocí algoritmu zkombinovány a na jejich základě je vypočítána výsledná koncentrace glukózy pacientovy krve [3].

Dalším komerčně dostupným přístrojem je Combo Glucometer od firmy Cnoga Medical. Tento glukometr využívá NIR (z angl. Near Infrared) spektroskopii a je určen pro pacienty s diabetem I. a II. typu [4].

Neinvasivní stanovení hladiny glukózy také umožňuje systém GlucoWise od firmy MediWise. Systém využívá k měření rádiové vlny s nízkým výkonem. Výrobce neuvádí frekvenci používaného elektromagnetického záření [5].

Ač jsou tyto systémy neinvasivní a pacientům přinášejí nový, přijatelnější způsob stanovení koncentrace glukózy v krvi, žádný z těchto systémů nepodporuje automatické kontinuální měření.

V [6], [7] bylo potvrzeno, že glukóza resp. D-glukóza mění dielektrické vlastnosti buněčné stěny a cytoplazmy v červených krvinkách [8].

Několik odborných prací [9], [10], [11] se zabývalo modelováním a navržením mikropáskových senzorů pracujících jako rezonátory. V práci [9] byly simulovány prstencový rezonátor, jednospirálový a dvouspirálový rezonátor. Sensory však nebyly realizovány a otestovány v praxi. V [10] byla navržena monopólová anténa a simulována její změna rezonanční frekvence. V dizertační práci [11] bylo simulováno 6 mikropáskových rezonátorů a realizovaný jeden jednospirálový senzor. V práci [12], která využívá výsledků [10], byla *in vivo* zkoumána proveditelnost mikropáskového senzoru. Bylo zjištěno, že jednospirálový rezonátor vykazuje významný vliv změny v odezvě odpovídající změnám naměřených hodnot hladiny glukózy v krvi testovaných subjektů. Rezonátor byl umístován na palec měřené osoby.

Zmíněné práce využívaly mikropáskové senzory, které mění svou rezonanční frekvenci při změně koncentrace glukózy.

V žádné z prací nebylo využito senzoru s metamateriálovým principem a nebyla také měřena změna fáze parametru S_{21}^* . Metamateriálový senzor by měl vykazovat několikrát vyšší citlivost než používané mikropáskové senzory. Tato práce využívá

právě tento typ senzorů.

Cíle práce

Cíle bakalářské práce jsou nejprve navržení vhodné metodiky přípravy vzorků prasečí krve smíchané s roztoky glukózy o různých koncentracích. Rozsah koncentrací glukózy ve vzorcích je do nejnižší možné až do cca 25 mmol/l. Měření proběhne pomocí metamateriálového senzoru. Dalším cílem je experimentálně zjistit závislost změny fáze S_{21}^* na koncentraci glukózy ve vzorcích. Získaná data budou vynesena do grafu a doplněna o regresní analýzu s intervalem spolehlivosti. Data budou také vyhodnocena pomocí Clarkovy síťové chybové analýzy. Do cílů bakalářské práce také patří proměření časové změny S_{21}^* parametru pro vzorky krve s různými koncentracemi glukózy.

2 Teoretický základ

D-glukóza je nejvýznamnější uhlovodíková sloučenina pro fungování organismu. Využití má především jako zdrojem energie pro lidské tělo. Některé buňky (např.: nervové buňky, erytrocyty) vyžadují zdroj energie pouze glukózu, která je hlavní výchozí látkou pro vytvoření ATP. Hladina glukóza v krvi se nazývá *glykémie* či *glukosemie*. Fyziologické rozmezí hodnot *glykémie* pro zdravého člověka na lačno se pohybují okolo 4,4-6,7 mmol/l, přičemž v arteriálním oběhu je koncentrace vyšší než ve venózní krvi, v kapilární krvi je střední koncentrace mezi arteriální a žilní [13]. Pokud hladina glukózy klesne pod toto rozmezí nastává *hypoglykémie* a pokud je vyšší než toto rozmezí jedná se o *hyperglykémii*.

Hypoglykémie může přerůst ve stav tzv. hypoglykemického šoku, kdy dochází k poruchám funkce mozku a nervového systému. Při hyperglykémii dochází k poškození některých tkání jako jsou kapilární endotelové buňky v sítnici, mesangiální buňky v ledvinových glomerulech, neurony a Schwannovy buňky u periferních nervů [14].

2.1 Klinické stanovování hladiny glukózy

Existují tři základní přístupy k měření koncentrace glukózy, těmi jsou redukční, kondenzační a enzymatické metody. Redukční metody jsou nejstarší a využívají redukčních vlastností glukózy ke změně iontů kovů při oxidaci glukózy. Nevýhoda těchto metod je, že jsou nespecifické a použitá redukční činidla mohou křížově reagovat a interagovat s jinými sloučeninami. To vede k chybnému stanovení hladiny glukózy ve vzorku. Od této metody se v klinické praxi opouští [13].

Aldehydová skupina glukózy může být kondenzována aromatickými sloučeninami. Pro kondenzaci se používá reakce *o*-toluidinu s glukózou za vytvoření glukosaminu, který má intenzivní zelené zbarvení. Reakce je rychlá a intenzivní barva umožňuje vysokou citlivost stanovení. Nevýhodou však je toxicita *o*-toluidinu a jeho vysoká korozivnost. Proto se metoda rychle přestala využívat [13].

Nejrozšířenější metodou je metoda pomocí enzymatické reakce glukózy. Měření je založeno na jednom ze tří enzymů: glukózooxidáza, glukóza-1-dehydrogenáza (GD) nebo hexokináza. Vyhodnocení probíhá buď kolorimetricky nebo amperometricky. Kolorimetrická detekce využívá glukózooxidázu, kdy vzniklý peroxid vodíku rea-

guje s různými donory vodíku za vzniku změny barvy, která odpovídá koncentraci glukózy. Detekce je prováděna pomocí odrazného fotometru, který převádí odražené světlo na elektrický signál. Amperometrická detekce je založena na glukózooxidázové nebo GD reakci, kdy je měřen vzniklý elektrický proud z reakce za vzniku kyseliny glutamové a peroxidu vodíku [15]. Tato metoda se také pomohla rozšíření glukometrů pro domácí měření koncentrace glukózy a kapesních glukometrů [8].

Testy glykovaného hemoglobinu A1c umožňují kontrolu glykemie u diabetiků [13] [16]. Testy ukazují průměrnou glykémii během předchozích 8 až 12 týdnů [17].

2.2 Kontinuální stanovování hladiny glukózy

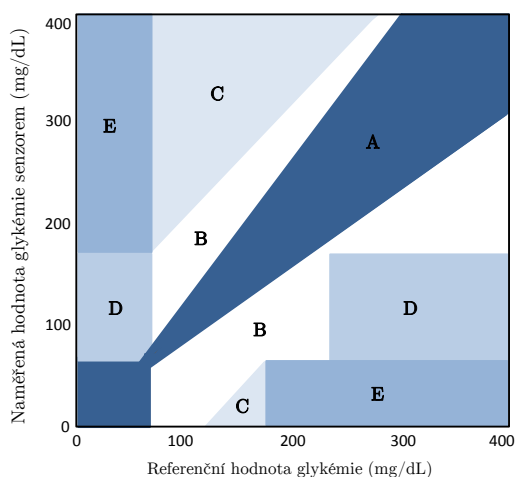
Pro udržení správného managementu léčby DM by si měli pacienti kontrolovat glykémii alespoň čtyřikrát denně (před každým jídlem a před spaním) glukometrem anebo pokud cítí příznaky hypoglykémie, jsou nemocní nebo mají vyšší aktivitu (sport, řízení auta atd.). Tato doporučení ale mnozí nedodržují. Velkou nevýhodou takového řízení hladiny glukózy je, že poskytuje pouze izolované hodnoty, které neodrážejí denní a noční výkyvy. Větší krátkodobé odchylky mohou být nebezpečné a přejít v hyperglykémii či hypoglykémii. Metoda je navíc invazivní, bolestivá a časově náročná [8].

Kontinuální monitorování glukózy (CGM z angl. continuous glucose monitoring) dokáže nevýhody zmíněného řízení glykémie odstranit. Hlavně zobrazuje hladinu glukózy v reálném čase. CGM systémy lze zkombinovat s insulinovou pumpou a tím vytvořit systém, který by nahrazoval funkci slinivky v produkci insulinu. CGM, která jsou komerčně dostupná, pracují se senzory měřící v intersticiální tekutině pomocí impedanční spektroskopie a enzymatického stanovení [17].

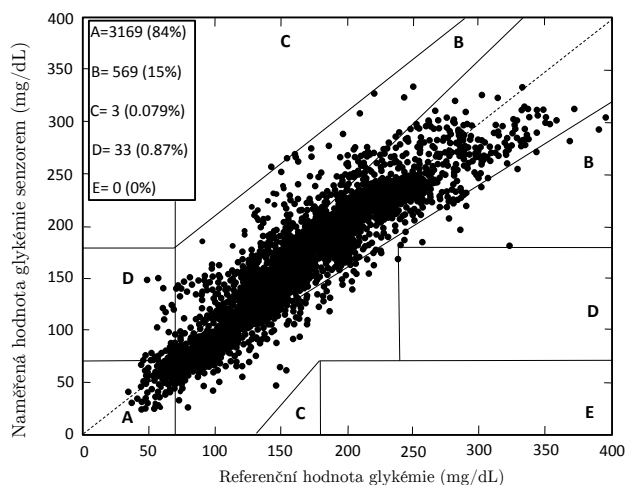
2.3 Stanovení přesnosti glukometru

Pro vyhodnocení správného měření a přesnosti glukometrů se využívá Clarkova chybová síťová analýza (EGA z angl. Error Grid Analysis) Metoda je považována za zlatý standard pro stanovení přesnosti glukometrů a má velký klinický význam. Vyhodnocuje se rozdíl mezi testovanou metodou měření glukózy a referenčními měřeními glukózy v krvi [18]. Výsledný graf je rozdělen do pěti zón: A, B, C, D a E. Zóna A představuje hodnoty glykémie, které se od referenčních hodnot odchylují o 20

% nebo jsou v hypoglykemickém rozmezí (<70 mg/dl $\approx 3,9$ mmol/l), pokud jsou referenční hodnoty také v tomto rozmezí. Hodnoty v této zóně jsou klinicky správně a indikují vhodně zvolenou léčbu. Zóna B zahrnuje hodnoty s odchylkou větší než 20 %, ale neindikují nevhodnou léčbu. V zóně C jsou hodnoty, které vedou k nadbytečné léčbě a v zónách D a E jsou hodnoty, které selhávají v určení hypoglykémie a hyperglykémie a léčba podle těchto hodnot bude s velkou pravděpodobností nebezpečná. Hodnoty spadající do zón A a B jsou klinicky přijatelné [19].



Obrázek 2.1: Rozdělení grafu na zóny A–E Clarkovy chybové analýzy. Převzato a upraveno [18].



Obrázek 2.2: Ukázka vyhodnocení výsledků Clarkovou chybovou analýzou. Převzato a upraveno [20].

2.4 Biologické materiály v elektrickém poli

Materiály rozdělujeme dle jejich schopnosti vést elektrický proud na elektricky vodivé a nevodivé. V elektrickém vodiči se nabitě částice mohou pohybovat volně materiálem podle vnějšího pole E_0 . V dielektrických materiálech je elektrický náboj vázán a nemůže se volně pohybovat. V nepolárních molekulách se těžiště hustot rozložení kladných a záporných nábojů nacházejí ve stejném místě. Bez přítomnosti externího elektrického pole tak nevykazují dipólový moment. Ten vzniká až působením externího elektrického pole, kdy se výše zmíněná těžiště posunou ve vzájemně opačných směrech. V polárních molekulách je těžiště hustoty rozložení kladných a záporných nábojů vzájemně prostorově posunuté a i bez přítomnosti externího elektrického pole vykazují elektrický dipólový moment p . Při působení externího elektrického pole E_0 nastává polarizace dielektrika. Tento jev spočívá v orientaci elektrických dipólů atomů a molekul vystavených tomuto elektrickému poli tak, že vytváří pole E_p , které má opačný směr na aplikované pole. V látkách s heterogenní strukturou mohou být náboje zachyceny na rozhraní dvou prostředí. Jelikož se kladné a záporné náboje pohybují opačným směrem, tak rozhraní, kde jsou náboje zadrženy, vytváří elektrický dipól [26].

2.4.1 Permittivita tkání

Biologické materiály se chovají jako neideální dielektrika. Mají schopnost se polarizovat a zároveň vedou elektrický proud. Pak tedy existuje pole E uvnitř materiálu, které je nižší než pole aplikované. Toto snížení je definováno jako relativní permittivita ε_r či dielektrická konstanta, podle

$$E = \frac{E_0}{\varepsilon_r}. \quad (2.1)$$

V makroskopickém měřítku je permittivita charakterizována jako schopnost látky polarizovat se [27]. Permittivita vakua ε_0 je přibližně $8,85 \cdot 10^{-12} \text{ F} \cdot \text{m}^{-1}$, pro ostatní materiály je rovna podle rovnice [26]

$$\varepsilon = \varepsilon_r \cdot \varepsilon_0. \quad (2.2)$$

Dále platí, že pro stejnosměrná a harmonická elektrická pole je elektrická indukce D a intenzita E svázaná rovnicí

$$D = \varepsilon \cdot E. \quad (2.3)$$

Toto platí pro statické, nebo pomalu se měnící vnější elektrické pole. Pokud se frekvence elektrického pole zvyšuje narůstá zpoždění vektoru elektrické indukce v materiálu vzhledem k vektoru intenzity elektrického pole E . Tudíž je permitivita komplexní veličinou a je frekvenčně a tepelně závislá. Pro harmonicky střídavé pole byla zavedena komplexní permitivita

$$\varepsilon^* = \varepsilon' - j\varepsilon'', \quad (2.4)$$

kde ε' představuje reálnou a ε'' představuje imaginární část komplexní permitivity. Reálná část odpovídá polarizačním účinkům materiálu a je vyjádřena rovnicí

$$\varepsilon = \varepsilon'_r \cdot \varepsilon_0. \quad (2.5)$$

Imaginární část komplexní permitivity vyjadřuje ztráty fázovým posunem a popisuje jí rovnice

$$\varepsilon'' = \varepsilon''_r \cdot \varepsilon_0, \quad (2.6)$$

Často se imaginární část komplexní permitivity slučuje s členem odpovídajícím elektrické statické vodivosti. Vzniká tak ekvivalentní imaginární část komplexní permitivity, která je rovna

$$\varepsilon''_r = \varepsilon'' + \frac{\sigma}{\omega}. \quad (2.7)$$

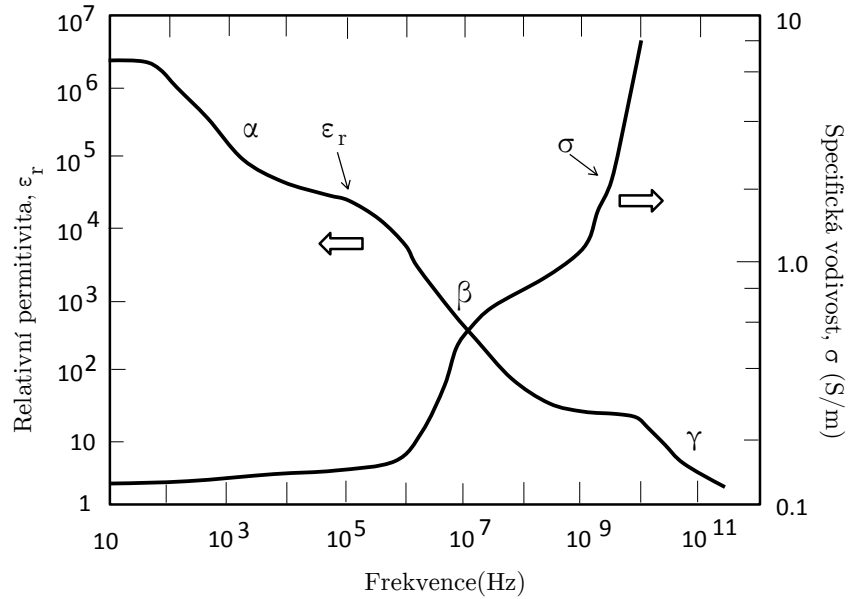
Rovnice převzaty z [28], [26].

Elektrická vodivost a permitivita u většiny materiálů nejsou konstantní a mění se s frekvencí aplikovaného pole. Tyto frekvenční závislosti jsou nazývány disperze. V heterogenním materiálu, jako jsou biologické tkáně, je pozorováno několik disperzí. Na obrázku 2.3 jsou znázorněny na křivce závislosti permitivity na frekvenci signálu tři disperze v biologických tkáních. α -disperze je viditelná na frekvencích okolo 10 kHz. Příčinou je difundování iontů na buněčných membránách [8]. β -disperzi způsobuje pole o frekvencích okolo MHz a je důsledkem polarizace membrán a velkých molekul. V pásmu GHz nastává především polarizace vody a vyvolává γ -disperzi.

Závislost komplexní permitivity na frekvenci lze vyjádřit Debye rovnicí

$$\varepsilon^* = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + i\omega\tau}, \quad (2.8)$$

ε_s značí statickou permitivitu, ε_∞ značí permitivitu při velmi vysokých frekvencích a τ označuje relaxační časovou konstantu. Rovnicí $\Delta\varepsilon = \varepsilon_s - \varepsilon_\infty$ se označuje,



Obrázek 2.3: *Typická závislost komplexní permitivity na frekvenci heterogenního materiálu, jako jsou biologické tkáně. Vyznačené α , β , a γ disperze. Převzato a upraveno z [26].*

jak velká disperze je. Debyeova rovnice však nepopisuje biologické tkáně dostatečně. Cole-Cole rovnice poskytuje komplexnější popis a to díky rozšířením Debye rovnice o statickou vodivost iontů a distribuční parametr α . Rovnice má tvar [8], [29], [23]

$$\varepsilon^* - \varepsilon_\infty = \sum_n \frac{\Delta\varepsilon_n}{1 + (j\omega\tau_n)^{1-\alpha_n}} + \frac{\sigma}{j\omega\varepsilon_0}. \quad (2.9)$$

2.5 Dielektrické vlastnosti erytrocytů

Erytrocyty (červené krvinky nebo také RBC z angl. red blood cells) jsou krevní elementy, které jsou procentuálně nejvíce zastoupené v krevní plazmě. Poměr množství červených krvinek ku celkovému objemu plné krve se nazývá hematokrit. Počet krvinek v krvi je různý během vývoje člověka i podle pohlaví. Množství erytrocytů dosahuje 39 ± 4 % u ženské populace a 44 ± 5 % u populace mužské. U novorozenať je hematokrit asi o 10 % vyšší. Nativní tvar červených krvinek je bikonkávní disk o průměru okolo $7,5 \mu\text{m}$ a tloušťka ve středu disku okolo $0,8 \mu\text{m}$ [21]. Erytrocyty se průměrně dožívají 110–120 dní [22].

2.5.1 Regulace přenosu glukózy do erytrocytů

Hlavní přenašeč usnadňující transport glukózy do červených krvinek je protein GLUT1. Je nezávislý na insulinu a je jedním z nejrozšířenějších bílkovin membrány erytrocytů. Rozsah přenosu glukózy do krvinek zprostředkovaného GLUT1 je přímo závislý na koncentraci glukózy v extracelulární tekutině [32]. Ve studii [33] bylo také zjištěno, že transport glukózy přes GLUT1 je regulován vazbou ATP na GLUT1. Záporně nabitě ATP obsažené v cytosolu mění terciární konformační strukturu GLUT1 a tím je inhibován transport glukózy do krvinky. Deriváty ATP, jako adenosin mono a difosfát (AMP a ADP), nevytářejí tak zásadní změnu konformace GLUT1 a neinhibují transport glukózy.

2.5.2 Dielektrické vlastnosti v GHz frekvenci

Bylo zjištěno, že biologicky aktivní D-glukóza ovlivňuje permitivitu membrán v závislosti na koncentraci v extracelulární tekutině [32], [33]. L-glukóza, která není biologicky aktivní, nemá na dielektrické vlastnosti vliv. Lze konstatovat, že změnu dielektrických vlastností ovlivňuje biologická aktivita D-glukózy [8].

Jak bylo popsáno v 2.4.1, v GHz regionu je patrná γ -disperze, způsobená odezvou vody. V předešlé kapitole je zmíněná regulační schopnost ATP na transport glukózy do RBC. Molekula ATP vykazuje dipólový charakter a s vodou reaguje vznikem hydratačního obalu kolem sebe [7]. Vždy když voda reaguje s dipólovou molekulou či iontem, nastane rozšíření rozložení relaxačního času [8], [23]. V práci [36] byla zkoumána závislost koncentrace ATP a AMP rozpuštěných ve vodě na dielektrické vlastnosti těchto roztoků. Po přidání ATP či AMP bylo pozorováno snížení dielektrické permitivity spolu s rozšířením rozložení relaxačního času a i jeho posuvem.

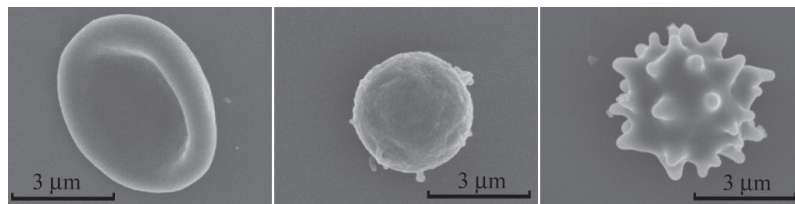
2.5.3 Dielektrické vlastnosti cytoplazmy erytrocytů

Studie [35] se zabývala dielektrickou odpovědí cytoplazmy krvinek v závislosti na extracelulární koncentraci glukózy. Bylo zjištěno, že koncentrace okolo 10 mM je zlomová. Při koncentraci $c_{gluk} < 10$ mM se snižoval relaxační čas a při $c_{gluk} > 10$ mM narůstá zpět. Pokles je vysvětlen vnikem vody do buňky společně s glukózou a zředěním vnitřního elektrolytu cytosolu a aktivitou procesů pumpujících přeby-

tečnou vodu z buňky. Rostoucí tendence relaxačního času při koncentraci $c_{gluk} > 10$ mM je zapříčiněna nejspíše snahou udržovat stálý osmotický tlak a čerpáním Na^+ do krvinky. Tím se dostává do cytoplazmy další voda [35], [8].

2.5.4 Efekt morfologie

Za normálních fyziologických podmínek mají červené krvinky charakteristický tvar bikonkávního disku (diskocyty nebo také normocyty). V důsledku změn osmotického tlaku, pH nebo některých nemocí se tvar krvinek může měnit. Například na srpkovité erythrocyty při srpkovité anémii nebo echinocyty (erythrocyty s trny) vznikají při uremii [23], [8]. Na obrázku 2.4 jsou ukázky ze SEM různých erythrocytů. Ve studiích [25] byla zjištěna korelace mezi změnou dielektrických parametrů a změnou tvaru erythrocytů v konzervované krvi. Livshits et al. dospěli k závěru, že erythrocyty bikonkávní a sférické se odlišují v dielektrických parametrech [6], [30], [31].



Obrázek 2.4: *Různé tvary erythrocytů, snímky pořízené SEM mikroskopem. Zleva normální erythrocyt, sférocyt, echinocyt. Převzato a upraveno [25].*

2.5.5 Agregace erythrocytů

Krev je velice aktivní v agregaci a disagregaci červených krvinek. Tyto jevy jsou ovlivňovány plazmatickými proteiny fibrinogenem a gama-globulinem. Zvýšení jejich koncentrace poukazuje na zánětlivé onemocnění v organismu. Erythrocyty mohou utvářet rouleaux formace, což jsou útvary několik krvinek na sobě. Tyto formace urychlují sedimentaci. Toho se stále využívá v klinické praxi při vyšetření ESR (z angl. erythrocyte sedimentation rate) [23].

Ve studii [24] bylo zjištěno, že sedimentací krvinek se až třikrát zvýší permitivita krve. Při obnovení průtoku krve se permitivita vrátila na původní hodnotu. Problém s usazováním krvinek se také neprojevuje, pokud je plazma nahrazena fyziologickým roztokem [8] [23].

2.6 Princip mikrovlnných senzorů

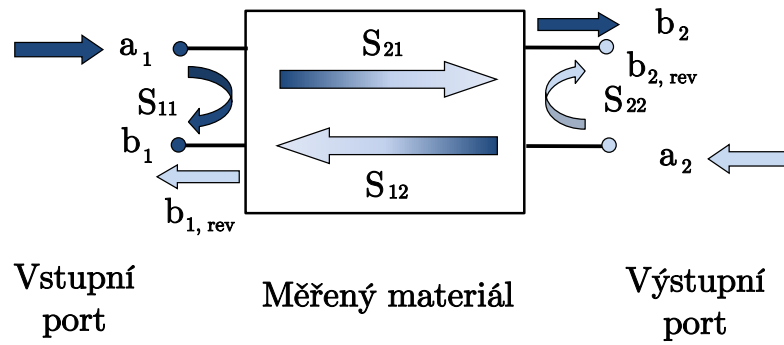
Mikrovlnné senzory mohou být spolehlivou alternativou k měření chemických veličin v těle. Reakce materiálu s mikrovlnným zářením je závislá na struktuře molekul materiálu. Je tedy možné měřením reakcí molekul po excitaci určit složení tělních tkání a tekutin prostřednictvím jejich dielektrických vlastností. V závislosti na frekvenci mohou elektromagnetické vlny pronikat do tkání, což umožňuje neinvazivní měření, které lze individuálně lokalizovat. Velkou výhodou, oproti jiným typům záření jako rentgenové, je neionizující charakter. K měření není potřeba dalšího spotřebního materiálu a výsledek je realizovaný v řádu sekund [37]. Proto je tato metoda vhodná i k domácímu použití.

Mikrovlnné senzory mají obvykle dvě části. Sensorový element a část zpracovávající signál. Sensorový prvek je pevné medium upravené tak, aby pole mohlo vhodně interagovat s měřeným materiálem. Podle šířky pásma prvku se senzory rozdělují na úzkopásmové (rezonanční) a širokopásmové senzory [8]. Část pro zpracování signálu se využívá pro měření změn sensorového elementu jako funkce změny permitivity [37].

Pro měření se nejčastěji využívá vektorový analyzátor obvodů. Tento přístroj měří veličiny označované jako S-parametry (z angl. scattering). Dolní indexy vyjadřují sledovaný vstup a výstup. Sensor, který je využit pro měření k této bakalářské práci, má dva porty. Měřit lze tedy S_{11}^* , S_{21}^* , S_{12}^* a S_{22}^* parametry (graficky znázorněno na Obr. 2.5). Pomocí parametru S_{21}^* jsou detekovány dielektrické vlastnosti, jelikož popisuje přenos elektromagnetického záření z portu 1 do portu 2. S_{21}^* je komplexním číslem a lze z něj odvodit modul $|S_{21}^*|$ a fázi $\varphi = \angle S_{21}^*$.

2.7 Princip metamateriálových senzorů

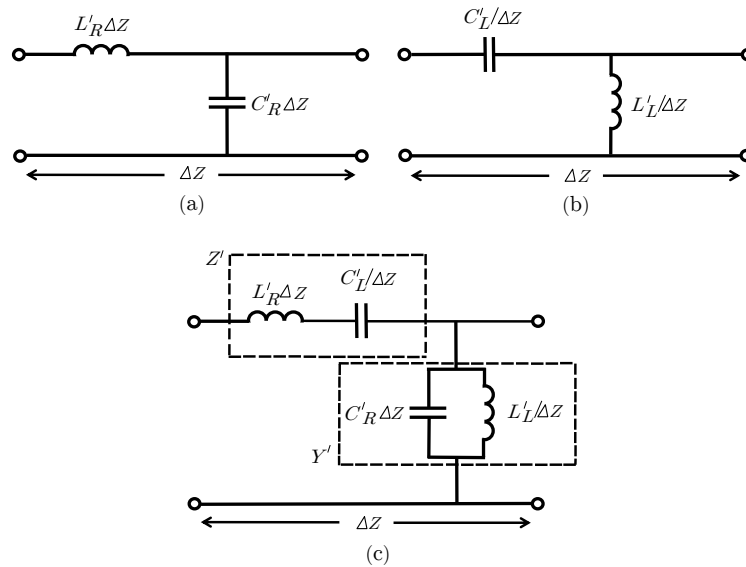
Metamateriály jsou kompozitní materiály vykazující vlastnosti, které nejsou v přírodě pozorovatelné. Jedná se převážně o negativní permitivitu ε , permeabilitu μ a index lomu n . Běžné látky jsou definované jako pravotočivé vedení RH (z angl. right handed), zato metamateriály jsou vedení levotočivé LH (z angl. left handed). V praxi se designují metamateriály s kompozitním CRLH (z angl. composite right/left handed) vedením. Tyto kompozity se dokáží velmi přiblížit vlastnostem čistě LH vedení [39]. Na Obr. 2.6 jsou znázorněny ekvivalentní obvodové modely RH, LH a CRLH



Obrázek 2.5: Měřitelné S -parametry pro dvojportový mikrovlnný senzor. DUT je měřené vedení. Převzato a upraveno z [38].

vedení [8].

Senzory vytvořené z metamateriálů jsou výhodné ve variabilitě rozměrů, frekvencí a tvaru senzoru (planární, 3D, rigidní apod.).



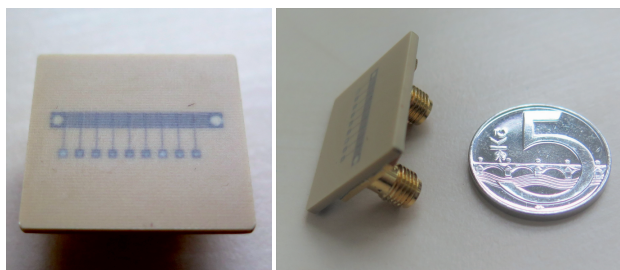
Obrázek 2.6: Obvodové modely vedení (a) RH , (b) LH a (c) $CRLH$. C' je měrná kapacitance, L' je měrná induktance. Převzato a upraveno z [39]

3 Metody

Pro měření byla použita prasečí krev z důvodu nejlepší dostupnosti. Výhodou použití této krve je podobnost fyziologie s fyziologií člověka, což je také důvod, proč jsou prasata využívána jako modely biomedicínských experimentů.

Pro měření fáze parametru S_{21}^* byl použit vektorový analyzátor FSH 8.28, Rohde&Schwartz, USA s frekvenčním rozsahem 100 kHz až 8 GHz. Byly připojeny koaxiální kabely a provedena kalibrace pomocí kalibračního standardu ZV-Z135 f, Rohde&Schwartz, USA na plné dvojportové kalibraci. Poté byl připojen senzor v měřící soustavě. Senzor zobrazen na obrázku 3.1 byl převzat z práce [8].

Pro měření teploty při měření plné krve byl použit teploměr 3000-spezial, DTM, Německo s rozsahem -20 až $+110$ °C, s rozlišením $0,01$ °C a přesností $\pm 0,04$ °C. Při měření izolovaných krvinek byl použit teploměr K204 Datalogger, Voltcraft, Německo s rozsahem -200 až $+1370$ °C s rozlišením $0,1$ °C a přesností $\pm 0,2$ %. Pro měření glukózy v krvi byl použit komerční glukometr Accu-check Performa Nano. Glukometr je možno využít jak pro domácí měření, tak i pro diagnostické stanovení *in vivo* odbornými pracovníky. V rámci práce byly použity originální testovací proužky pro plnou krev o hematokritu 10–65 %, s rozsahem 0,6–33 mmol/l.



Obrázek 3.1: Měřící senzor. Převzato a upraveno z [8]

3.1 Odběr krve

Prasečí krev byla vždy odebrána pracovníkem jatek, napíchnutím krkavice prasete a nachytána do barelu o objemu asi 2,5 l. V barelu byl předpřipravený roztok citrananu trisodného ve vodě o koncentraci $0,129$ mol/l a v poměru 1:9 s krví. Citrát slouží jako antikoagulant. Byly odebrány cca 2 litry krve a měření začalo vždy maximálně 2 hodiny od odebrání krve.

3.2 Měření plné krve

Při měření plné krve byl senzor nainstalován na dno krabičky, kam se pipetovaly vzorky, a byl napojen k vektorovému analyzátoru obvodů. Na obrázku 3.2 je zobrazeno zapojení měřící sestavy.



Obrázek 3.2: *Propojení vektorového analyzátoru se senzorem a komerční glukometr (žlutý přístroj) pro měření plné krve.*

3.2.1 Příprava roztoků glukózy

Před samotným měřením bylo potřeba připravit roztoky glukózy, ze kterých byl pipetován 1 ml do 100 ml krve. Roztoky byly namíchány dle navážek v tabulce 3.1 do 50 ml fyziologického roztoku, připraveného z 1 l destilované vody a 9 g NaCl. Pro navážení glukózy a NaCl byly použity laboratorní váhy SM1245Di, VWR, USA s rozlišením 0,01 mg s maximální zátěží 40 g. Bylo celkově připraveno šest zásobních roztoků různých koncentracích a konečném objemu 50 ml. Jelikož odebraná krev měla počáteční glykémii přibližně 5 mmol/l a byla určena jako vzorek s nejnižší možnou koncentrací.

3.2.2 Měření parametru přenosu S_{21}

Při měření parametru přenosu bylo do vodní lázně vloženo sedm nádobek s prasečí krví. Do každé nádoby byl přidán stejný objem (1 ml) jednoho z roztoků glukózy. Do první nádoby nebyl přidán žádný roztok, počáteční hodnota koncentrace glukózy

Tabulka 3.1: *Hodnoty navážky D-glukózy a výsledná koncentrace roztoku*

Roztok	1	2	3	4	5	6
Navážka (g)	2,703	4,504	6,307	8,108	9,011	9,911
Koncentrace (mmol/l)	3	5	7	9	10	11

tedy byla 5,3 mmol/l. Temperování nádobek na 37 °C trvalo 10-15 minut. Následně byly vzorky proměřeny vektorovým analyzátozem v rozsahu frekvencí 1,5–2,5 GHz. Poté byl senzor vyprázdněn, vypláchnut destilovanou vodou a vysušen. Pro každý vzorek byla provedena tři měření po 25 ml. Koncentrace glukózy ve vzorcích byla měřena komerčním glukometrem těsně před prvním měřením a po posledním měření vzorku. Tabulka 3.2 zobrazuje zprůměrované hodnoty koncentrace naměřené glukometrem.

Tabulka 3.2: *Naměřené hodnoty glykemie vzorků v experimentu č. I*

Vzorek	0	1	2	3	4	5	6
Změřená koncentrace (mmol/l)	5,3	9,7	12,3	15,2	17,6	19,1	24,7

3.2.3 Měření časové odezvy parametru S_{21}

Při měření časové odezvy S_{21} byla zjišťována časová závislost změny fáze S_{21}^* parametru. Do krabičky se senzorem bylo odpipetováno 25 ml krve bez přidaného roztoku glukózy, po 10 minutách měření bylo do krve odpipetováno 250 ul roztoku 2 a měřeno dalších 15 minut. Každou minutu měření byla krev promíchána, změřena fáze vektorovým analyzátozem a změřena glykémie glukometrem. Takto bylo postupováno i s roztokem 6. Průběh změny fáze je zobrazen na obrázcích 4.6 pro měření s roztokem 2 a 4.9 pro měření s roztokem 6.

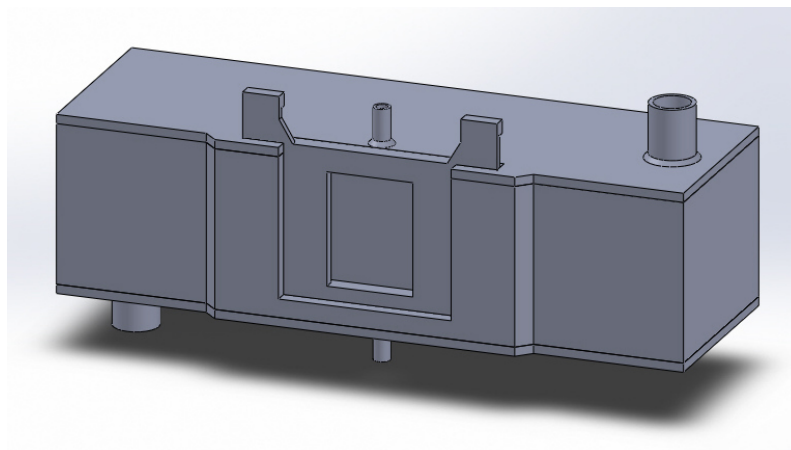
3.3 Měření roztoků krvinek, PBS a glukózy

Pro druhou metodu byl vybrán odlišný přístup. Před měřením byla krev upravena izolací červených krvinek a nahrazením plazmy fosfátovým pufrům PBS (z angl. Phosphate Buffered Saline). Byla také vytvořena soustava umožňující průtok vzorku

v měřicí cele a současně s ohřevem během měření. Pro průtok byla využita peristaltická pumpa FH100 72-320-000 od firmy Thermo Scientific. Pro ohřev vzorků a roztoků byla použita vodní lázeň TX150, Grant, Velká Británie.

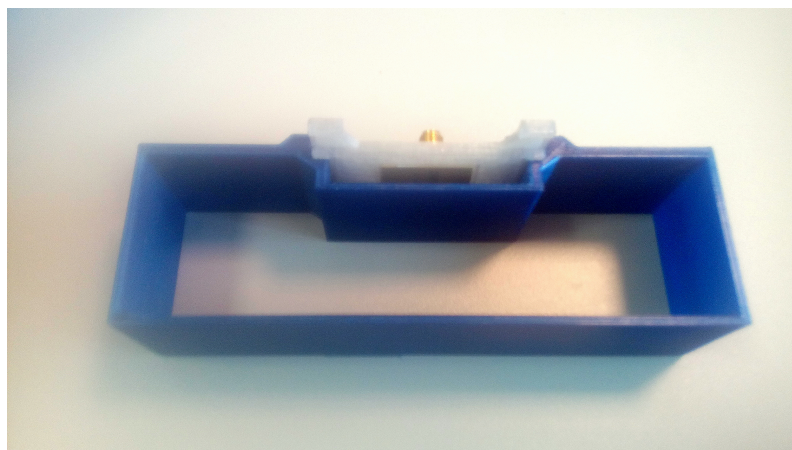
3.3.1 Měřicí sestava

Měřicí soustava propojená s peristaltickou pumpou a vodní lázní pro ohřev vzorku byla zhotovena pomocí 3D tiskárny Prusa i3MK2, Prusa Research, Česká republika. Model byl vytvořen v programu SolidWorks (obr. 3.3), z kterého byl vyexportován jako soubor .stl. Tento soubor byl upraven v programu Slic3r Prusa Edition, kde se nastavil materiál pro tisk, vlastnosti vrstev a také se zde optimalizovala doba tisku. Poté byl soubor uložen ve formátu pro 3D tiskárnu. Čas tisku všech částí byl necelých 23 hodin. Postupně byly navrženy a vytištěny tři různé měřicí sestavy s různou geometrií. Finální a v této práci pro měření využitá měřicí sestava je zobrazena na obrázcích 3.4 a 3.5. Podrobná dokumentace sestavy uvedena v příloze. Hadičky sestavy byly mezi sebou propojeny dvěma trojcestnými ventily, ty sloužili pro naplnění měřicí cely vzorkem či pro čištění soustavy.



Obrázek 3.3: Model sestavy v programu SolidWorks.

Sestava byla slepena nejdříve modelářským vteřinovým lepidlem a poté pro lepší těsnost spoje zalepeny průhledným silikonem. Na obrázku 3.4 je vidět vnitřní rozložení a na obrázku 3.5 je díl pro senzor a již slepená soustava. Na obrázcích 3.6 a 3.7 je vyfocen kompletně sestavený systém ohřevu a průtoku vzorku.



Obrázek 3.4: *Pohled na vnitřní rozložení soustavy.*



Obrázek 3.5: *Splená soustava a díl se senzorem.*

3.3.2 Úprava krve a příprava vzorků

Úprava krve pro měření spočívá v izolaci červených krvinek centrifugací. Plná krev byla centrifugována na 3000 xg po dobu 10 minut a při teplotě 4 °C. Byly použity centrifugační zkumavky typu Falcon o objemu 50 ml, které byly plněny maximálně na objem 40 ml. Poté byla odsáta plazma od odstředěných erytrocytů, nahrazena PBS po rysku a následně byla zkumavka opatrně promíchána pomalým naklápěním. Roztok byl znovu centrifugován a oddělený byl supernatant odsát a nahrazen PBS. Tento proces byl zopakován třikrát, aby se červené krvinky promyly a zbavily veškeré plazmy. Den před úpravou krve byly připraveny roztoky glukózy s PBS podle tabulky 3.3. Roztoky by uchovány v lednici při teplotě 4 °C. Do těchto roztoků bylo přidáváno 20 ml izolovaných erytrocytů, aby výsledný hematokrit byl přibližně 40 %.

Pufir PBS byl připraven z 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ a 0,24 g KH₂PO₄

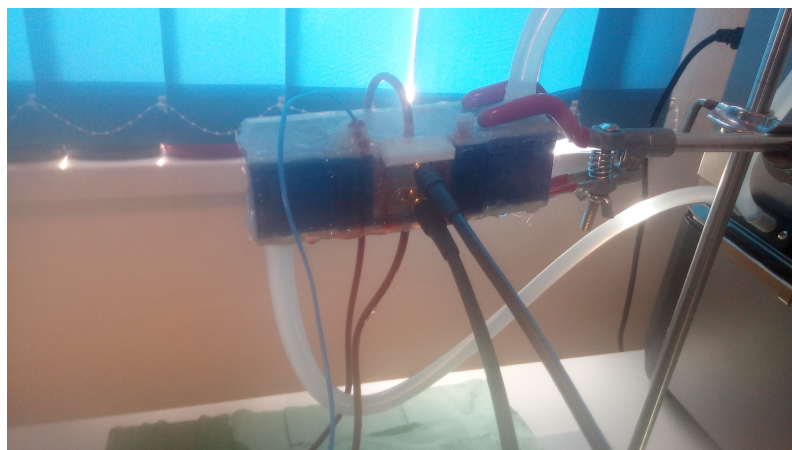


Obrázek 3.6: Zapojená sestava ohřevu a oběhu se vzorkem. Nejblíže je vidět peristaltická pumpa na stojanu samotný prvek se senzorem a nejdál je vodní lázeň.

rozpuštěných v destilované vody. Bylo připraveno asi 800 ml roztoku a kalibrovaným pH metrem změřeno pH, které bylo upraveno několika kapkami 5M roztoku NaOH na výslednou hodnotu 7,4. Po úpravě pH byl roztok doplněn na objem 1 litr.

3.3.3 Průběh měření

Jako první musela proběhnout úprava krve, jak bylo popsáno v kapitole 3.3.2. Současně bylo možné izolovat čtyři zkumavky krve. Samotná izolace a příprava krve trvala přibližně hodinu. Když byly připraveny první čtyři zkumavky izolovaných kr-



Obrázek 3.7: Detail zapojené sestavy pro ohřev a oběh vzorků.

Tabulka 3.3: Tabulka objemů a koncentrací roztoků glukózy a PBS. Celkový objem vzorků činil vždy 30 ml.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V_{glu} (ml)	0	1,2	2,4	3,6	4,8	6	7,2	8,4	9,6	10,8
V_{PBS} (ml)	30	28,8	27,6	26,4	25,2	24	22,8	21,6	20,4	19,2
c_{glu} (mmol/l)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
c_{glu} (mg/dl)	0	36	72	108	144	180	216	252	288	324

vinek, přidaly se k nim roztoky glukózy, které se temperovaly maximálně 10 minut na teplotu 37 °C ve vodní lázni. Při dosažení požadované teploty byl vzorek opatrně promíchán, přelit do stříkačky a vpraven do průtokové soustavy. Když byl systém naplněn, byla zapnuta peristaltická pumpa a vodní lázeň. V oběhové soustavě se teplota ustálila okolo teploty 32 °C a při této teplotě bylo prováděno měření. Pro každý vzorek bylo provedeno 8 měření po 16 minutách. První měření bylo provedeno po ustálení teploty v oběhu a časové rozestupy mezi jednotlivými měřeními činil 2 minuty. Před měřením vektorovým analyzátozem byly vždy pumpa a vodní lázeň vypnuty, aby se zamezilo vibracím, které by ovlivnily měření. Proměření čtyř připravených vzorků trvalo přibližně hodinu a půl. Poté byla připravena další sada tří vzorků, jež byla následně proměřena. Následně byly připraveny a měřeny poslední 3 vzorky.

3.4 Zpracování dat

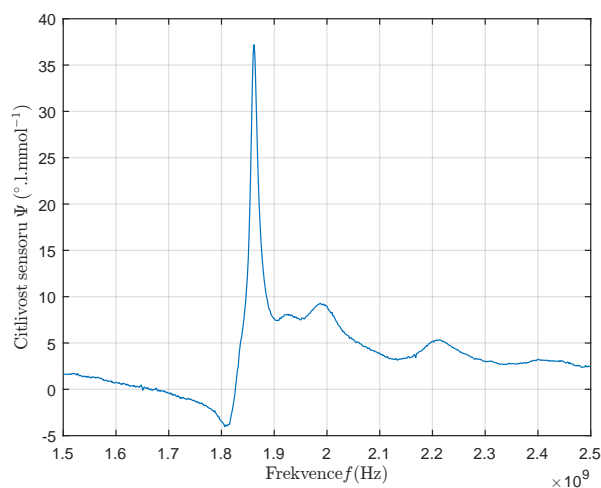
Grafy byly vytvořeny v programu MATLAB. Pro regresní analýzu byl využit statistický program STATISTICA. Regresní křivka byla doplněna o 95% interval spolehlivosti. Z výsledků regresní analýzy (obr. 4.3) byla použita rovnice regresní přímky pro výpočet odhadů koncentrací naměřených dat. Takto získaná data byla aplikována do Clarkovy chybové síťové analýzy. Grafy Clarkovy chybové síťové analýzy byly získány pomocí skriptu v programu MATLAB.

4 Výsledky

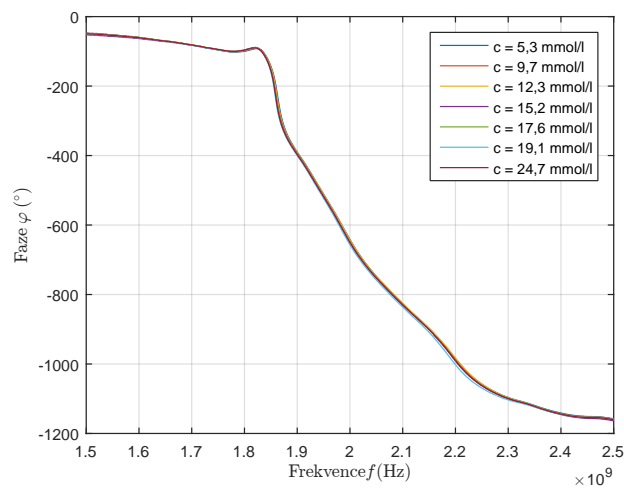
4.1 Měření plné krve

4.1.1 Měření parametru přenosu S_{21}

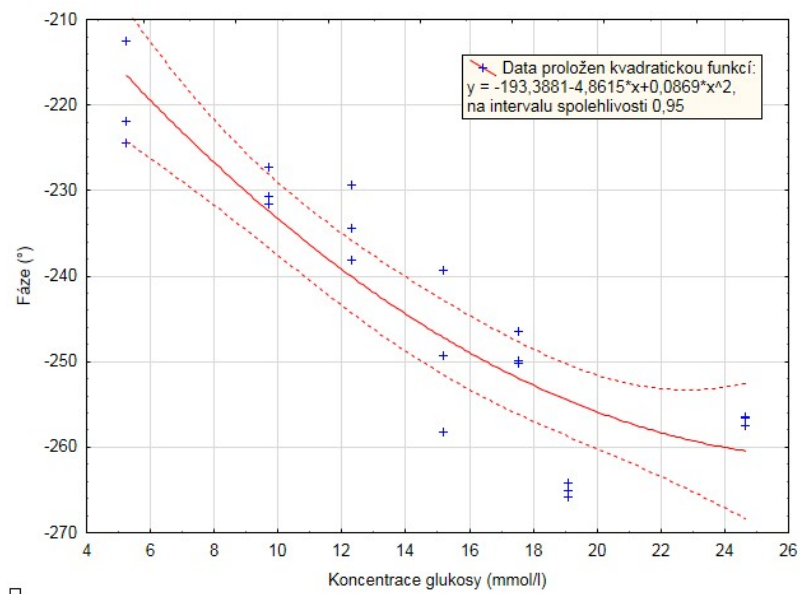
V této kapitole jsou zobrazeny grafy pro závislost citlivosti a změny fáze na frekvenci. Měření proběhlo pro koncentrace glukózy od 5,2 do 24,7 mmol/l.



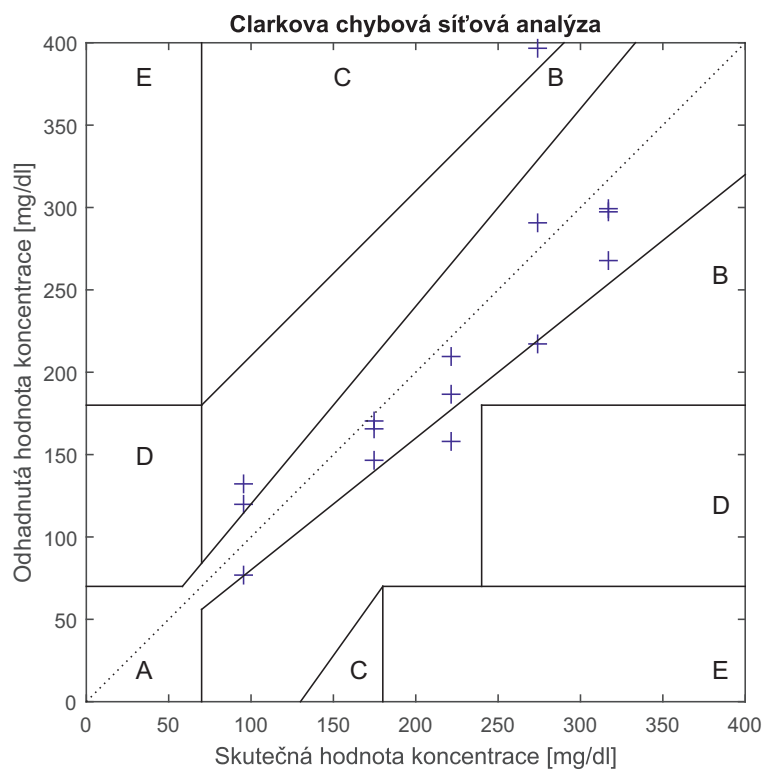
Obrázek 4.1: Citlivost senzoru, vypočítaná jako změna změřené fáze φ při změně koncentrace glukózy z 5,2 na 24,7 mmol/l



Obrázek 4.2: Závislost změřené fáze na frekvenci pro 7 různých koncentrací glukózy



Obrázek 4.3: Závislost změřené fáze φS_2^1 parametru na frekvenci $f = 1,862 \text{ GHz}$ pro 7 různých koncentrací glukózy a pro všechna naměřená data



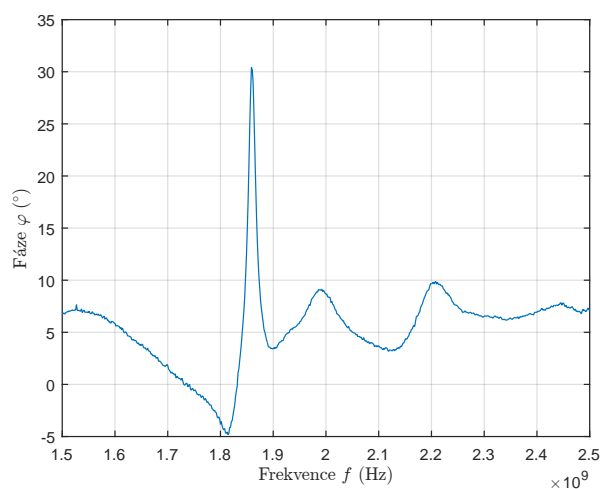
Obrázek 4.4: Vynesená data do grafu Clarkovy chybové síťové analýzy plné krve

4.1.2 Měření časové odezvy parametru S_{21}

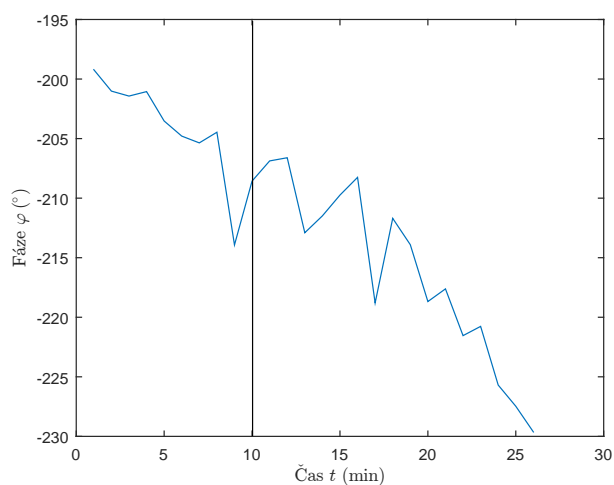
V této kapitole jsou zobrazeny grafy citlivosti senzoru na frekvenci a časová závislost změny fáze při nejcitlivější frekvenci získanou z grafu 4.6 a 4.9. Měření proběhlo pro dvě různé koncentrace.

Roztok 2

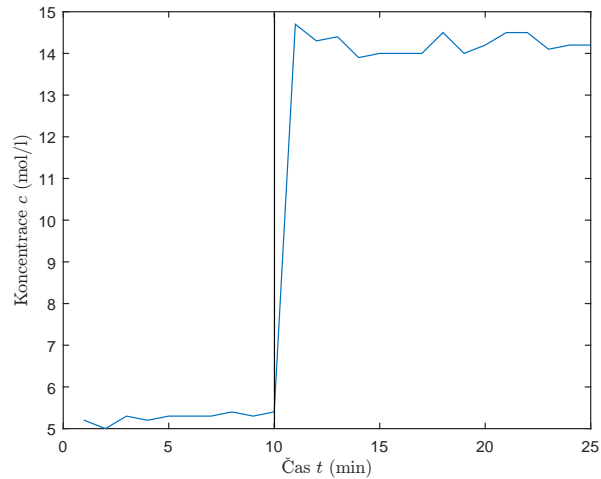
Roztok 2 o koncentraci 5 mmol/l.



Obrázek 4.5: *Citlivost senzoru vypočítaná jako změna změřené fáze φ z první a poslední minuty*



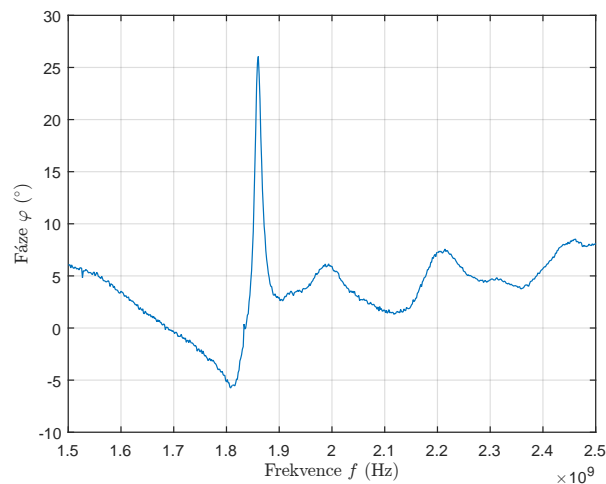
Obrázek 4.6: *Závislost změřené fáze na čase. V čase $t = 10$ minut bylo přidáno 0,25 ml roztoku 2*



Obrázek 4.7: Vývoj koncentrace glukózy v čase během experimentu. V čase $t = 10$ minut bylo přidáno 0,25 ml roztoku 2.

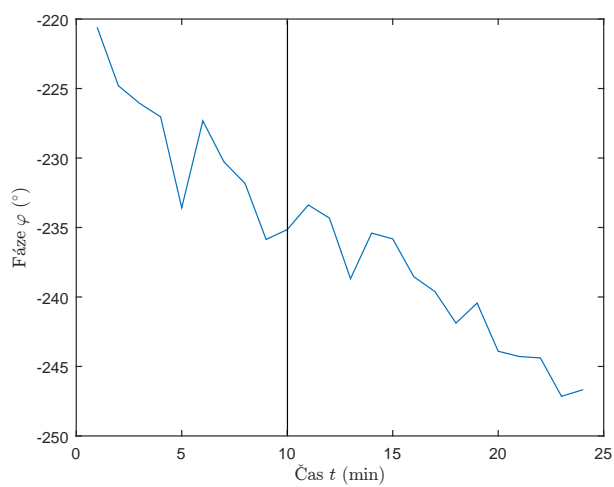
Roztok 6

Roztok 6 o koncentraci 11 mmol/l.

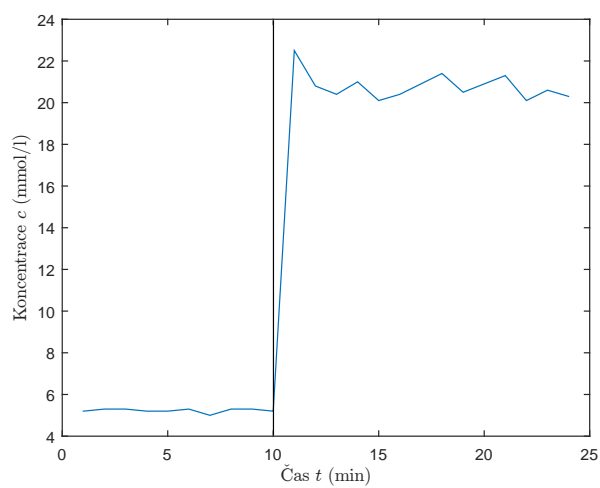


Obrázek 4.8: Citlivost senzoru, vypočítaná jako změna změřené fáze φ z první a poslední minuty

Na obrázcích 4.5 a 4.8 lze vidět, že frekvence největší citlivosti senzoru se v podstatě neliší a je na stejné hodnotě pro obě hodnoty koncentrací glukózy, které byly do krve přidány.



Obrázek 4.9: Závislost změřené fáze na čase. V čase $t = 10$ minut bylo přidáno 0,25 ml roztoku 6

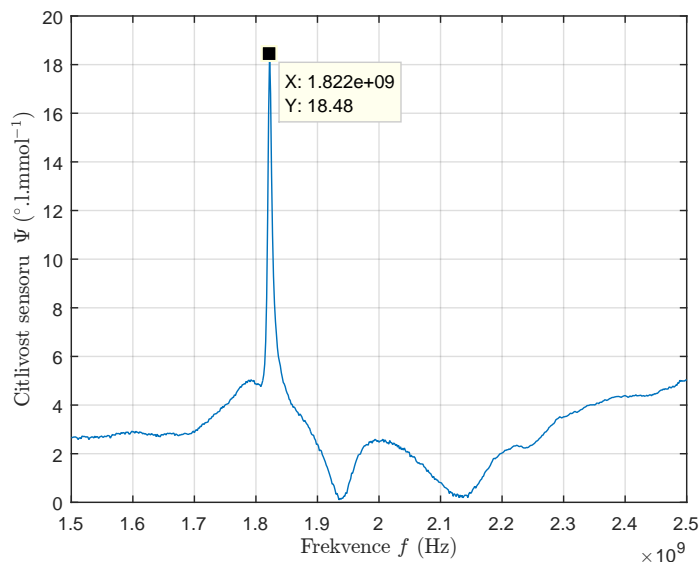


Obrázek 4.10: Vývoj koncentrace glukózy v čase během experimentu. V čase $t = 10$ minut bylo přidáno 0,25 ml roztoku 6.

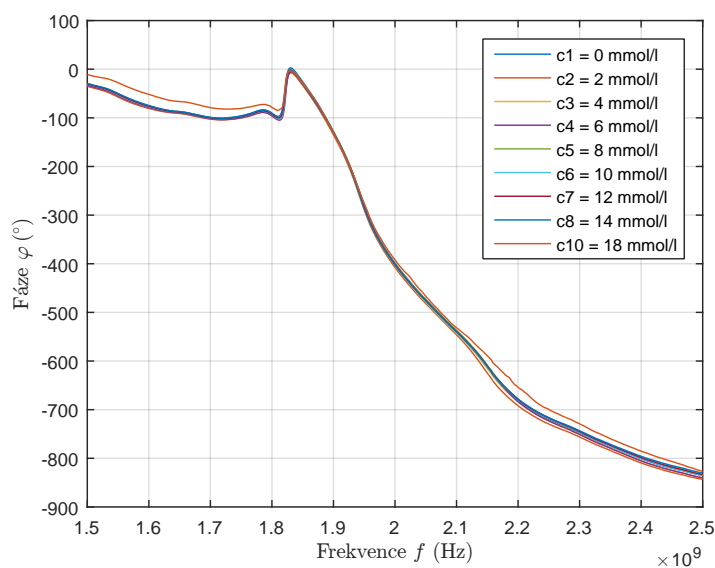
4.2 Měření roztoků krvinek, PBS a glukózy

4.2.1 Měření parametru přenosu S_{21}

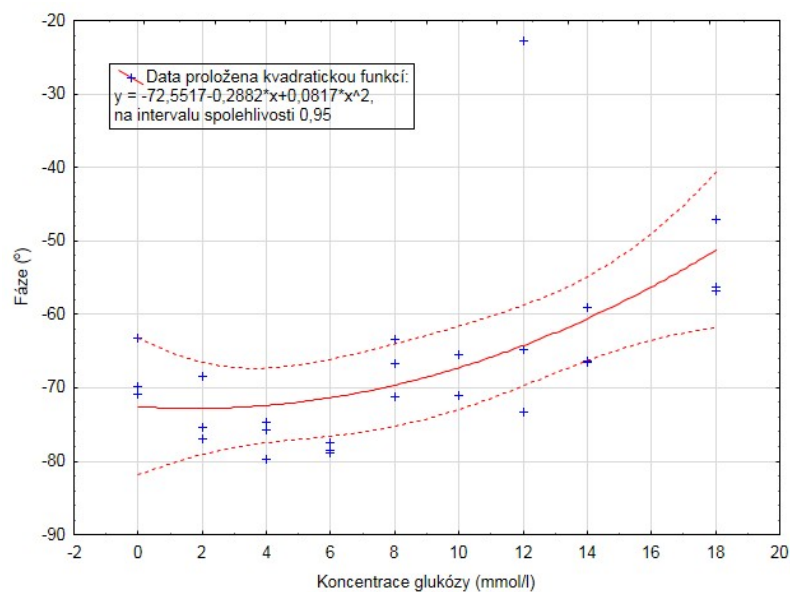
V této kapitole jsou zobrazeny grafy pro závislost citlivosti a změny fáze na frekvenci. Měření proběhlo pro koncentrace podle tabulky 3.3.



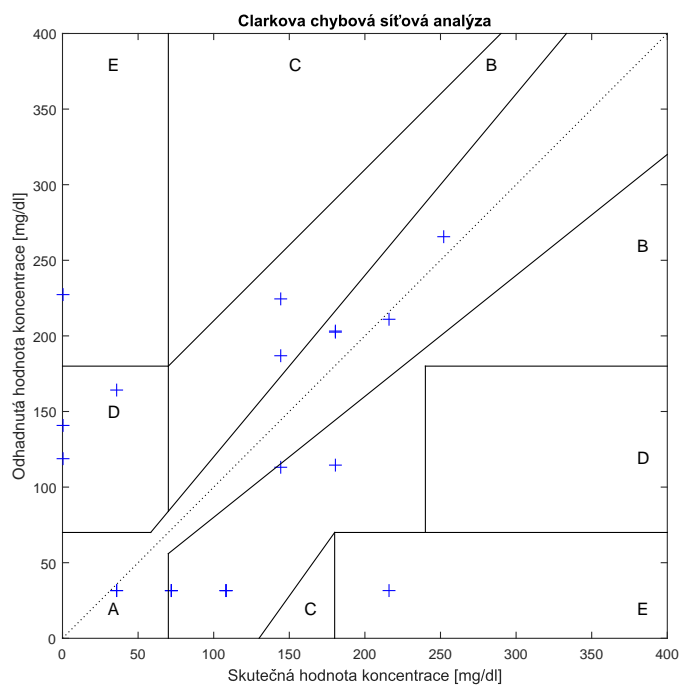
Obrázek 4.11: Citlivost senzoru, vypočítaná jako změna změřené fáze φ při změně koncentrace glukózy z 0 na 18 mmol/l



Obrázek 4.12: Závislost změřené fáze zprůměrované ze všech osmi měření na frekvenci pro 9 různých koncentrací glukózy



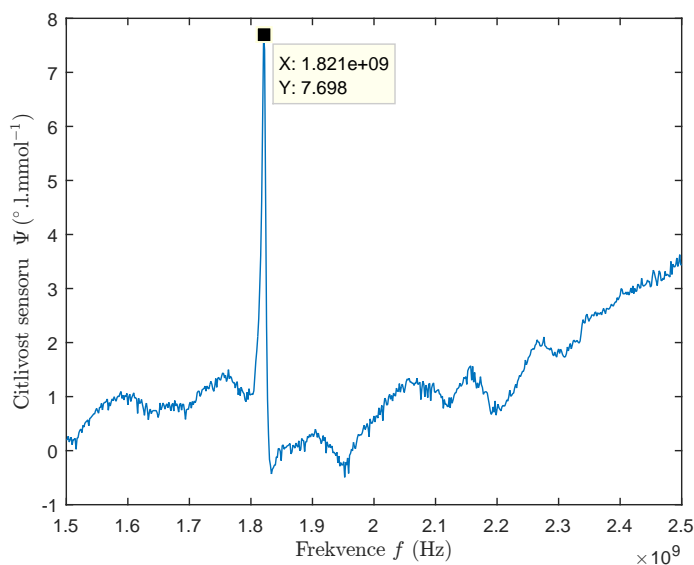
Obrázek 4.13: Závislost změřené fáze φ S_{21}^* parametru na koncentraci glukózy při frekvenci $f = 1,82$ GHz pro 9 různých koncentrací glukózy. Data jsou poslední tři změřené hodnoty.



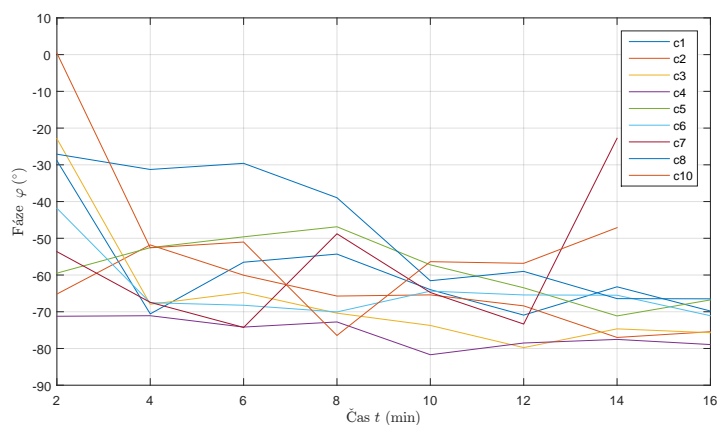
Obrázek 4.14: Vynesená data do grafu Clarkovy chybové síťové analýzy izolovaných krvinek

4.2.2 Měření časové odezvy parametru S_{21}

V této kapitole jsou zobrazeny grafy citlivosti senzoru na frekvenci a časová závislost změny fáze při nejcitlivější frekvenci získanou z grafu 4.11. Měření proběhlo pro všechny připravené vzorky.



Obrázek 4.15: Citlivost senzoru, vypočítaná jako změna změřené fáze φ z první a poslední minuty



Obrázek 4.16: Závislost změřené fáze na čase devíti vzorků. Závislost je při frekvenci $f = 1,82 \text{ GHz}$ zjištěné z grafu 4.15

5 Diskuze

5.1 Manipulace se vzorky

Během měření se ukázalo, že práce s plnou krví i se vzorky izolovaných červených krvinek je občas problematické. Vzorky jsou citlivé na světlo a teplotu a je obtížné je během měření uchovat v ideálních podmínkách. V literatuře chybí informace o vlivech antikoagulantů na dielektrické vlastnosti krve. Jako protisrážlivá látka byl použit citronan trisodný kvůli snadnému namíchání a dostupnosti. Aby se dosáhlo dobrých antikoagulačních schopností musela být krev naředěna v poměru 1:9. Citrát jako antikoagulant působí na principu vychytávání iontů vápníku, to může ovlivnit odezvy krve na koncentraci glukózy. Přesto nebyly pozorovány žádné známky srážení krve po celou dobu měření. Krev však nevydrží ani do druhého dne i když je uchovávána v temnu a při 4° C. Jelikož měření trvá poměrně dlouhou dobu, bylo by vhodnější použít jiný antikoagulant nebo vyzkoušet více antikoagulantů pro zjištění jejich vlivu na měření. Z nich pak vybrat ten nejvhodnější.

5.2 Měření plné krve

První byla měřena fáze parametru přenosu S_{21} pro 7 vzorků. Krev byla temperována pouze před měřením. Tím se zvyšovalo riziko vnesení chyby do výsledků postupným vychládáním vzorku během měření. Pro naměřená data glykémie získaných konvenčním glukometrem a fáze z vektorového analyzátoru byla vytvořena regresní křivka v softwaru STATISTICA. Křivka zobrazena na obrázku 4.3 má tvar kvadratické funkce a byla doplněna o 95% interval spolehlivosti. Z grafu je patrné, že většina hodnot splňuje určený interval spolehlivosti. Rovnice regresní křivky byla použita pro výpočet odhadů koncentrace na základě změřené fáze φ a pomocí skriptu v programu MATLAB aplikovány do Clarkovy chybové síťové analýzy. Pro analýzu byly využity pouze data prvních pěti měření, jelikož odhady dvou pro dvě nejvyšší koncentrace přesahovaly limitní hodnotu 400 mg/dl. V grafu EGA (4.1) je vidět, že většina odhadů koncentrace byly správné, protože se nachází v oblasti A (10 hodnot z 15 celkových) nebo v oblasti B (4 hodnoty) a oblasti C se objevila pouze jedna hodnota. Dle této analýzy lze konstatovat, že měření bylo přesné a je základem k dalšímu výzkumu metody měření glykémie neinvazivním metamateriálovým

senzorem.

Měření časové závislosti fáze na skokovou změnu koncentrace glukózy je zobrazeno v grafech 4.7 a 4.10. Z těchto grafů nelze s jistotou určit čas, kdy v krvi došlo ke zvýšení glukózy a jak na to reagovala fáze φ . Takovýto průběh může mít několik příčin. Jako první a nejspíše nejzásadnější příčinou je temperování krve na 37 °C pouze před nalitím do krabičky se senzorem. Tudíž během měření krev během měření postupně chladla, to by mohlo být i příčinou klesajícího trendu viditelného na obou grafech. Před každým měřením vektorovým analyzátozem byla krev také opatrně promíchána skleněnou tyčinkou, aby se omezila agregace a usazování červených krvinek. Míchání nebylo možné provést vždy naprosto stejně, proto je možné, že v některých momentech byla krev promíchána více a někdy méně. Krev také měla otevřenou hladinu a mohla reagovat na vnější atmosféru různými nežádoucími způsoby.

5.3 Měření izolovaných krvinek

Z důvodů negativního ovlivnění předchozích měření, zejména klesáním teploty a nemožností promíchání vzorků, byl vytvořen systém, který umožňuje měřený vzorek vyhřívat a udržovat konstantní teplotu a zajišťuje uzavřený oběh vzorku kolem senzoru pomocí peristaltické pumpy. Pro vyhodnocení parametru přenosu S_{21} byly využity průměrné hodnoty naměřené fáze S_{21} z 8 měření pro každou koncentraci. Vzorek 9 s koncentrací 16 mmol/l byl vyřazen z hodnocení, jelikož změřené hodnoty nebyly adekvátní. To bylo způsobeno nejspíš nasátím vzduchu do systému a přítomností vzduchových bublin. Graf 4.12 zobrazuje závislost fáze φ na frekvenci f . Každá křivka byla vytvořena jako průměr všech osmi měření. Průběh křivek se velmi podobá průběhu křivek modelů z práce [8], ačkoliv naměřená data jsou posunuta k vyšší frekvenci (cca 1,8 GHz). Pro regresní analýzu byly využity hodnoty fáze, které byly změřeny ve 12., 14. a 16. minutě. Výběr právě těchto hodnot byl založen na předpokladu ustálení koncentrace glukózy ve vzorku jak lze vidět i z grafu 4.16. Jelikož při této metodě byla využita upravená krev, konvenční glukometr, který byl použit při měření plnou krví, nedokázal stanovit koncentraci glukózy v tomto roztoku. Také nebylo možné odebrat vzorek pro změření glukometrem ze soustavy oběhu během měření. Z toho lze tedy předpokládat, že koncentrace glukózy ve vzorku se

zásadně v čase nemění, jak ukazují i grafy 4.7 a 4.10 z měření plné krve. Reálné hodnoty koncentrace glukózy pro regresní analýzu byly nahrazeny vypočítanou koncentrací z tabulky 3.3. Koncentrace je vypočítána pro objem 30 ml roztoku glukózy a PBS. Při přidání 15 ml izolovaných červených krvinek se tato koncentrace může nepatrně odchylovat, jelikož mohlo dojít k nedokonalému odsátí supernatantu nad usazenými krvinkami. Změna koncentrace by však měla být minimální. V programu STATISTICA byly hodnoty změřené fáze, proloženy regresní křivkou, která má tvar kvadratické funkce. Křivka byla doplněna o 95% interval spolehlivosti. Většina hodnot spadá do určeného intervalu. Rovnice regresní křivky byla použita pro odhady koncentrací glukózy a hodnoty aplikovány do Clarkovy chybové síťové analýzy. Některé hodnoty odhadu vypočítané pomocí rovnice regresní křivky nebyly zahrnuty do grafu Clarkovy chybové síťové analýzy, protože jejich hodnota byla komplexním číslem. To proto, že hodnoty fáze φ byly příliš mimo interval spolehlivosti. Z grafu 4.14 je patrné, že měření není tak přesné jako měření s plnou krví. Tyto nepřesnosti jsou nejspíše způsobeny výše popsaným problémem stanovení reálné koncentrace. Tento problém by mohl být vyřešen nalezením vhodné metody pro stanovení glukózy v takto upraveném vzorku a možností odebrat malou část vzorku během měření, tak aby nebyly ovlivněny další parametry vzorku. Z grafů pro citlivost vyšla vždy stejná frekvence nejvyšší citlivosti senzoru na cca 1,82 GHz.

Vyhodnocení časové závislosti fáze vzorků je zobrazena v grafu 4.16. Je patrné, že se fáze v druhé polovině měření u většiny vzorků zásadně nemění, to potvrzuje domněnku, že se pravděpodobně výrazně nemění ani koncentrace glukózy ve vzorku. Do systému oběhu vzorku nelze v určitém čase vstříknout roztok glukózy, jak bylo provedeno při měření plné krve, a nelze zajistit správné promíchání vzorku, tak aby byla koncentrace glukózy v celém roztoku stejná. Proběhlo tedy smíchání roztoku s izolovanými krvinkami, vstříknuto do soustavy a zahájeno měření. Doba měření byla stanovena na cca 16 minut, aby odpovídala době po vstříknutí roztoku glukózy tedy 15 minut při měření plné krve. Výchyly z počátku měření, mohou být zapříčiněny nedostatečným udržením počáteční teploty a mírného ochlazení a následného ustálení.

Závěr

V rámci bakalářské práce byly vytvořeny dvě metody pro přípravu a měření vzorků prasečí krve-glukózy o různých koncentracích glukózy. Vzorky byly proměřeny pomocí vektorového analyzátoru obvodů přičemž byl měřen parametr přenosu S_{21} pro všechny připravené vzorky pomocí metamateriálového senzoru. Závislosti fáze φ S_{21} na koncentraci byly vyneseny do grafů a byly doplněné o regresní analýzu a interval spolehlivosti 0,95. Z těchto analýz je patrné, že většina hodnot spadá do určeného intervalu. Provedením Clarkovy chybové síťové analýzy bylo ověřeno, zda odhadnuté hodnoty koncentrace glukózy z rovnice regresní křivky odpovídají referenčním hodnotám koncentrace glukózy. Z této analýzy lze konstatovat, že k přesnějšímu stanovení došlo při měření plné krve. Avšak závislost fáze φ parametru S_{21} na frekvenci f se více blíží modelům krev-glukóza, roztoku izolovaných červených krvinek, PBS a glukózy. V budoucích práci je potřeba vyřešit problémy s měřením glykémie vzorku během měření, aby bylo zajištěno co nejpřesnější stanovení koncentrace glukózy ve vzorcích.

Reference

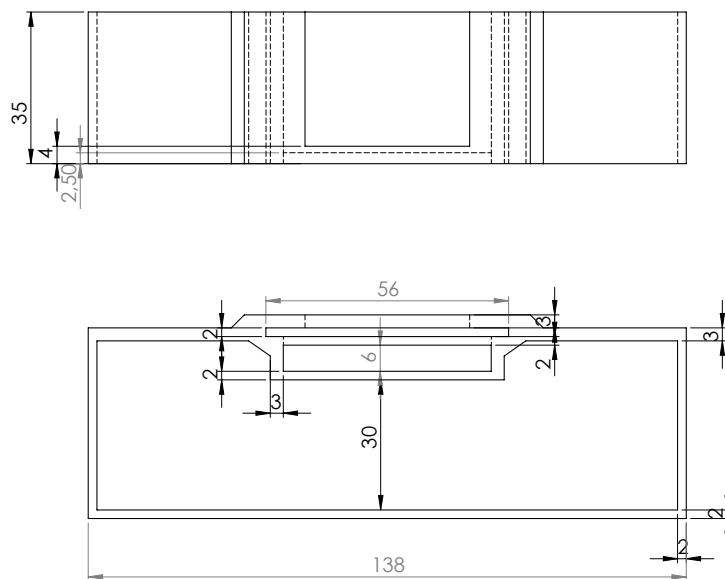
- [1] MATHERS, Colin D.; LONCAR, Dejan. *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS medicine, 2006, 3.11: e442.
- [2] RATHMANN, Wolfgang; GIANI, Guido. *Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the Year 2000 and Projections for 2030: Response to Wild et al.* Diabetes care, 2004, 27.10: 2568-2569.
- [3] GlucoTrack [online]. [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://www.glucotrack.com/about-glucotrack/>
- [4] Cnoga Medical [online]. [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <https://cnogacare.co/products/cog-info/>
- [5] GlucoWise [online]. [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://www.gluco-wise.com/>
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] PLATZER, Jan. *Mikrovlnný senzor pro stanovení koncentrace glukózy v krvi*. 2017. Diplomová práce.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] GREEN, Eric C. *Design of a microwave sensor for non-invasive determination of blood-glucose concentration*. 2005. PhD Thesis.

-
- [12] 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.
- [13] MCMILLIN JM, WALKER HK, HALL WD, HURST JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 141 Blood Glucose.
- [14] BROWNLEE, Michael. *The pathobiology of diabetic complications*. Diabetes, 2005, 54.6: 1615-1625.
- [15] DUNGAN, Kathleen, et al. *Glucose measurement: confounding issues in setting targets for inpatient management*. Diabetes care, 2007, 30.2: 403-409.
- [16] GOLDSTEIN, David E., et al. *Clinical application of glycosylated hemoglobin measurements*. Diabetes, 1982, 31.Supplement 3: 70-78.
- [17] 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.
- [18] CLARKE, William L. *The original Clarke error grid analysis (EGA)*. Diabetes technology & therapeutics, 2005, 7.5: 776-779.
- [19] 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.
- [20] MORTELLARO, Mark; DEHENNIS, Andrew. *Performance characterization of an abiotic and fluorescent-based continuous glucose monitoring system in patients with type 1 diabetes*. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 61: 227-231.
- [21] TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing as, 2003.
- [22] LANGMEIER, Miloš. *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978- 80-247-2526-0.

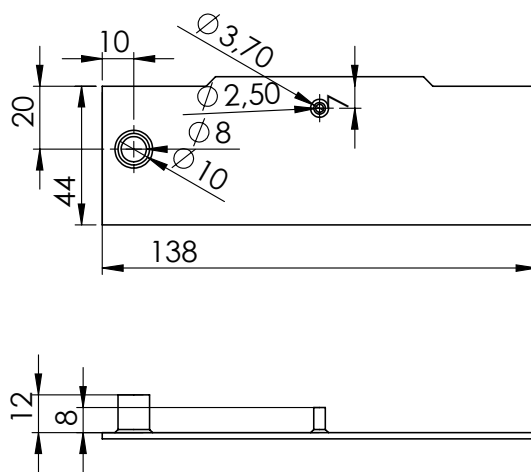
-
- [23] RAICU, Valerica; FELDMAN, Yuri. *Dielectric relaxation in biological systems: Physical principles, methods, and applications*. Oxford University Press, USA, 2015.
- [24] Irimajiri, A., Ando, M., Matsuoka, R., Ichinowatari, T., and Takeuchi, S. *Dielectric monitoring of rouleaux formation in human whole blood: a feasibility study*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1290: 207–209.
- [25] HAYASHI, Y., et al. *Dielectric inspection of erythrocytes*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2010, 356.11: 757-762.
- [26] MIKLAVČIČ, Damijan; PAVŠELJ, Nataša; HART, Francis X. *Electric properties of tissues*. Wiley encyclopedia of biomedical engineering, 2006.
- [27] MARTINSEN, Orjan G.; GRIMNES, Sverre. *Bioimpedance and bioelectricity basics*. Academic press, 2011.
- [28] SPURNÝ, Pavel. *Návrh suchých heterogenních fantomů pro mikrovlnné zobrazování a hypertermii pomocí numerických simulací*. 2016. Diplomová práce.
- [29] BUFF, P. Mark; STEER, Michael B.; LAZZI, Gianluca. *Cole-Cole dispersion models for aqueous gelatin-syrup dielectric composites*. *IEEE transactions on geoscience and remote sensing*, 2006, 44.2: 351-355.
- [30] CADUFF, A., et al. *Specific D-glucose influence on electric properties of cell membrane at human erythrocyte studied by dielectric spectroscopy*. *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108: 13827-13830.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] HEARD, Karen S.; FIDYK, Nancy; CARRUTHERS, Anthony. *ATP-dependent substrate occlusion by the human erythrocyte sugar transporter*. *Biochemistry*, 2000, 39.11: 3005-3014.

-
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] GUARIN, Gustavo, et al. *Miniature microwave biosensors: Noninvasive applications*. IEEE Microwave Magazine, 2015, 16.4: 71-86.
- [38] VNA measurment. Dostupné z http://labrf.av.it.pt/Data/Manuais%20%20Tutoriais/40b%20-%20VNA%20-%20ZVB20/CD/documents/Help_Files/WebHelp_ZVT/MMI_Reference/Trace/Measure/S-parameters.jpg
- [39] LAI, Anthony; ITOH, Tatsuo; CALOZ, Christophe. *Composite right/left-handed transmission line metamaterials*. IEEE microwave magazine, 2004, 5.3: 34-50.

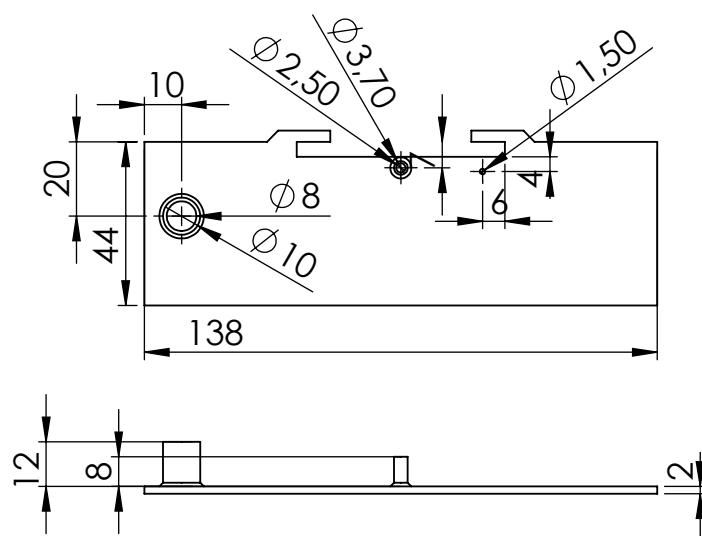
A Výkresy měřicí sestavy



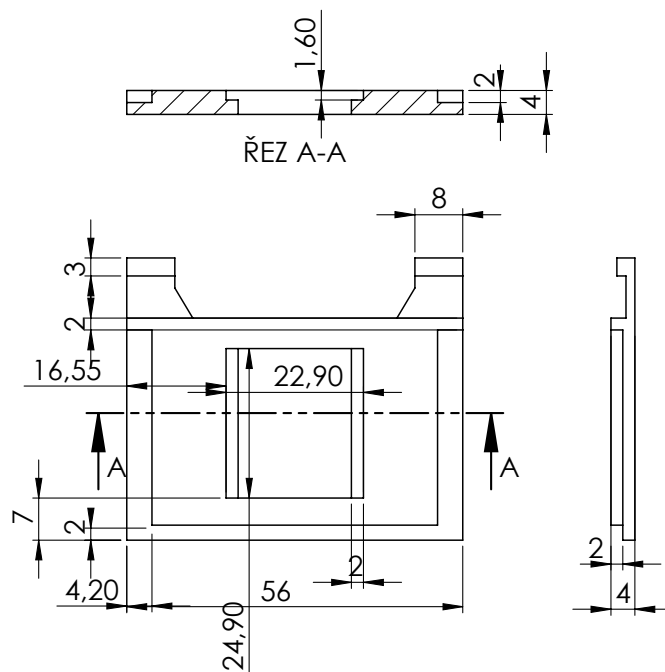
Obrázek A.1: Výkres sestavy - boční stěny.



Obrázek A.2: Výkres sestavy - horní podstava.

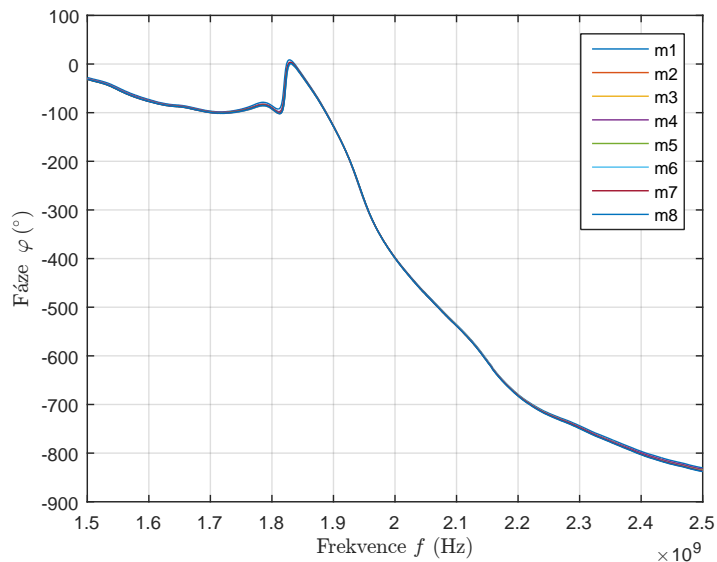


Obrázek A.3: Výkres sestavy – dolní podstava.

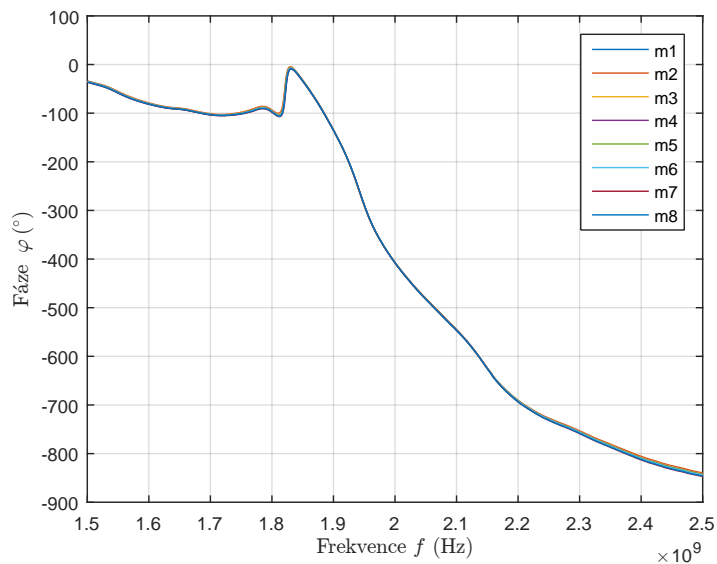


Obrázek A.4: Výkres sestavy – díl pro upevnění senzoru.

B Grafy závislosti fáze φ na frekvenci f pro různé koncentrace

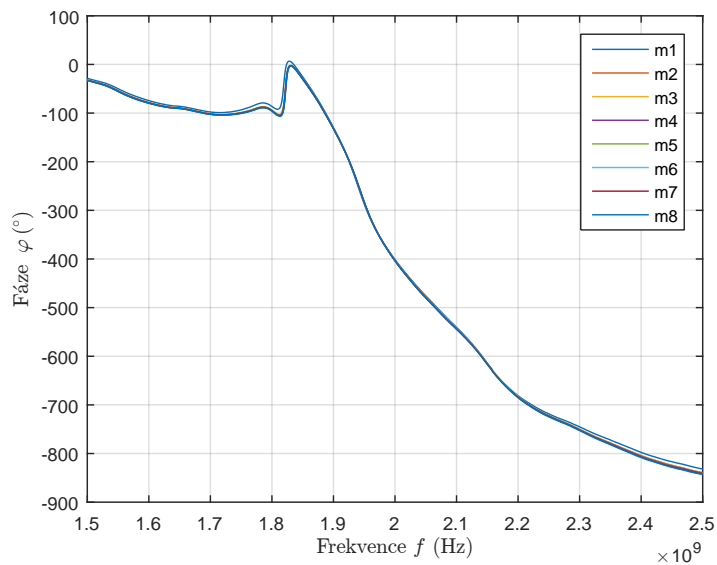


Obrázek B.1: Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro osm měření a koncentraci $c = 0$ mmol/l.

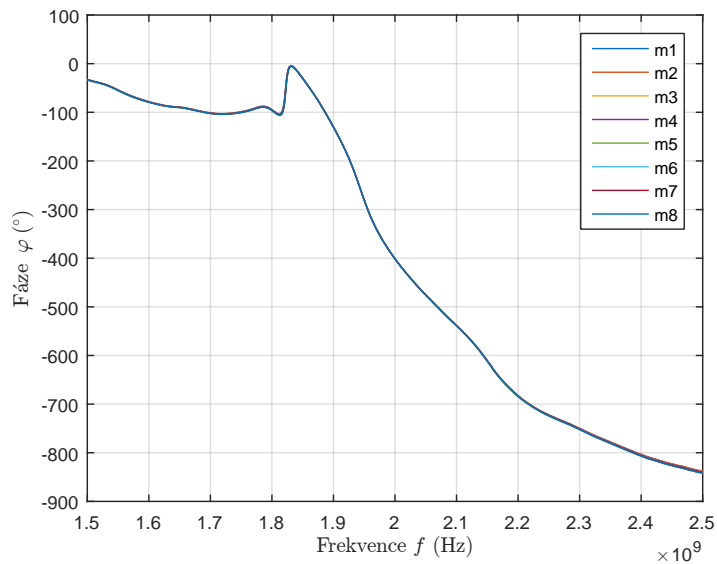


Obrázek B.2: Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro osm měření a koncentraci $c = 2$ mmol/l.

B GRAFY ZÁVISLOSTI FÁZE φ NA FREKVENCI f PRO RŮZNÉ KONCENTRACE

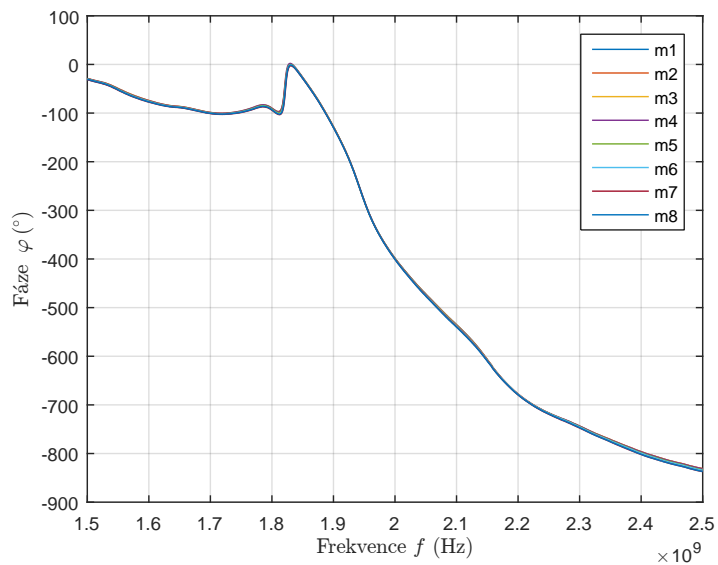


Obrázek B.3: Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro osm měření a koncentraci $c = 4 \text{ mmol/l}$.

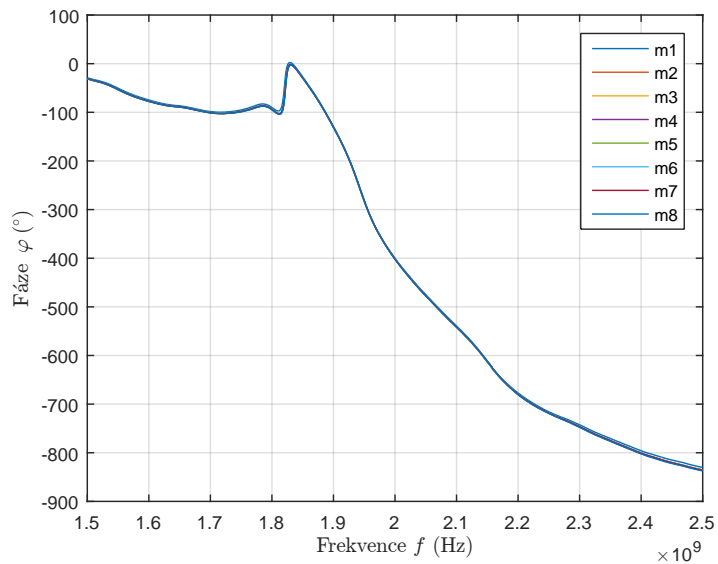


Obrázek B.4: Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro osm měření a koncentraci $c = 6 \text{ mmol/l}$.

B GRAFY ZÁVISLOSTI FÁZE φ NA FREKVENCI f PRO RŮZNÉ KONCENTRACE

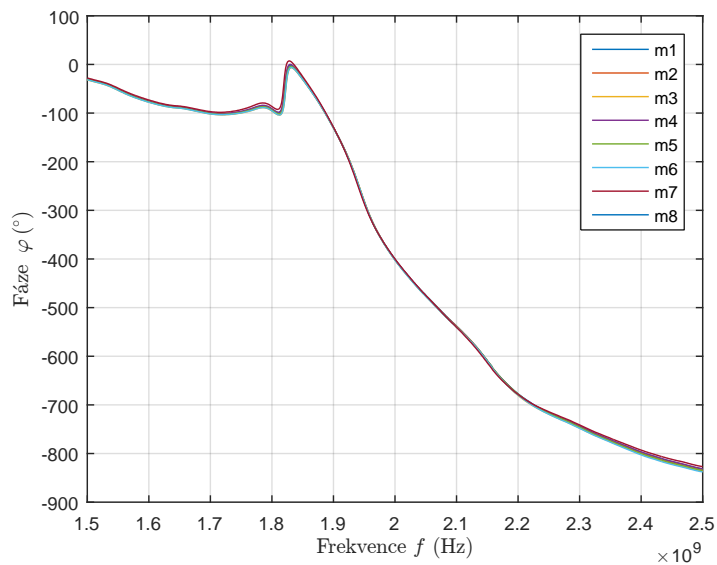


Obrázek B.5: Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro osm měření a koncentraci $c = 8$ mmol/l.

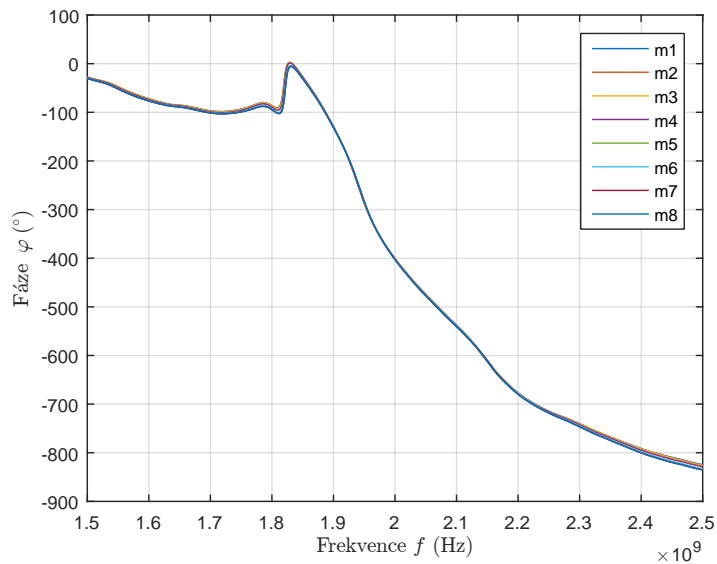


Obrázek B.6: Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro osm měření a koncentraci $c = 10$ mmol/l.

B GRAFY ZÁVISLOSTI FÁZE φ NA FREKVENCI f PRO RŮZNÉ KONCENTRACE

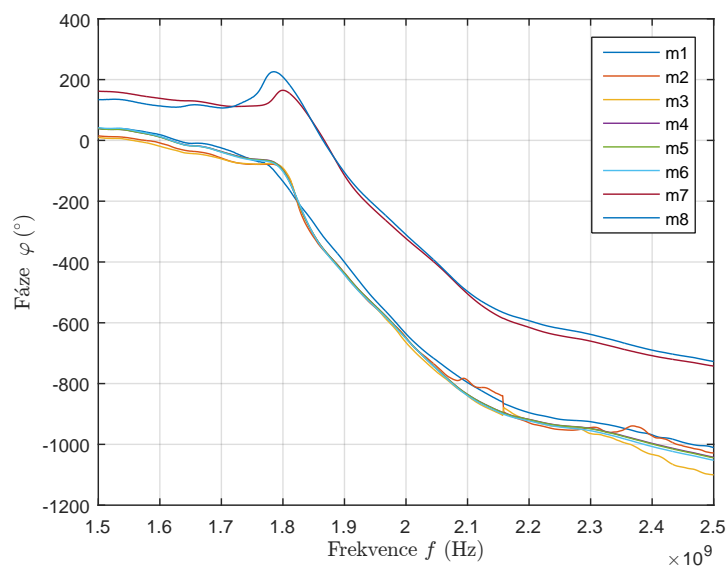


Obrázek B.7: Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro osm měření a koncentraci $c = 12$ mmol/l.

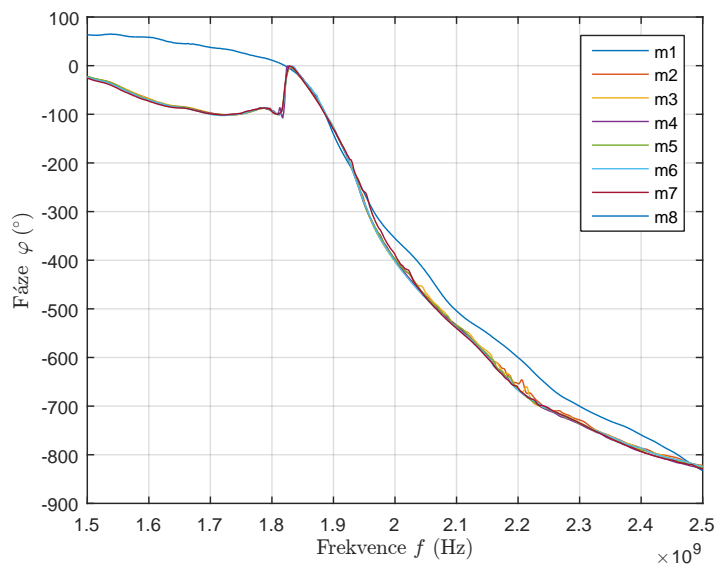


Obrázek B.8: Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro osm měření a koncentraci $c = 14$ mmol/l.

B GRAFY ZÁVISLOSTI FÁZE φ NA FREKVENCI f PRO RŮZNÉ KONCENTRACE



Obrázek B.9: Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro osm měření a koncentraci $c = 16$ mmol/l.



Obrázek B.10: Závislost změřené fáze φ na frekvenci f pro osm měření a koncentraci $c = 18$ mmol/l.