

Универзитет у Београду

Машински факултет

Јелена С. Мунђан

**Оптичко неинвазивно транскутано мерење
концентрације глукозе у крви**

Докторска дисертација

Београд, 2013

University of Belgrade
Faculty of Mechanical Engineering

Jelena S. Muncan

**Optical Noninvasive Transcutaneous Measurements of
Blood Glucose Concentration**

PhD thesis

Belgrade, 2013

Комисија за преглед и одбрану:

Ментор: Проф. Др Ђуро Коруга, редовни професор (у пензији)
Машински факултет, Универзитет у Београду

Чланови комисије: Др Александра Васић, коментор, редовни професор
Машински факултет, Универзитет у Београду

Др Лидија Матија, ванредни професор
Машински факултет, Универзитет у Београду

Др Радиша Јовановић, доцент
Машински факултет, Универзитет у Београду

Др Небојша Лалић, редовни професор
Медицински факултет, Универзитет у Београду

Датум одбране:

*“... to know that even one life has breathed easier because you have lived.
This is to have succeeded.”*

R.W. Emerson

Предговор

Докторска дисертација ” Оптичко неинвазивно транскутано мерење концентрације глукозе у крви” је рађена на модулу Биомедицинско инжењерство, Катедре за аутоматско управљање, Машинског факултета Универзитета у Београду. Експериментални део докторске дисертације рађен је у лабораторији Нанолаб, Машинског факултета у Београду, Центру за хипербаричну медицину у Београду, као и Лабораторији за Хиперспектрални имиџинг, Токијског института за технологију у Токију, Јапан. Рад на овој дисертацији делимично је и део пројекта ИИИ 45007 – Функционализација наноматеријала за добијање нове врсте контактних сочива и рану детекцију дијабетеса, финансираног од стране Министарства науке и просвете Републике Србије, и аутор се овом приликом захваљује Министарству на финансијској подршци. Аутор дисертације се такође захваљује Министарству науке и технологије Републике Србије за стипендирање у току прве две године докторских студија.

Докторска дисертација није само дело једног аутора, већ плод рада, дискусија и подршке много људи, којима дугујем захвалност.

Посебну захвалност желим да изразим свом професору и ментору на докторској дисертацији - проф. др Ђуру Коруги, од којег потиче и идеја о неинвазивном транскутаном мерењу глукозе у крви. Захваљујем се на иницијалној идеји, на поверењу да радим на развоју и унапређењу ове идеје, на бројним стручним савршавањима на којима сам била по његовом избору и препоруци, а која су ми

омогућила да стекнем знање и вештине потребне за реализацију ове идеје. Осим помоћи у стручном смислу, професору Коруги дугујем неизмерну захвалност на животним лекцијама, на подстицају, охрабрењу и критикама, за шансе које ми је пружио и толерисање мог „животног алгоритма”, за бројне лекције о реалности и за бројне путеве које ми је отворио као и за ентузијазам да се увек бавим науком и не одустајем („...кад ти се затворе врата, ти на прозор, ако не можеш кроз прозор, а ти кроз оцак ...”). Хвала Вам, професоре.

Такође се захваљујем, коментору проф. др Александри Васић – Миловановић и члану комисије проф. др Лидији Матија на корисним сугестијама и вођењу при изради ове дисертације.

Неизмерно се захваљујем дипл. маш. инж. Мариани Седлар и дипл. маш. инж Миодрагу Зарићу, као и особљу и пацијентима Центра за хипербаричну медицину у Београду, који су нам омогућили да експериментални део истраживања обавимо уз њихову сагласност. Заваљујем се сваком пацијенту који је пристао да учествује у овом истраживању и надам се да ова дисертација води ка реализацији уређаја који ће њима омогућити лакшу контролу и регулацију болести која их је погодила. Захваљујем се својим колегама са модула за Биомедицинско инжењерство, као и бројним студентима који су учествовали више пута као испитаници у истраживању – хвала вам на времену и вољи да ми помогнете и дате крв за напредак науке. Посебну захвалност дугујем страним студентима на Машинском факултету, који су упркос потенцијалним предрасудама пристали да учествују у испитивању и омогућили ми да метод испробам и на испитаницима са другом бојом коже.

Колегиницама Марији Томић дипл.инж. техн., мастер машинства, и Александри Дебељковић, дипл. инж.техн. дугујем захвалност на помоћи приликом припрема раствора глукозе. Колегама Ивану Ђуричићу маст.маш. и Душану Шарцу маст.маш. желим да се захвалим за помоћ приликом обављања експеримената и аквизиције спектра. Колегиници Ивани Милеуснић, маст.маш. се захваљујем на бројним дискусијама и подршци током израде ове дисертације.

Захваљујем се неизмерно господину Игору Коруги, CEO DIA Systems, USA, на финансијској подршци пре свега при мом школовању у трећој години докторских студија, као и набавци инструмената који су омогућили неопходна спектроскопска

мерења и развој уређаја, као и набавци софтвера за анализу. Осим тога, велику захвалност дугујем Игору за бројне, веома корисне сугестије и усмерења у току експерименталног рада и обраде података.

Такође се захваљујем проф. др Роумиани Тсенковој, из Лабораторије за Биомерења, са Кобе Универзитета у Јапану, где сам научила блиску инфрацрвену спектроскопију и нови научни приступ и метод Аквафотомике, као и Лабораторији за Хиперспектрални имиџинг и професору др Јукио Косугију, где сам радила један део експерименталних истраживања и учила обраду хиперспектралних слика.

Захваљујем се и члановима комисије: Др Радиши Јовановићу, доц. Машинског факултета Универзитета у Београду, Београду на коментарима и корисним критикама и Др Небојши Лалићу, редовном професору Медицинског факултета Универзитета у Београду на подршци и дискусији приликом дефинисања и при почетној фази израде дисертације.

На крају, хвала бескрајно мојој породици.

Садржај

Оптичко неинвазивно транскутано мерење концентрације глукозе у крви.....	i
Optical noninvasive transcutaneous measurement of blood glucose concentration	ii
Номенклатура	iii
Листа илустрација	v
Листа табела.....	xviii
1. Увод.....	1
1.1. Глукоза - основни термини и дефиниције	1
1.2. Систем регулисања нивоа глукозе у крви и метаболизма угљених хидрата	2
1.3. Преваленца дијабетеса у Србији и свету	11
1.4. Социо-економски аспекти епидемије дијабетеса.....	13
1.5. Циљ истраживања и мотивација.....	16
2. Преглед и анализа постојећег стања предмета изучавања	18
2.1. Уводна разматрања	18
2.2. Физиолошки аспекти	18
2.1. Мерење гликемије у клиничкој пракси.....	19
2.2. Инвазивне методе	21
2.3. Минимално – инвазивне методе.....	25
2.4. Неинвазивне методе.....	26
2.4.1.1. NIR сензор за мерење концентрације глукозе.....	32

2.5.	Преглед стандарда и статистичких метода за процену перформанси уређаја за мерење концентрације глукозе у крви	44
3.	Уочавање проблема и циљеви истраживања	57
3.1.	Методe за неинвазивно мерење гликемије – нерешена питања	57
3.2.	Избор места мерења.....	58
3.3.	Мотивација и циљеви истраживања.....	60
3.4.	Циљеви истраживања	62
4.	Материјал	64
4.1.	Глукоза.....	64
4.2.	Крв и крвни судови.....	73
4.3.	Кожа	78
4.4.	Припрема материјала за испитивања	84
5.	Методe и технике.....	87
5.1.	<i>Accu Check Active</i> – референтна метода	87
5.2.	vis - NIR спектроскопија	91
5.3.	Блиска инфрацрвена спектроскопија и Аквафотомика	94
5.3.4.1.	<i>Препроцесирање података</i>	98
5.3.4.2.	<i>Анализа главних компоненти – PCA (Principal Component Analysis)</i>	100
5.3.7.1.	<i>Вода и блиска инфрацрвена спектроскопија</i>	105
5.3.7.2.	<i>vis-NIR спектроскопија водених система</i>	106
5.3.7.3.	<i>Аквафотомика – основни термини и дефиниције</i>	109
5.3.7.4.	<i>Координате водене матрице – WAMACS (Water Matrix Coordinates)</i>	109

5.3.7.5.	<i>Акваграм</i>	111
5.4.	Хиперспектрални имицинг	112
5.5.	FTIR спектроскопија са микроскопијом	113
5.6.	Опто – магнетна имицинг спектроскопија	115
5.7.	Инструментација и опрема.....	117
5.8.	Обрада спектралних података.....	133
6.	Протокол истраживања	142
6.1.	Глукоза у чврстом стању	142
6.2.	Раствори глукозе у праху	142
6.3.	Испитивања крви	145
6.4.	In vivo испитивања – уређај B53-2UV.....	146
6.5.	In vivo испитивања – уређај B60.....	146
6.6.	In vivo испитивања - Хиперспектрални имицинг	146
6.7.	In vivo испитивања – FTIR спектроскопија са оптичким влакнима	148
7.	Резултати истраживања.....	151
7.1.	Глукоза у чврстом стању	151
7.2.	Раствори глукозе у праху	154
7.3.	Линеарна регресија методом најмањих квадрата примењена на опто-магнетне имицинг спектре водених раствора глукозе у праху	163
7.3.5.1.	<i>Референца - ваздух</i>	173
7.3.5.2.	<i>Референца вода (Aqua Purificata)</i>	177

7.3.5.3. FTIR спектроскопија: раствори глукозе – референца вода, концентрације од 4-30mmol/l	181
7.4. 2Д корелациона спектроскопија водених раствора глукозе.....	182
7.5. In vitro испитивања крви	184
7.6. In vivo испитивања – апарат B53-2UV	187
7.7. In vivo испитивања опто-магнетном имицинг спектроскопијом апарат WP – B60	195
7.8. In vivo испитивања – хиперспектрални имицинг.....	202
7.9. In vivo испитивања – FTIR спектроскопија	220
8. Анализа и дискусија резултата.....	232
8.1. Дискусија резултата истраживања	232
8.2. Анализа резултата водених раствора глукозе	233
8.3. Анализа резултата <i>in vitro</i> испитивања крви	235
8.4. Анализа резултата <i>in vivo</i> испитивања	236
9. Закључак.....	242
10. Литература	246
Биографија кандидата.....	261

Оптичко неинвазивно транскутано мерење концентрације глукозе у крви

Апстракт. Мерење концентрације глукозе у крви је једна од неопходних процедура у терапији и контроли дијабетеса, и најчешће коришћена метода подразумева узорковање капиларне крви из прста – што је инвазивно, болно и временом доводи до оштећења коже. Безболна гликемијска контрола би омогућила побољшање квалитета живота особа са дијабетесом и спречила појаву хипогликемијских и хипергликемијских епизода. Иако истраживачке групе широм света већ деценијама покушавају да развију неинвазивну методу са довољном специфичношћу, сензитивношћу и тачности, до данас није дошло до развоја и комерцијалне употребе ниједног таквог уређаја. Предмет истраживања ове дисертације је анализа постојећег стања и проналажење адекватне методе на бази интеракције светлости и коже, преко које се на неинвазиван начин може, на основу сигнала или слике доћи до информације о вредности концентрације глукозе у крви. У дисертацији је испитиван потенцијал неколико већ постојећих спектроскопских метода као и имицининг метода (у видљивом, блиском инфрацрвеном и средњем инфрацрвеном региону) у сврху аквизиције и издвајања сигнала карактеристичног за глукозу и мерење њене концентрације, а такође је развијена метода и алгоритам опто-магнетне имицининг спектроскопије која на бази RGGB слике омогућује за испитанике који већ постоје у бази мерење концентрације глукозе на основу опто-магнетног спектра коже и крвних судова испитаника.

Кључне речи: глукоза, транскутано, неинвазивно мерење, оптичко, спектроскопија, имицининг, Брустеров угао

Научна област: Машинство

Ужа научна област: Биомедицинско инжењерство

UDK: 681.785.5:616.153(043.3) 43.42:616-008(043.3)

Optical noninvasive transcutaneous measurement of blood glucose concentration

Abstract. The determination of the blood glucose level is a necessary procedure in diabetes therapy, where the most common technique involves finger-prick capillary measurements, which is invasive, uncomfortable and gradually leads to skin damage. Painless glycemic control would improve the quality of life of patients by increasing compliance to monitoring blood glucose levels and thus hyper- and hypoglycemic episodes. Although research groups have been trying for decades to separate non-invasive glucose information from interference compounds, none of the available commercial devices offers enough specificity, sensitivity, and accuracy to replace lancet derived readings. The subject of this thesis is to analyze the present state of art in this field and find better methods based on interaction of light and skin, through which a non-invasive method can be based on the signal or image to get information about the concentration of glucose in the blood. The dissertation examines the potential of several existing spectroscopic methods and imaging methods (in the visible, near-infrared and mid-infrared region) for the acquisition and allocation of characteristic signals of glucose and measuring of its concentration. It also examines a newly developed methods and algorithms of opto-magnetic imaging spectroscopy, which is based on RRGB images and allows for respondents who already exist in the database measurements of glucose concentration based on the opto-magnetic spectrum of the skin.

Keywords: glucose, transcutaneous, non-invasive measurement, optics, spectroscopy, imaging, Brewster's angle

Scientific discipline: Mechanical engineering

Scientific subdiscipline: Biomedical engineering

UDK: 681.785.5:616.153(043.3) 43.42:616-008(043.3)

Номенклатура

2DcoS	Дводимензионална корелациона спектроскопска анализа
ADA	Америчка асоцијација за дијабетес
ATR	Атенуирана (минимизирана) тотална рефлексација
CLSI	Институт за клиничке и лабораторијске стандарде
DNK	Дезоксирибуноклеинска киселина
DRS	Диелектрична релаксациона спектроскопија
EGA	Кларкова мрежна анализа грешака (Error Grid Analysis)
FDA	Америчка администрација за храну и лекове
FTIR	Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом
GDH	Глукоза дехидрогеназа
GIP	Глукозно зависни инсулинотропични пептид
GLP-1	Глукагону сличан пептид
GLUT	Натријум независни транспортери за глукозу
GOD-PAP	Тест на глукозу оксидазу у капиларној плазми
HbO ₂	Оксихемоглобин
HgbA1C	Гликолизирани хемоглобин
HSI	Хиперспектрални имиџинг
IDDM	Инсулин-зависни дијабетес
IDF	Међународна федерација за дијабетес
ISO	Интернационална организација за стандардизацију
MIR	Средњи инфрацрвени регион
MSC	Мултипликативна корекција расејања
NIDDM	Инсулин-независни дијабетес
NIR	Блиски инфрацрвени регион (800nm-2500nm)
NMR	Нуклеарна магнетна резонанца

OMIS	Опто-магнетна имицинг спектроскопија
PCA	Анализа главних компоненти (Principal Component Analysis)
PLSR	Парцијална регресија методом најмањих квадрата (Partial Least Squares Regression)
PQQ	Пироло квинолин квинон
R ²	Коефицијент регресије
RGB	R – Црвена(Red) G – Зелена (Green) B – Плава (Blue)
RMSEC	Корен средње квадратне грешке калибрације
RMSEV	Корен средње квадратне грешке валидације
SGLT	Натријум зависни транспортери за глукозу
SNV	Стандардна нормализација варијансом
SWIR	Кратко таласни блиски инфрацрвени регион (950nm-1700nm)
THz	Терахерц спектроскопија
UV	Ултраљубичаста област електромагнетног спектра
VIS	Видљива област електромагнетног спектра (400-700nm)
Vis-NIR	Видљиви и блиски инфрацрвени регион електромагнетног спектра (300nm-1000nm)
VNIR	Видљиви и блиски инфрацрвени регион електромагнетног спектра (400nm-1000nm)
WAMACS	Координате водене мреже (Water Matrix Coordinates)
WHO	Светска здравствена организација
WP-B53	Уређај за Опто-магнетну имицинг спектроскопију са осветљењем под Брустеровим углом од 53°
WP-B53-2UV	Уређај за Опто-магнетну имицинг спектроскопију са осветљењем под Брустеровим углом од 53°, и две врсте ултраљубичастог осветљења (365nm, 385nm)
WP-B60	Уређај за Опто-магнетну имицинг спектроскопију са осветљењем под Брустеровим углом од 60°

Листа илустрација

Слика 1. Молекуларна структура глукозе: ланац и прстен (адаптирано из [1])	1
Слика 2. Стероизомери глукозе: D – глукоза и L – глукоза (адаптирано из [2]).....	1
Слика 3. Метаболизам глукозе.....	4
Слика 4. Инсулински рецептори на нормалној инсулински-сензитивној ћелији (лево) и инсулински-резистентној ћелији (десно) [6]	8
Слика 5. Микрофотографије нормалне људске ретине (слево) и ретине дијабетичара на којој се виде бројне капиларне анеуризме (десно) [7].....	11
Слика 6. Процена преваленце дијабетеса код одраслих особа (20-79 година) у свету у 2030. години [11]	12
Слика 7. Водећи узроци умирања у Србији 1990., 2000., и 2010. године [12]	13
Слика 8. (лево) Структура генералних трошкова индивидуе са дијабетесом типа 2; (десно) Структура генералних трошкова медикамената за особу са дијабетесом типа 2 (на основу података из [16])	15
Слика 9. Укупна вредност потрошње лекова праћене популације болесника у 2007.години по фармакотерапијским групама: 1. Лекови који делују на кардиоваскуларни систем, 2. Лекови који делују на око, 3. Инсулини и аналози, 4. Лекови који делују на нервни систем, 5. Орални антидијабетици, 6. Лекови за лечење болести респираторног система, 7. Лекови за лечење болести дигестивног система и метаболизма, 8. Антиинфективни лекови за системску примену, 9. Антиинфламаторни и антиреуматски лекови, 10. Остали лекови (адаптирано на основу [18])	16
Слика 10. Предности континуалног праћења (пуна плава линија) у односу на дискретна, индивидуална мерења на сваких неколико сати (плави квадратићи). Континуални мониторинг обезбеђује континуалну правовремену информацију о нивоу глукозе у крви, у реалном времену, док традиционално дискретно одређивање нивоа глукозе носи са собом ризик превиђања епизода хипергликемије и хипогликемије. Снимање ових догађаја омогућило би пацијенту да реагује на време и избегне компликације.	20
Слика 11. Различити брендови уређаја за самоконтролу гликемије (Roche, Lifescan, Bayer, Arkray, Allmedicus idr) [22]	22

Слика 12. Принцип рада и коришћења уређаја за самоконтролу гликемије (адаптирано на основу [25])	23
Слика 13. Схематски дијаграм електрохемијског сензора за глукозу (адаптирано на основу [26])	24
Слика 14. Схематски дијаграм оптичког сензора за мерење глукозе (на основу [27])	24
Слика 15. CGMS System Gold минимално-инвазиван глукометар компаније Medtronic MiniMed. Сензор се поставља под кожу у пределу абдомена и врши праћење нивоа глукозе у интерстицијској течности непрекидно и до 72 часа: А- сензор, Б-сензор инсертер, Ц-монитор који је у вези са рачунаром [30]	26
Слика 16. Класификација метода за мерење глукозе	27
Слика 17. Неинвазивни сензор за мерење концентрације глукозе заснован на методи окузионе спектроскопије NBM 200 MP, OrSense Ltd. [35]	30
Слика 18. GlucoWatch – уређај за неинвазивно мерење глукозе методом реверзне јонтофорезе [58, 59]	34
Слика 19. Pendra, уређај за неинвазивно мерење глукозе на принципу биоимпедансне спектроскопије [68]	37
Слика 20. Пример равански поларизоване светлости (прерађено на основу [3])	41
Слика 21. Пример Кларкове мрежне анализе грешака [95]	47
Слика 22. Дугорочни исходи коришћења глукометара за самоконтролу код дијабетеса типа 2 [100] .	58
Слика 23. 3D модел молекула глукозе.....	64
Слика 24. D – глукоза (декстроза) – ланчана структура. Алдехидна група је на првом угљениковом атому. Глукоза је хексоза тј. има 6 угљеникових атома.	65
Слика 25. (а) α – D – глюкопираноза, (б) β – D – глюкопираноза.....	65
Слика 26. Преглед функционалних група које апсорбују у NIR региону. У овој области, апсорпционе траке глукозе су везане за вибрације функционалних група C–H, O–H, и N–H.....	67
Слика 27. Упрошћени приказ апсорпционог спектра глукозе: положаји фундаменталног тона глукозе, виших тонова и комбинационих трака (на основу података из литературе [3]).....	68

Слика 28. Спектар чисте воде и водених раствора глукозе растуће концентрације [108].....	69
Слика 29. NIR спектар раствора воде и глукозе различитих концентрација (од 0-60%). У спектру воде максимум на 1928nm одговара апсорпцији воде, док пик у региону од 1800-2100nm одговара комбинационој траци [109].....	70
Слика 30. Средњи инфрацрвени спектар дво, тро и четворо-компонентних раствора [111]. Водени раствор глукозе дат је спектром плаве боје.	72
Слика 31. Синхрона и асинхрона корелациона мапа водених раствора глукозе у опсегу хуманих физиолошких вредности [111]	72
Слика 32. Састав крви	74
Слика 33. Структура зидова крвних судова – вена и артерија	75
Слика 34. Коefицијенти оптичке апсорпције најважнијих ткивних хромофора у опсегу 0.1 – 12 μm [115]	76
Слика 35. МИР апсорпциони спектар за неке конституенте серума [116].....	77
Слика 36. Структура коже са основним слојевима [117].....	78
Слика 37. Структура епидермиса [122]	79
Слика 38. Оптичка својства коже зависе не само од структурних компоненти коже, већ и крвних судова и крви	80
Слика 39. Однос редукованог коefицијента расејања и коefицијента апсорпције људске коже. За таласне дужине мање од 450nm и веће од 1800 nm, апсорпција од стране хемоглобина и протеина у ултраљубичастој, воде у средњој и далекој инфрацрвеној области доминантно одређује оптичка својства коже [115].....	83
Слика 40. Лабораторијска опрема за припрему пасте.....	85
Слика 41. NaCl плочице за наношење филма	86
Слика 42. Ручна хидраулична преса и схематски приказан поступак прављења пелета на KBr плочицама	86
Слика 43. Систем <i>Accu Check Active</i>	87

Слика 44. Бланд-Алтманов графикон Accu Chek Active система. Релативне разлике изражене процентуално, између индивидуалних резултата мерења Accu Chek Active система и коресподентних резултата мерења референтном методом приказана су у односу на средњу вредност резултат мерења обеју метода . X оса представља средњу вредност резултата мерења добијених једном и другом методом, а Y оса представља разлике између ових двеју вредности дате у процентима. Пуна линија на 0% разлика је линија идентичних мерења, пуна тамно плава линија представља биас, а испрекидане светло плаве линије представљају 95% од граница прописаних стандардом [97].	89
Слика 45. Оцена тачности мерења Accu Chek Active система, поређењем са референтном методом GOD – PAP*.	90
Слика 46. Бер – Ламбер - Беров закон	92
Слика 47. Рефлектансни мод мерења (а) и трансмитансни мод (б)	93
Слика 48. Видљива и блиска инфрацрвена област електромагнетног зрачења	94
Слика 49. Схема експерименталне инсталације за блиску инфрацрвену спектроскопију	96
Слика 50. Типичан изглед лампе, кућишта и спектрална дистрибуција волфрам халогенског извора светлости	96
Слика 51. Различити модови мерења у NIR спектроскопији: (А,Б) трансмитанса, (Ц) дифузна рефлектанса, (Д,Е) транффлектанса	97
Слика 52. Пример препроцесирања спектра и уклањања варијавија у офсету базне линије применом мултипликативне корекције расејања (MSC)	99
Слика 53. Принцип Савицки-Голеј полиномијалног алгоритма	99
Слика 54. Примена Савицки-Голеј алгоритма за заглађивање спектра на примеру NIR спектра добијених обрадом хиперспектралне слике: спектри пре препроцесирања (лево) и после препроцесирања (десно)	100
Слика 55. Илустрација принципа анализе главних компоненти на примеру спектра састављеног од три таласне дужине	101
Слика 56. Електромагнетни спектар воде [104].	106
Слика 57. Молекули воде се прилагођавају молекулима који се у њој налазе и заузимају одређене конфигурације које се могу открити преко vis-NIR спектра воденог раствора.	108

Слика 58. Пример акваграма	111
Слика 59. Хиперспектрална слика – сваком пикселу хиперспектралне слике одговара један спектар [138]	112
Слика 60. Употреба интерферометра за мерење FTIR интерферограма	114
Слика 61. Експериментална поставка за трансмисиона мерења, Нанолаб, Машински факултет у Београду	118
Слика 62. Експериментална поставка за рефлексиона мерења, Нанолаб, Машински факултет у Београду	118
Слика 63. Експериментална поставка за мерење апсорпције зрачења у блиском инфрацрвеном региону, Нанолаб, Машински факултет у Београду	119
Слика 64. Схема експерименталне инсталације, HSI lab, TiTech, Токуо	120
Слика 65. Perkin Elmer FTIR Spotlight 400, Нанолаб, Машински факултет у Београду	121
Слика 66. Аквизиција спектра приликом in vivo истраживања	121
Слика 67. Предња и задња страна уређаја WP-B53-2UV, са назначеним основним деловима. Разлика у кућиштима уређаја WP-B53, WP-B60, и WP-B53-2UV је само у томе што имају дуални прекидач (са две позиције) за измену осветљења са белог дифузног светла у бело дифузно светло под Брустеровим углом, док је код уређаја приказаног на слици прекидач са 4 позиције, који омогућује још промену два осветљења у ултраљубичастој области	122
Слика 68. Принципијелна схема рада уређаја за аквизицију дигиталних фотографија узорака опто-магнетном методом.	123
Слика 69. Спектрална карактеристика LED диода које обезбеђују белу дифузну светлост и ултраљубичасту светлост у уређајима за опто-магнетну спектроскопију	123
Слика 70. Уређај за опто-магнетну спектроскопију – фиксна позиција на црној кутији у коју се поставља узорак, Нанолаб, Машински факултет у Београду	124
Слика 71. Изабрано место мерења на руци испитаника obeжено је црним кругом (горе). Дигиталне фотографије коже испитаника – под белим дифузним светлом и под белим дифузним светлом под Брустеровим углом (доле лево и доле десно, респективно). Црвени квадрати представљају исецане	

делове фотографије на којима је издвојено место на којем се види крвни суд и на којем се види само кожа. Ови исечани делови дигиталне фотографије коришћени су у даљој обради.	126
Слика 72. Хистограми за плави канал беле и поларизоване фотографије (Софтвер Corel Photo Paint)	128
Слика 73. Спектри плавог и црвеног канала за пар дигиталних фотографија коже у белој дифузној и белој поларизованој светлости	130
Слика 74. Конволутивни спектар црвеног и плавог канала – јединствени „фингерпринт“ узорка	130
Слика 75. Дубина пенетрације у кожу светлости различитих таласних дужина.....	130
Слика 76. Дубина оптичке пенетрације светлости δ у кожу у опсегу од 400 – 2000nm [146].....	131
Слика 77. Уклањање утицаја оптичких карактеристика коже и добијање спектра крвног суда методом опто-магнетне имидинг спектроскопије	131
Слика 78. Схематски приказ процедуре добијања спектра коже са видљивим крвним судом, затим спектра саме коже и најзад, одузимањем спектра коже од спектра коже са видљивим крвним судом добија се спектар само крвног суда	132
Слика 79. Препроцесирање података. Подаци за сваку променљиву представљени су преко њене средње вредности и варијансе: а) Просечан изглед већине сирових података, б) Резултат након осредњавања, в) Резултата након скалирања варијансом, г) Резултат након осредњавања и скалирања варијансом (на основу [147])	133
Слика 80. Пример PLSR редукције димензионалности где t_1 замењује x_1 и x_2 с обзиром да се они налазе у снажној корелацији	136
Слика 81. Одређивање оптималног броја тежинских фактора у регресионом моделу	138
Слика 82. Схематска контурна мапа синхроног 2Д корелационог спектра	140
Слика 83. Схематска контурна мапа асинхроног 2Д корелационог спектра	141
Слика 84. Регион ручног зглоба са видљивим крвним судовима који је сликан хиперспектралном камером за потребе експеримента	147
Слика 85. Локације на руци са којих је вршена аквизиција спектра помоћу оптичких фајбера – 1) врх прста са којег је узимана кап капиларне крви за мерење концентрације глукозе стандардном метдом,	

2) корен прста, 3) доњи спољни део длана, 4) регион испод зглоба шаке са видљивим крвним судовима.....	149
Слика 86. Сирови спектри рефлектансе глукозе у праху и стандарда белог	151
Слика 87. Рефлектанса глукозе у праху (изражено у процентима у односу на тоталну рефлектансу добијену за стандард белог)	152
Слика 88. ATR FTIR спектар чисте глукозе у праху.....	153
Слика 89. Трансмитанса чисте воде и водених раствора глукозе у праху различитих концентрација	154
Слика 90. Абсорбанса чисте воде и водених раствора глукозе у праху различитих концентрација ...	155
Слика 91. Абсорбанса чисте воде и водених раствора глукозе у праху различитих концентрација – увећан део у региону око 1450nm	155
Слика 92. Акваграм чисте воде и водених раствора глукозе различите концентрације.....	157
Слика 93. Акваграм чисте воде и водених раствора глукозе већих концентрација	157
Слика 94. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри само за плави канал РГБ дигиталне слике воденог раствора глукозе добијени одузимањем поларизоване слике од беле слике	158
Слика 95. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри само за зелени канал РГБ дигиталне слике воденог раствора глукозе добијени одузимањем поларизоване слике од беле слике	159
Слика 96. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри само за црвени канал РГБ дигиталне слике воденог раствора глукозе добијени одузимањем поларизоване слике од беле слике	159
Слика 97. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри при чему је одузиман плави канал од црвеног канала РГБ беле и поларизоване дигиталне слике	160
Слика 98. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри само за плави канал РГБ дигиталне слике воденог раствора глукозе добијени одузимањем поларизоване слике од беле слике	161

Слика 99. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри само за зелени канал РГБ дигиталне слике воденог раствора глукозе добијени одузимањем поларизоване слике од беле слике	161
Слика 100.. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри само за црвени канал РГБ дигиталне слике воденог раствора глукозе добијени одузимањем поларизоване слике од беле слике	162
Слика 101. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри при чему је одузиман плави канал од црвеног канала РГБ беле и поларизоване дигиталне слике	162
Слика 102. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 3....	163
Слика 103. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре водених раствора глукозе сниманих под Брустеровим углом Б60	164
Слика 104. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 5....	165
Слика 105. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре водених раствора глукозе сниманих под Брустеровим углом Б53	166
Слика 106. Редуковани део спектра водених раствора глукозе који је коришћен у анализи	167
Слика 107. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 5....	168
Слика 108. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за NIR спектре водених раствора глукозе	168
Слика 109. Одређивање оптималног броја фактора у моделу на основу стандардне грешке валидације. Процењено је да је оптималан број фактора у моделу 2.....	171
Слика 110. Резултати фитовања израчунатих концентрација глукозе у воденим растворима и номиналних вредности.. Модел показује висок степен тачности.	172
Слика 111. FTIR ATR спектри водених раствора глукозе при чему је као референца узиман ваздух	174
Слика 112. Увеличани регион фундаменталних вибрација глукозе	174

Слика 113. Увеличани регион спектра водених раствора глукозе различите концентрације (опсег од 5-1000mmol/l).....	175
Слика 114. График стандардне грешке валидације. Најмања вредност грешке је за 5 оптималних фактора.....	176
Слика 115. Резултати фитовања модела за номиналне и предвиђене вредности концентрације глукозе водених раствора за ИР спектре.....	176
Слика 116. За мање концентрације глукозе у воденим растворима губи се линеарна законитост	177
Слика 117. Спектри водених раствора глукозе када је референца чиста вода	178
Слика 118. Увеличани део спектра водених раствора концентрације 20 и 25mmol/l	179
Слика 119. Спектри водених раствора глукозе када је референца чиста вода	180
Слика 120. Оптимала број фактора у моделу процењен је да је 4	181
Слика 121. Резултати фитовања модела за номиналне и предвиђене вредности концентрације глукозе водених раствора за ИР спектре.....	182
Слика 122. Синхрони корелациони спектар водених раствора глукозе за средњи ИР регион (softver 2DShige).....	183
Слика 123. Асинхрони корелациони спектар водених раствора глукозе за средњи ИР регион (softver 2DShige).....	183
Слика 124. График стандардне грешке валидације. Најмања вредност грешке је за 7 оптималних фактора.....	185
Слика 125. Резултати фитовања модела за измерене и предвиђене вредности концентрације глукозе водених раствора.....	186
Слика 126. Апсорпциони спектри у средњем инфрацрвеном региону за 5 узорака крви различите концентрације	187
Слика 127. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 2....	188
Слика 128. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val).....	188

Слика 129. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда	189
Слика 130. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 2....	190
Слика 131. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре коже и крвног суда снимане под UV1 осветљењем	191
Слика 132. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда	192
Слика 133. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 2....	193
Слика 134. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре коже и крвног суда снимане под UV2 осветљењем	193
Слика 135. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда	194
Слика 136. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 3....	195
Слика 137. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре коже снимане под Брустеровим углом од 60°	196
Слика 138. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда	197
Слика 139. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4....	198
Слика 140. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре коже и крвног суда сниманих под Брустеровим углом од 60°	198
Слика 141. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда	199
Слика 142. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4....	200

Слика 143. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре коже и крвног суда сниманих под Брустеровим углом од 60°	201
Слика 144. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда	201
Слика 145. Издвојени региони са хиперспектралне слике са којих су издвојени спектри крвног суда, односно коже	202
Слика 146. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 3....	204
Слика 147. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за хиперспектралне слике коже у SWIR региону	204
Слика 148. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда	205
Слика 149. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 3....	206
Слика 150. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за хиперспектралне слике коже и крвног суда у SWIR региону	207
Слика 151. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда	208
Слика 152. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4....	209
Слика 153. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за хиперспектралне слике крвног суда у SWIR региону	209
Слика 154. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда	210
Слика 155. Регресиони вектор за PLSR модел развијен на основу спектра са хиперспектралне слике крвног суда у SWIR региону	211
Слика 156. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4....	212

Слика 157. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за хиперспектралне слике коже у VNIR региону	213
Слика 158. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда	214
Слика 159. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4....	215
Слика 160. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за хиперспектралне сликекоже и крвног суда у SWIR региону	216
Слика 161. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда	216
Слика 162. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4....	218
Слика 163. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за хиперспектралне слике крвног суда у VNIR региону	218
Слика 164. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда	219
Слика 165. Регресиони вектор за PLSR модел развијен на основу спектра са хиперспектралне слике крвног суда у VNIR региону	219
Слика 166. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4....	221
Слика 167. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за FTIR спектре крвног суда.....	221
Слика 168. Регресиони вектор за модел линеарне регресије над спектрима крвног суда	223
Слика 169. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда	224
Слика 170. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4....	225
Слика 171. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за FTIR спектре спољног дела длана	226

Слика 172. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4.... 228

Слика 173. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за FTIR спектре коже у корену средњег прста 228

Слика 174. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4.... 230

Слика 175. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за FTIR спектре јагодице прста из којег је вађена крв 230

Листа табела

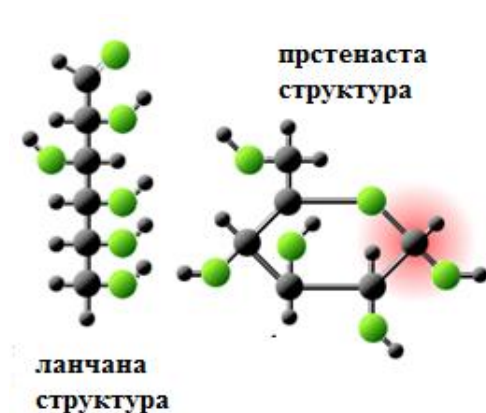
Табела 1. Ефекти примарних глукорегулаторних хормона [5]	6
Табела 2. Нивои глукозе у системском крвотоку и последице [19].....	19
Табела 3. Компаније које се баве истраживањем и развојем неинвазивних глукометара	28
Табела 4. Објављени стандарди за мерење глукозе [92].....	46
Табела 5. Резултати оцене тачности система за мерење концентрације глукозе у крви (адаптирано из [97]).....	51
Табела 6. Избор различитих места мерења концентрације глукозе у људском организму	59
Табела 7. Материјал коришћен у испитивањима.....	84
Табела 8. Елементи сензорског система Accu Chek Active (извод из [136]).....	88
Табела 9. Опрема коришћена у истраживањима	117
Табела 10. Карактеристике хиперспектралних сензора.....	119
Табела 11. Нодина правила [150]	141
Табела 12. Номиналне вредности концентрације водених раствора глукозе у праху и измерене, стварне концентрације добијене помоћу Accu Chek Active система	143
Табела 13. Опсег вредности концентрације глукозе у воденим растворима за FTIR ATR мерења	143
Табела 14. Концентрације водених раствора глукозе коришћених у експерименту.....	144
Табела 15. Протокол испитивања опто-магнетном спектроскопијом на узорцима крви	145
Табела 16. Протокол снимања SWIR хиперспектралном камером.....	147
Табела 17. Протокол снимања VNIR хиперспектралном камером	148
Табела 18. Протокол аквизиције спектра	149

Табела 19. Разлике између референтних вредности глукозе и предвиђених вредности по моделу за опто-магнетне спектре водених раствора глукозе сниманих под Брустеровим углом Б60.....	164
Табела 20. Разлике између референтних вредности глукозе и предвиђених вредности по моделу	166
Табела 21. Разлике између референтних вредности глукозе и предвиђених вредности по моделу за NIR спектре водених раствора глукозе	169
Табела 22. Разлике између измерене вредности концентрације глукозе и вредности концентрације предвиђене моделом за FTIR спектре крвног суда.....	222
Табела 23. Разлике између измерене вредности концентрације глукозе и вредности концентрације предвиђене моделом за FTIR спектре спољног дела длана	226
Табела 24. Разлике између измерене вредности концентрације глукозе и вредности концентрације предвиђене моделом за FTIR спектре коже у корену средњег прста	229
Табела 25. Разлике између измерене вредности концентрације глукозе и вредности концентрације предвиђене моделом за FTIR спектре јагодице прста из којег је вађена крв.....	231
Табела 26. Компаративни приказ валидности модела парцијалне линеарне регресије и оцена перформанси модела за различите методе аквизиције спектра водених раствора глукозе	234
Табела 27. Компаративни приказ валидности модела парцијалне линеарне регресије и оцена перформанси модела за различите методе аквизиције спектра крви.....	235
Табела 28. Компаративни приказ валидности модела парцијалне линеарне регресије и оцена перформанси модела за различите методе аквизиције спектра коже и крвног суда на различитим локацијама.....	237
Табела 29. Кларкова мрежна анализа грешака – компаративни преглед припадности предвиђених концентрација глукозе у крви – компаративна анализа свих примењених метода.....	239

1. Увод

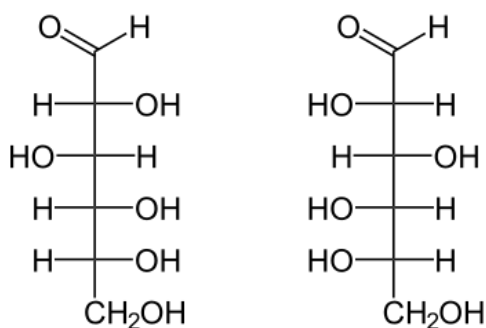
1.1. Глукоза - основни термини и дефиниције

Глукоза ($C_6H_{12}O_6$) је једноставан шећер, моносахарид, који представља најважнији угљени хидрат у физиологији човековог организма који се користи као примарни извор енергије у ћелијама. Назив глукоза, потиче од грчке речи „глукус“ ($\gamma\lambda\upsilon\kappa\upsilon\varsigma$) што значи „слатко“.



Слика 1. Молекуларна структура глукозе: ланац и прстен (адаптирано из [1])

Постоје различите молекуларне структуре глукозе (Слика 1), али се све оне могу поделити у две фамилије стереоизомера – оптичка изомера глукозе D - глукоза и L – глукоза (Слика2) и обе су оптички активне.



Слика 2. Стероизомери глукозе: D – глукоза и L – глукоза (адаптирано из [2])

Само један од ова два скупа изомера постоји у природи и то је D - глукоза , док се L – глукоза врло тешко може наћи. Искључиво D – глукоза учествује у људском метаболизму¹.

Важност глукозе за нормалан људски метаболизам проистиче из њених бројних функција. Глукоза је молекул који се лако може транспортовати у људском организму и представља основно енергетско гориво за метаболичке реакције у свим ћелијама. Такође, она учествује у великом броју биохемијских реакција. Њена улога је од критичног значаја за производњу протеина и масти [3].

Ниво глукозе у крви је веома важан показатељ и предиктивни параметар у здравом стању организма, као и у болестима као што су *Diabetes mellitus*, коронарне срчане болести и артеријска хипертензија.

1.2. Систем регулисања нивоа глукозе у крви и метаболизма угљених хидрата

Метаболизам глукозе представља комплексни скуп интеракција биолошких супстанци. Резултат ових реакција даје релативно константан ниво глукозе у крви.

Ниво глукозе у крви не спада у стриктне биолошке константе, што значи да ниво глукозе може варирати унутар једног физиолошког распона. Све биолошке супстанце које имају утицај на метаболизам угљених хидрата, навике у исхрани и саму концентрацију глукозе у крви (као резултат) формирају, односно сачињавају функционални систем за регулацију нивоа глукозе у крви.

Иницијални корак у метаболизму глукозе је транспорт преко ћелијске мембране у правцу градијента концентрације, од у нормалним случајевима високе концентрације

¹ Термин глукоза у даљем тексту, односиће се само на биолошки активну изоформу D – глукозу.

глукозе у екстраћелијској течности, ка цитоплазми. У овом процесу учествује фамилија транспортних протеина за глукозу [3].

1.2.1. Транспортни протеини за глукозу

Постоје две категорије транспортера са глукозу: Na^+ зависни (SGLT) и Na^+ независни (GLUT). SGLT транспорт глукозе је повезан са транспортом натријума и дозвољава прелаз глукозе кроз ћелијску мембрану насупрот градијенту концентрације. У случају када је губитак глукозе из изолованих епителијалних ћелија интестиналног тракта спречен блокирањем GLUT транспортера, ћелије могу да наставе са повећањем концентрације глукозе укључивањем SGLT транспортера. Примарна локација ових транспортних протеина је на граници интестиналног тракта и проксималних реналних тубуларних ћелија.

GLUT транспортери су широко распрострањени у човековом организму, иако густина њихове локализације варира. Молекули глукозе се транспортују преко ћелијске мембране путем GLUT транспортера, насупрот градијенту концентрације. До данас је откривено 13 функционалних носача глукозе код сисара и они су подељени у три класе према висини афинитета према глукози [3].

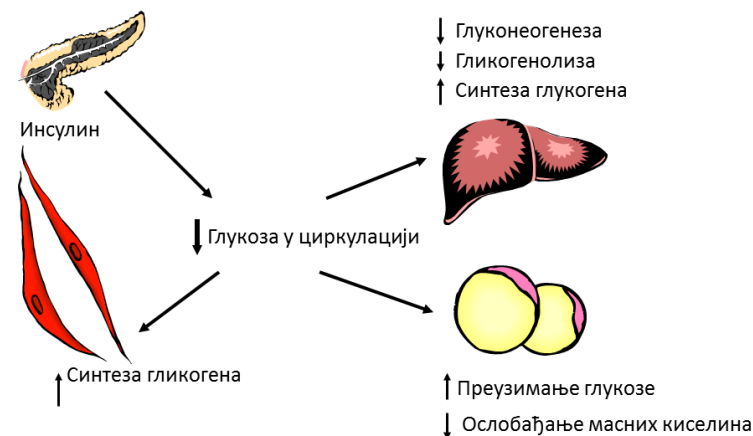
1.2.2. Дистрибуција и концентрација глукозе у људском организму

Концентрација глукозе у плазми је резултат равнотеже између уласка глукозе у циркулацију и њеног уклањања из циркулације. Базални ниво глукозе у плазми је веома тесно регулисан и износи око 80 mg/dl (≈ 4.5 mmol/l), са границама од 60 до 110 mg/dl (3.33-6.105 mmol/l) [4].

Постоје три главна извора глукозе: интестинална апсорпција током оброка, гликогенолиза и глуконеогенеза (Слика 3).

Прва компонента је доминантно одређена функцијама дигестивног тракта, односно стопе пражњења желуца. Брзину пражњења желуца смањују два пептида: глукагону сличан пептид – 1 (GLP-1) и амилин. Остали извори глукозе у циркулацији настају углавном из хепатичних процеса: гликогенолиза (разлагање гликогена) и глуконеогенеза (стварање глукозе примарно од лактата и аминокиселина када је организам у стању поста. Гликогенолиза и глуконеогенеза спадају у ендегену производњу глукозе.

Ендегена производња глукозе је делом под контролом глукагона. Глукагон је кључни катаболички хормон који луче α -ћелије панкреаса. Глукагон испољава супротне ефекте од инсулина. Глукагон омогућује гликогенолизу у току првих 8-12 часова поста и тако промовише настанак глукозе у циркулацији. У току дугих периода поста, глукоза се највећим делом производи глуконеогенезом у јетри.



Слика 3. Метаболизам глукозе

Глукоза напушта циркулацију услед потрошње и употребе у периферним ткивима. Приближно 55% глукозе потроши се на терминалну оксидацију. Других 20% на гликолизу при чему се резултујући лактат потом враћа у јетру на поновну синтезу у глукозу. Поновно преузимање глукозе од стране јетре и других цревних ткива представља последњих 25% процената потрошње глукозе. Гликолиза, оксидација и складиштење у форми гликогена су основни, али не и једини путеви метаболизма глукозе.

Регулација метаболизма глукозе још увек није довољно објашњена. Једна од најшире прихваћених хипотеза је о ситости и глади (*Food and Famine Hypothesis*) која узима у обзир ефекте obroka и периода између њих на концентрацију глукозе у крви. У овој хипотези дефинишу се три значајна периода: прандијални и непосредни постпрандијални, закаснели постпрандијални и далеки постпрандијални период.

Глукорегулаторни хормони укључују: инсулин, глукагон, амилин, GLP-1, глукозно зависни инсулинотропични пептид (GIP), епинефрин, кортизол, и хормон раста. Инсулин и амилин производе β -ћелије панкреаса, глукагон α -ћелије панкреаса, GLP-1 и GIP производе L-ћелије црева.

Амилин је неуроендокрини хормон чија експресија и лучење се врши заједно са инсулином као одговор на стимулус нутријената. Код дијабетичара, амилин је или у дефициту (инсулин-зависни дијабетес) или у повећању (инсулин-независни дијабетес). Основна улога амилина је да спречи абнормалан пораст концентрације глукозе кроз два механизма: супресију постпрандијалне секреције глукагона, или инхибиције стопе пражњења желуца.

GIP стимулише секрецију инсулина и регулише метаболизам масти, али не инхибира секрецију глукагона или пражњење желуца. GLP-1 стимулише секрецију инсулина у панкреасу. GLP-1 помаже у регулацији пражњења желуца и секреције желудачне киселине. Хормон раста нарушава преузимање глукозе стимулисане инсулином.

Базално стање јавља се у веома касном постпрандијалном периоду (након obroka) у којем је очувана квази-равнотежа метаболизма глукозе. Када се организам налази у овом стању постоји споро опадање концентрације глукозе у крви, око 1% по сату [3].

У следећем, прандијалном периоду, глукоза се апсорбује у цревима и то доминантно у средњој и финалној секцији танког црева, и то на два начина: парацелуларно и трансцелуларно, при чему трансцелуларна рута укључује транспорт преко SGLT I GLUT транспортера.

Када особа унесе оброк након ноћи, на празан стомак, значајан део глукозе се преузима од стране периферних ткива, највише мишића, а остатак од стране ткива унутрашњих органа, највише јетре.

Табела 1. Ефекти примарних глукорегулаторних хормона [5]

	α - ћелије	Глукагон	<ul style="list-style-type: none"> • Стимулише разлагање гликогена ускладиштеног у јетри • Промовише хепатичну глуконеогенезу • Промовише хепатичну кетогенезу
Панкреас	β - ћелије	Инсулин	<ul style="list-style-type: none"> • Утиче на метаболизам глукозе и складиштење сварених хранљивих састојака • Промовише преузимање глукозе у ћелијама • Смањује постпрандијалну секрецију глукагона • Промовише синтезу протеина и масти • Промовише коришћење глукозе као извора енергије
		Амилин	<ul style="list-style-type: none"> • Смањује постпрандијалну секрецију глукагона • Успорава пражњење желуца • Смањује унос хране и телесну тежину
Црева	L - ћелије	GLP - 1	<ul style="list-style-type: none"> • Појачава глукозо – зависно инсулинску секрецију • Смањује постпрандијалну секрецију глукагона

-
- Смањује пражњење желуца
 - Редукује унос хране и телесну тежину
 - Промовише здравље β – ћелија
-

Само 20 – 30% глукозе се оксидише у току 3 до 5 часова потребних за абсорпцију у гастроинтестиналном тракту. Преостали део глукозе се складишти у виду глукагона, једним делом у јетри.

Глукоза која се иницијално складишти као гликоген у мишићима може касније да се премести у јетру преко гликолизе при чему се ствара лактат који се отпушта у циркулацију. Након тога лактат преузима јетра, од њега производи глукозу и складишти као гликоген.

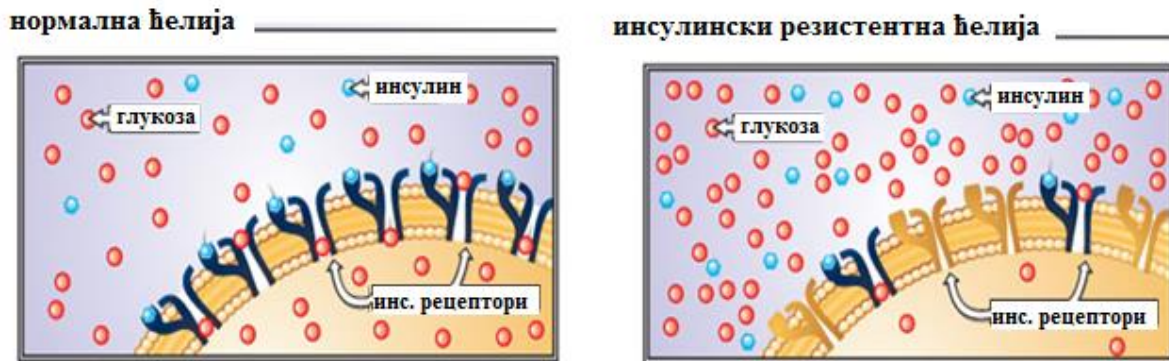
Хипергликемија опада како се глукоза из интерстицијске течности премешта у ћелије.

1.2.3. Инсулин – кључни хормон у метаболизму глукозе

Инсулин је кључни анаболички хормона, који испољава своје ефекте кроз везивање за специфичне рецепторе који се углавном налазе на ћелијама масти, јетре, и мишића. Инсулин учествује у контроли постпрандијалних нивоа глукозе на три начина. У првом, инсулин промовише преузимање глукозе преко инсулин-сензитивних периферних ткива, примарно мишића скелета. Затим, инсулин стимулише гликогенезу у јетри и симултано инхибира секрецију глукагона у α -ћелијама панкреаса и доводи до завршетка ендогене производње глукозе у јетри.

Дејство инсулина је брижљиво регулисано преко концентрације глукозе у циркулацији. Инсулин се уопште не лучи уколико је концентрација глукозе у крви $\leq 3.3 \text{ mmol/l}$ [3]. Лучење инсулина се одвија у две фазе: иницијално рапидно отпуштање преформираног инсулина, и затим повећана синтеза инсулина и његово отпуштање. Дугорочно отпуштање инсулина дешава се уколико је концентрација глукозе и даље

висока. Како се смањује концентрација глукозе у циркулацији, тако концентрација инсулина у плазми опада док не дође до горње нормалне границе и затим споро даље опада у току средњег и касног постпрандијалног периода.



Слика 4. Инсулински рецептори на нормалној инсулински-сензитивној ћелији (лево) и инсулински-резистентној ћелији (десно) [6]

Када хиперинсулинемија достигне довољно висок ниво, инсулин – рецепторски комплекс у инсулин-сензитивним ћелијама (адипоцити, миокардиоцити, ћелије скелетних мишића) иницира ланац трансдукције који резултује у транслокацији интрацелуларних везикула да се слепа са плазма мембраном. Иако је глукоза најмоћнији стимулус, постоје и други фактори који стимулишу секрецију инсулина. Ови додатни стимулуси укључују повећане концентрације неких аминокиселина као што су аргинин, леуцин и лизин, GLP-1 и GIP након оброка, као и парасимпатетичка стимулација преко вагусног нерва.

Осим регулисања нивоа глукозе у крви, инсулин има и бројне друге улоге неvezане за гликемију.

1.2.4. Акутне и хроничне компликације везане за дијабетес

Дијабетес је хронична болест која уколико се не третира може имати врло озбиљне последице по оболелог. Компликације које настају услед дијабетеса могу бити акутне и хроничне. У акутне компликације спадају дијабетична кетоацидоза (дијабетична кома, хипергликемијска кома) и хипогликемијска кома.

Дијабетична кетоацидоза (дијабетична кома, хипергликемијска кома) углавном погађа дијабетичаре са дијабетесом типа 1. Кетоацидоза се развија услед повећане потребе организма за инсулином или повећане резистенције на инсулин која може наступити услед додатног стреса, као што је трудноћа, микробијална инфекција, инфаркт, или цереброваскуларни инзулт. Неадекватно снабдевање инсулином може такође наслати и уколико пацијент заборави администрацију преписане дозе лека или услед терапије која није довољно прилагођена потребама пацијена. У неким случајевима може наступити веома опасна кетоацидоза са губитком свести.

Фактори који повећавају предиспозицију за развој хипергликемијске коме у било ком типу дијабетеса су:

- Хиповолемија са озбиљном дехидратацијом услед упорне полиурије
- Висок осмотски притисак крви услед високе концентрације глукозе у крви који доводи до поремећаја баланса електролита
- Ацидоза услед акумулације кето-киселина

Хипогликемијска кома наступа у инсулин-зависном типу дијабетеса када је више инсулина администрирано него што је потребно да се избалансира унос хране са потрошњом енергије. С обзиром да неурони више зависе од глукозе за обезбеђивање енергије у односу на друге ћелије, депривације глукозе доводи до поремећаја неуроналне функције, које води у кому и уколико кома потраје до неповратних оштећења.

Хипогликемија може настати као резултат:

- Случајне превелике дозе инсулина
- Одлагања јела након администрације инсулина
- Гастринтестиналних сметњи при чему је смањена апсорпција угљених хидрата (повраћање, дијареја)
- Убрзан метаболизам, као у случају неочекиваних физичких напора или акутне фебрилне болести

- Тумор панкреаса који утиче на инсулинску секрецију, нарочито уколико производи нерегуларне изненадне изливе хормона

У хроничне компликације спадају многобројни кардиоваскуларни поремећаји, дијабетична макроангиопатија, дијабетична микроангиопатија, инфекције и отказивање бубрега. Кардиоваскуларни поремећаји као и промене у крвним судовима настају иако је болест под контролом применом одговарајуће терапије.

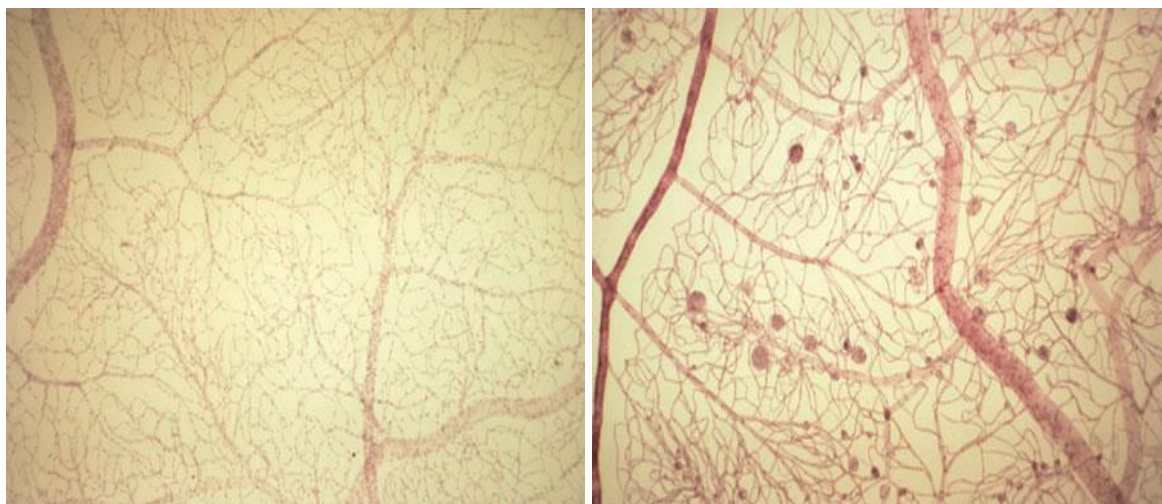
Дијабетесна макроангиопатија укључује као најчешће промене атероме и калцификације средњег слоја (*tunica media*) зида великих мишићних артерија. Код инсулин-зависних дијабетичара ове промене наступају у врло раном добу. Најчешће последице су веома озбиљне и фаталне и укључују перифералне васкуларне болести, миокардијални инфаркт, церебралну исхемију и инфаркт.

Дијабетесна микроангиопатија обухвата задебљање епителијалне базалне мембране артериола, капиlara и понекад и венула.

Ове промене могу довести до:

- Перифералних васкуларних болести које прогресивно воде у гангрену
- Ретинопатије (Слика 5), при чему микроанеуризме и мала крварења стварају бројне некротичне такче на ретини што доводи до губитка вида
- Гломерулосклерозе, која доводи до нефротичног синдрома и отказивања бубрега
- Перифералне неуропатије, нарочито у случају успорене мијелинације

Дијабетичари су нарочито склони инфекцијама, нарочито бактеријског и гљивичног порекла, вероватно услед смањене активности фагоцита услед недовољне количине интрацелуларне глукозе.



Слика 5. Микрофотографије нормалне људске ретине (слево) и ретине дијабетичара на којој се виде бројне капиларне анеуризме (десно) [7]

Инфекције могу проузроковати:

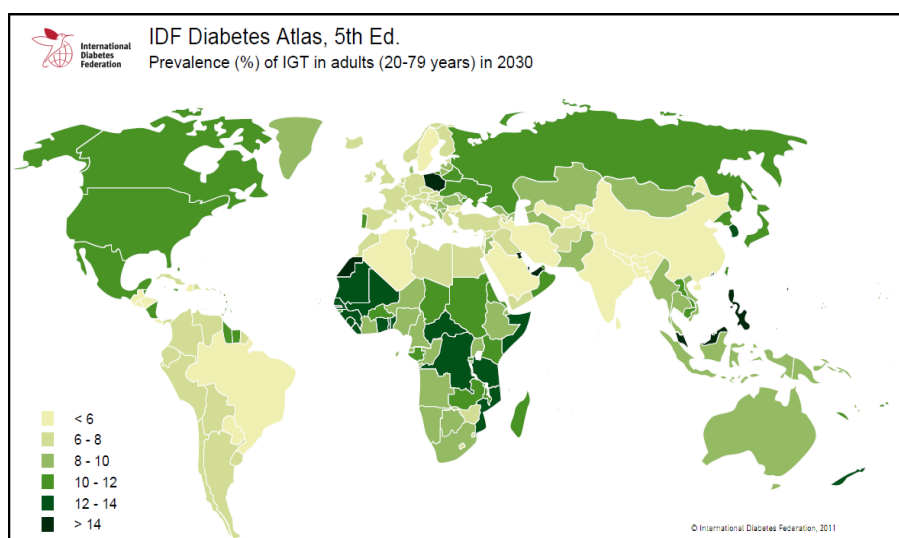
- Компликације у деловима тела захваћеним перифералном неуропатијом и променама у крвним судовима (нпр. У стопалима где је смањена осетљивост и смањен доток крви)
- Кожни апсцеси и поткожни чиреви
- Вагинална кандидијаза
- Пијелонефритис

Отказивање бубрега наступа услед промена у зидовима малих крвних судова бубрега и инфекција и представља врло уобичајен узрок смрти дијабетичара [8].

1.3. Преваленца дијабетеса у Србији и свету

Дијабетес (*Diabetes mellitus*) је једна од најчешћих хроничних незаразних болести у свим земљама света и представља велики јавно-здравствени проблем са знатним социоекономским последицама. Број оболелих од дијабетеса налази се у сталном порасту што је највероватније последица економског развоја и урбанизације која подразумева животни стил са редукованом физичком активношћу и порастом гојазности.

Према глобалним проценама из 2009. године преваленција дијабетеса код одраслих особа (20-79 година) износи 6,4% односно 285 милиона одраслих особа оболелих од дијабетеса у 2010. години, а број оболелих ће се повећати на 7,7%, односно 439 милиона оболелих до 2030. године [9]. Међутим, према подацима Међународне федерације за дијабетес (International Diabetes Federation – IDF) из 2011. године, процена урађена на узорку од 110 земаља света даје још већи број оболелих, односно да је у 2011. години 366 милиона оболелих од дијабетеса, и да се очекује да број оболелих у 2030. години достигне 552 милиона (Слика 6) [10].



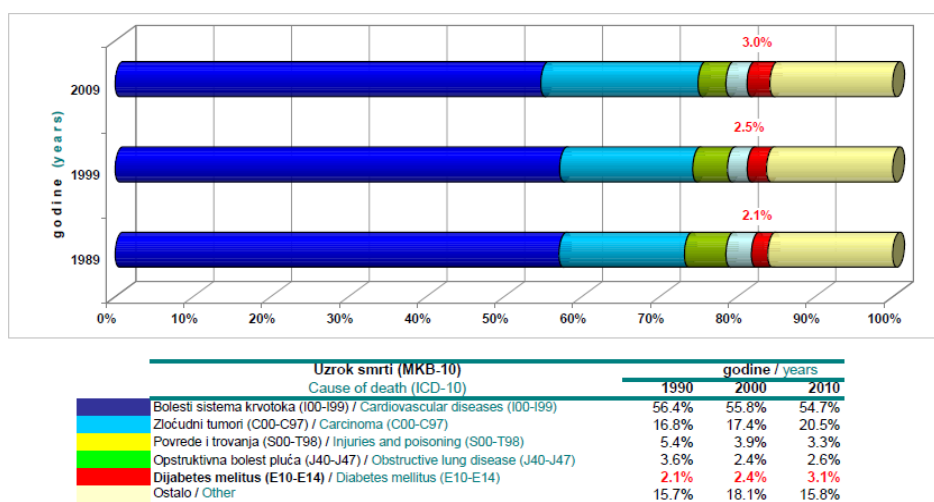
Слика 6. Процена преваленце дијабетеса код одраслих особа (20-79 година) у свету у 2030. години [11]

Интересантна је веза између прихода у земљи и старосне групе у којој се јавља највећи број случајева дијабетеса. Тако је у земљама са високим приходима, највећи број оболелих у старосној групи преко 60 година, док је у земљама са ниским и средњим приходима највећи број оболелих у радно способној групи од 40-60 година [10].

У истој публикацији закључује се да старење и промене које су у вези са урбанизацијом, глобализацијом и развојем највише утичу на пораст броја оболелих од дијабетеса у свим земљама, а нарочито у земљама са ниским и средњим приходима у којима не постоје адекватни услови за рану дијагностику и терапију дијабетеса као и последица компликација везаних за дијабетес.

Према истом извору највећи пораст оболелих очекује се у неразвијеним земљама и земљама у развоју са претежно старим становништвом (преко 60 година) у које спада и Србија. Регистар за дијабетес у Србији за 2010. годину, цитира исти извор и наводи да у Републици Србији без Косова и Метохије од дијабетеса болује приближно 600.000 особа или 8,2% популације, при чему је број особа са типом дијабетеса 2 многоструко већи (95%) у односу на особе са типом дијабетеса 1 [12].

Преваленција дијабетеса расте са годинама старости и процењује се да је готово половина оболелих старија од 65 година. Код старијих особа дијабетес типа 2 открива се релативно касно када су присутне већ бројне кардиоваскуларне компликације. У Србији као и у развијеним земљама света, дијабетес је пети водећи узрок смртности и на годишњем нивоу од дијабетеса умре око 3000 особа (Слика 7) [12].



Слика 7. Водећи узроци умирања у Србији 1990., 2000., и 2010. године [12]

1.4. Социо-економски аспекти епидемије дијабетеса

У протеклој деценији дошло је до драстичног пораста инциденце и преваланце дијабетеса широм света и овај тренд се наставља. Дијабетес типа 2 обухвата 90% случајева дијагностификованог дијабетеса и у вези је са гојазношћу, недовољном физичком активношћу и расом/етничком групом [13].

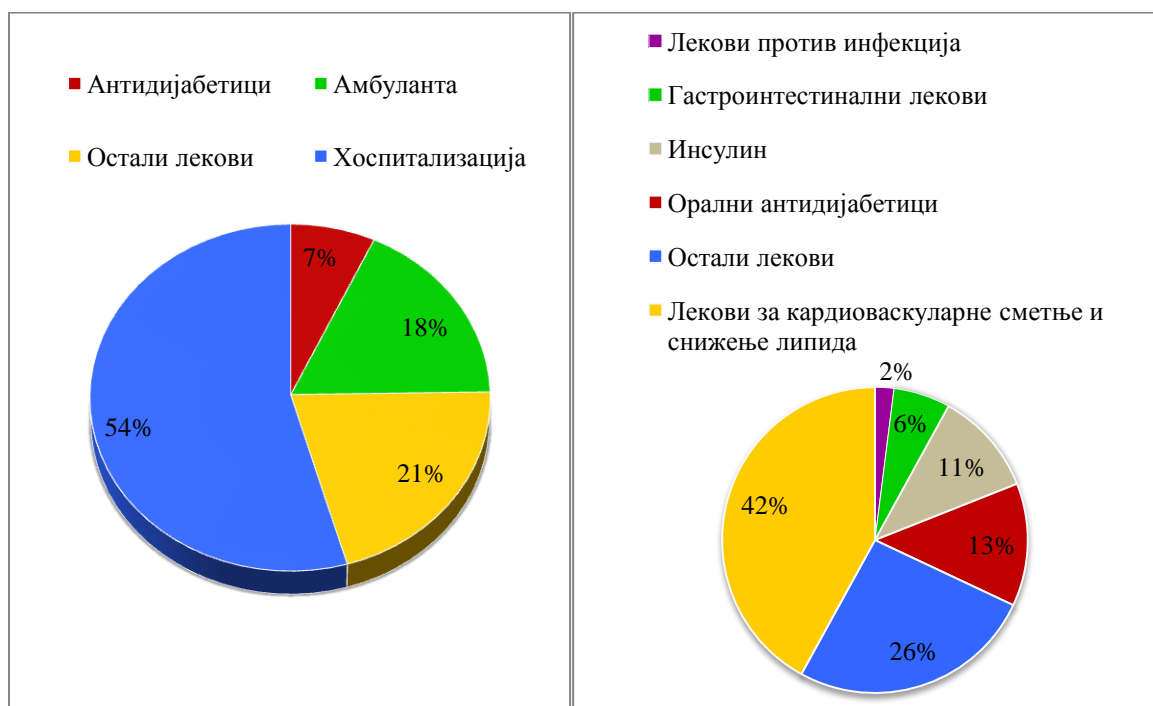
Социо-економске последице дијабетеса и стања пре-дијабетеса су огромне. Особе оболеле од дијабетеса типа 2 могу да очекују краћи животни век за око 10 година, у поређењу са осталом популацијом, и то услед повећаног ризика кардиоваскуларних обољења, инфаркта миокарда или možданог удара [14]. Тип 2 дијабетес је повезан са повећаним ризиком преране смрти услед кардиоваскуларних компликација повезаних са хипергликемијом и микроваскуларним поремећајима. Развој дијабетеса захтева висок ниво медицинске неге и брига о пацијентима представља велики трошак. Студија трошкова дијабетеса типа 2 у Европи показала је да чак 72% оболелих има бар једну компликацију услед дијабетеса, док трећина има микроваскуларна обољења и трошкови су 2,5 пута виши код пацијената који имају компликације у односу на оне који немају [15].

Дијабетес има значајан економски ефекат на оболеле особе и њихове породице. Како показују економске студије трошкови пацијента порасту за 50% након појављивања кардиоваскуларних компликација, а чак 3,6 пута више када се догоди инфаркт, или možдани удар [16].

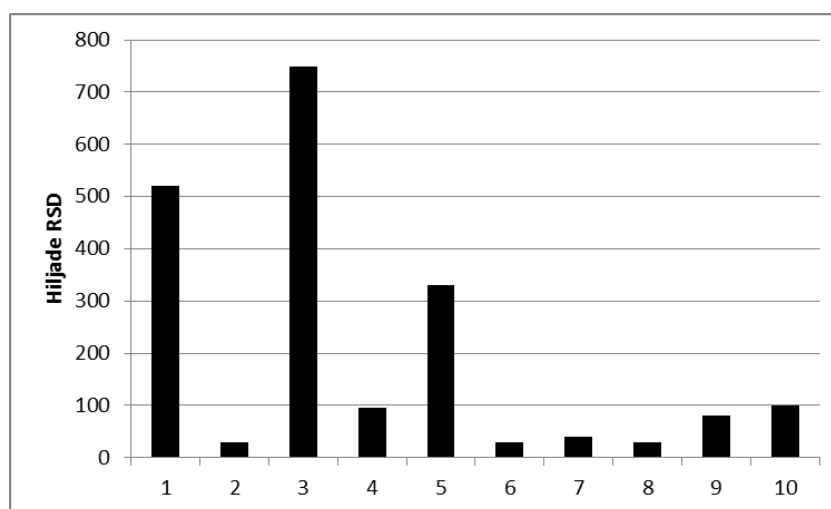
Опсежна студија трошкова у 8 европских земаља дошла је до структуре генералних трошкова поделила је трошкове са којима се суочава пацијент оболео од дијабетеса типа 2 у три категорије [16]:

- (1) Амбулантне трошкове – који се дешинишу као сума свих трошкова посета лекару опште праксе, дијабетологу и другим специјалистима (интерниста и др.), физијатрима, медицинским сестрама, нутриционистима, трошкови хитних случајева, и трошкови свих лабораторијских тестирања (тест анализе крви, мерење крвног притиска и сл.)
- (2) Трошкови хоспитализације су дефинисани као сума свих трошкова пријема у болницу
- (3) Трошкови медикамената – сви трошкови лекова које преписују лекари опште праксе и специјалисти у окружењу пацијента

Процентуална структура трошкова лечења на основу података из осам највећих европских земаља приказана је графички на Слици 8. Према подацима истог извора, трошкови хоспитализације имају највећи удео у трошковима, док антидијабетици и остали лекови имају релативно мали удео у трошковима. Најутицајнији генератор трошкова су компликације услед дијабетеса. Компликације услед дијабетеса чине више од половине трошкове, чак и након интензивног праћења и регулисања гликемије инсулином или оралним антидијабетцима, иако њихова примена значајно смањује инциденцу микроваскуларних и макроваскуларних компликација [17]. Стварни обим лечења дијабетеса типа 2 у Србији одговара трошковима лечења ове болести у другим европским земљама, али је структура сличнија оној у економијама Трећег света, закључак је студије на узорку 99 оболелих, урађене 2009.године [18].



Слика 8. (лево) Структура генералних трошкова индивидуе са дијабетесом типа 2; (десно) Структура генералних трошкова медикамената за особу са дијабетесом типа 2 (на основу података из [16])



Слика 9. Укупна вредност потрошње лекова праћене популације болесника у 2007. години по фармакотерапијским групама: 1. Лекови који делују на кардиоваскуларни систем, 2. Лекови који делују на око, 3. Инсулини и аналози, 4. Лекови који делују на нервни систем, 5. Орални антидијабетици, 6. Лекови за лечење болести респираторног система, 7. Лекови за лечење болести дигестивног система и метаболизма, 8. Антиинфективни лекови за системску примену, 9. Антиинфламаторни и антиреуматски лекови, 10. Остали лекови (адаптирано на основу [18])

Према резултатима овог извора, сума трошкова оболелог у Србији, годишње износи 53 400 динара. Ова висина трошкова приближнија је оној у развијеним земљама, јер су цене лекова и медицинских средстава релативно високе и уједначене са светским тржиштем (Слика 9), али је вредност људског рада још увек релативно ниска, па вредност болничког дана, неге стручног особља као и вредност изгубљене радне продуктивности мало доприносе укупним трошковима болести.

1.5. Циљ истраживања и мотивација

Процена од 366 милиона тренутно оболелих особа од дијабетеса у свету са постојећим трендом раста намеће закључак о неопходности интервенције на пољу превенције и контроле тока болести на глобалном нивоу. Последице епидемије дијабетеса су погубне не само са здравственог већ и са социо-економског аспекта.

Највећи део оболелих (90%) представља случај дијабетеса типа 2, који се развија годинама и може проћи неопажено и недијагностификовано у дугом временском периоду. Са здравственог становишта, велику предност има успостављање ране

дијагнозе што раније, или чак док је организам у фази пре-дијабетеса, како би се само уз помоћ дијете и промене животног стила могао спречити или одложити настанак болести. Болест у развоју, чак и када се гликемија контролише, доводи до константних микро и макроваскуларних компликација, које захтевају негу и терапију. Постојање компликација везаних за дијабетес дуплира трошкове лечења и представља велико оптерећење не само за пацијента и његову породицу, већ и за цео здравствени систем.

Превенција и ригорозна контрола императив су у борби против епидемије дијабетеса. Из тог разлога постоји изражена потреба за уређајима за мерење гликемије који би омогућили континуално, једноставно и прецизно праћење гликемије, а да су лаки за коришћење и не представљају велико финансијско оптерећење за потенцијалног оболелог.

Развој оваквих уређаја представља циљ многих истраживања у свету, а корист која би проистекла из његове употребе била би вишеструка.

2. Преглед и анализа постојећег стања предмета изучавања

2.1. Уводна разматрања

С обзиром на тежину болести и многобројне компликације које настају услед дијабетеса, значајни напори широм света су уложени у развој и производњу уређаја за прецизно одређивање концентрације глукозе у крви, такозваних глукометара. Све методе за одређивање концентрације глукозе могу се поделити у три категорије: инвазивне, минимално-инвазивне и неинвазивне. Методе су подељене по инвазивности процедуре којом се сакупља узорак из којег се може извући информација о концентрацији глукозе у крви.

2.2. Физиолошки аспекти

Глукоза је најраспрострањенији хематолошки моносахарид и такође један је од главних носилаца енергије у људском организму. Препоручени нивои концентрације глукозе пре оброка (препрандијални) износе 100mg/dl(5.5mmol/L) у плазми и 89 mg/dl(4.9 mmol/L) у системском крвотоку или капиларима. Након оброка (постпрандијални) ове вредности не би требало да прелазе 140mg/dl(7.8 mmol/L) у плазми, односно 125mg/dl(6.9 mmol/L) у системског крвотоку, односно у капиларној крви. Наведене границе сматрају се нормалним физиолошким границама и приказане су прегледно у Табели 1 [19].

Дијабетес је стање у којем је природна способност организма да регулише ниво глукозе у крви изгубљена. Код дијабетичара природа метаболизма глукозе је таква да захтева континуално надгледање нивоа глукозе у циљу прилагођавања уноса и типа хране, као и дозирања и администрације лекова (слика 10).

2.1. Мерење гликемије у клиничкој пракси

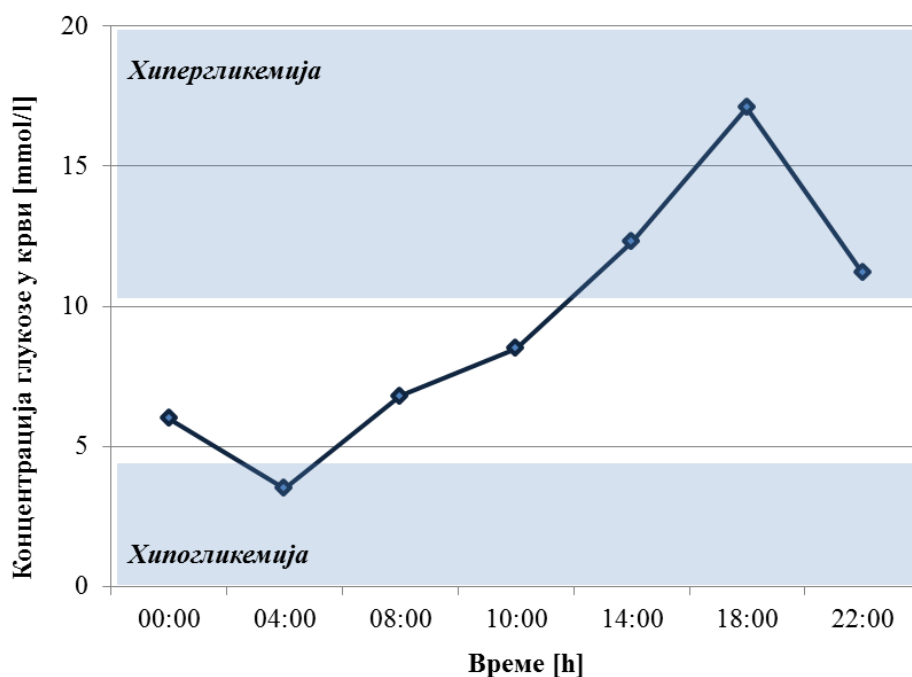
Постоји више лабораторијских тестова предложених за процену функционалног стања регулационог система нивоа глукозе у крви [3]. Сви они могу бити подељени у две велике групе.

Табела 2. Нивои глукозе у системском крвотоку и последице [19]

Концентрација глукозе у крви		Објашњење последица
mmol/L	mg/dl	
2.0	35	Екстремно низак ниво, опасност – могућ губитак свести
3.0	55	Ниска, маргинална инсулинска реакција
4.0 – 6.0	70 – 100	Нормална препрандијална вредност код здравих особа
8.0	150	Нормална постпрандијална вредност код здравих особа
10	180	Максимална постпрандијална вредност код здравих особа
15	270	Висока или веома висока вредност у зависности од реакције пацијента на опасност
16.5 – 20.0	300 - 360	Опасност
22	400	Најчешће максимална вредност коју је могуће измерити глукометрима
33	600	Велика опасност од озбиљног дисбаланса електролита

Прва група укључује директно одређивање концентрације било које компоненте од интереса у људском организму. У компоненте које дају слику о функционалности регулационог система глукозе, спадају глукоза, као примарна компонента, затим

инсулин, С – пептид, глукагони, амилин, сви хормони са дејством супротним инсулину, производи гликације, као и друге компоненте које се могу мерити.



Слика 10. Предности континуалног праћења (пуна плава линија) у односу на дискретна, индивидуална мерења на сваких неколико сати (плави квадратићи). Континуални мониторинг обезбеђује континуалну правовремену информацију о нивоу глукозе у крви, у реалном времену, док традиционално дискретно одређивање нивоа глукозе носи са собом ризик превиђања епизода хипергликемије и хипогликемије. Снимање ових догађаја омогућило би пацијенту да реагује на време и избегне компликације.

У складу са циљем истраживања, глукоза се може мерити у различитим ткивима и биолошким течностима: крв, плазма, серум, интестицијска течност, цереброспинални ликвор, синовијалне течности, пљувачка, сперма и друге. Такође, глукоза се може мерити у различитим васкуларним регионима.

У уобичајеној клиничкој пракси примарно се за одређивање концентрације глукозе користи као узорак крвна плазма. Највећим делом, опрема која се користи за одређивање концентрације глукозе захтева узорак венце или капиларне крви. Развијени су и изрази за повезивање концентрације глукозе у плазми са концентрацијом глукозе у другим течностима [20] :

$$\begin{aligned} \text{Ниво глукозе у плазми (mmol/l)} &= 0.558 + 1.119 \times \text{ниво глукозе у целој крви (mmol/l)} \\ \text{Ниво глукозе у плазми (mmol/l)} &= 0.102 + 1.066 \times \text{ниво глукозе у капиларној крви (mmol/l)} \\ \text{Ниво глукозе у плазми (mmol/l)} &= -0.137 + 1.047 \times \text{ниво глукозе у серуму (mmol/l)} \end{aligned} \quad (1)$$

Гликолизирани хемоглобин (HbA_{1c}) је користан као клинички параметар односно показатељ степена метаболичке контроле. Он представља интегрисан сумарни показатељ циркадијалне глукозе у крви за период од претходних 6 – 8 недеља (животни век еритроцита). Иако је ниво гликолизираног хемоглобина у чврстој корелацији са нивоом глукозе, он не нуди информације о учестаности промена глукозе и није никад препоручен као дијагностички елемент за дијабетес[20].

Другу групу тестова чине тзв. функционални тестови који илуструју метаболичку интеракцију која постоји између компоненти система за регулисање нивоа глукозе у крви у људском организму. Развијено је скоро хиљаду таквих тестова, а тестови се састоје у томе да се концентрација неке компоненте промени, најчешће повећа и затим да се прати реакција односно промена концентрације других изабраних параметара. Као компонента чија се концентрација мења може да се користи сама глукоза (дакле, у ову групу тестова спадају сви тестови оптерећења на глукозу), затим инсулин, и теоретски било која друга компонента од интереса за истраживање. Тестови оптерећења на глукозу и тестови толеранције глукозе могу се поделити на оралне и интравенозне тестове, на основу начина повећања концентрације глукозе, али за сваки постоје ограничења и границе примене. На пример, орални тест толеранције на глукозу даје резултате који значајно зависе од функционалног стања гастроинтестиналног тракта, док интравенозни тестови глукозе представљају прилично инвазивну процедуру.

2.2. Инвазивне методе

У потпуности инвазивне методе обухватају клиничке уређаје који прате гликемију хоспитализованих пацијената, и тзв. глукометре који се користе за самоконтролу. Монитори поред пацијената су прикладни за јединице интензивне неге и користе имплантабилне сензоре са прецизношћу од приближно 1%.

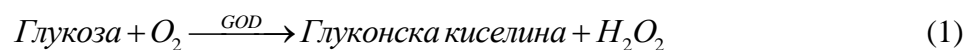
Ови системи омогућају континуално праћење и самим тим дају већи број клинички значајних информација о интензитету, трајању, и узроцима флукуација у измереним нивоима глукозе у крви [21].

Уређаји за кућну употребу и самоконтролу гликемије (Слика 11) углавном имају релативну тачност између 6 и 7% и одређују концентрацију глукозе у крви, на основу узорка крви извађеног из прста (слика 12). Ови уређаји најчешће користе трачице за једнократну употребу које садрже реагенс који ступа у интеракцију са глукозом из узорка крви и информација о концентрацији глукозе се добија преко електрохемијског детектора лоцираног унутар уређаја. Осим електрохемијских метода, у употреби су и оптички сензори.



Слика 11. Различити брендови уређаја за самоконтролу гликемије (Roche, Lifescan, Bayer, Arkray, Allmedicus idr) [22]

Електрохемијски (ензимски) тестови су засновани на амперометријским и потенциометријским принципима. Амперометријске електроде су превучене ензимом глукоза-оксидаза (GOD) у циљу повећања сензитивности сензора [23]. Реакција глукозе са кисеоником производи глуконску киселину и оксигенисану воду (видети израз (1)). Када се потенцијал од 700mV, доведе на раствор (2), концентрација глукозе се може мерити преко полупропустљиве мембране која контролише доток кисеоника на контакт електрода [24].



Слика 12. Принцип рада и коришћења уређаја за самоконтролу гликемије (адаптирано на основу [25])

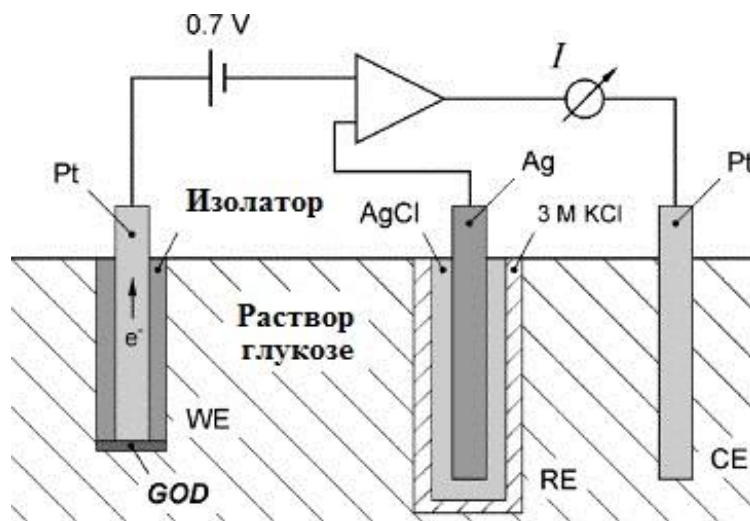
Ензимски сензори за глукозу углавном користе 3 електроде (слика 13). Контакт на којем се врши мерење представља радну электроду (платина Pt). Референтна електрода (Ag/AgCl) се користи да би се избегле осцилације у систему, и обезбеди константни напон (нормално око 700mV).

Крај који се зове бројач или помоћна електрода (Pt) се користи да радну электроду снабдева струјом. Друга могућност је да се мери промена локалне pH вредности услед стварања хидрогена на сензору (израз (2)).

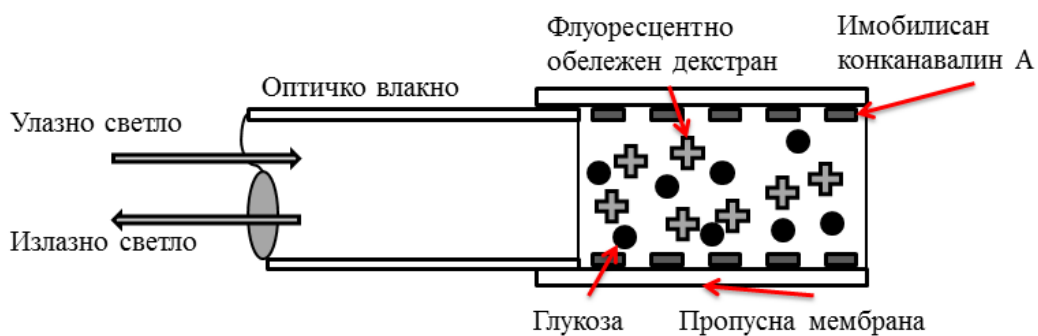
Таква селективно пропустљива мембрана када се користи са транзистором, ствара потенциометријски сензор који такође може да рефлектује промене у концентрацији глукозе (слика 14) [26].

Оптички сензори за глукозу користе супстрат (*lectin concavanalin A*) са флуоресцентним индикатором (флуорецеин изотиоцијанат - декстран) за детекцију концентрације различитих анализита као што је то илустровано на слици 14.

Екситациони сноп светлости пролази кроз оптичко влакно и улази у раствор, изазивајући флуоресценцију невезаних индикатора, а флуоресцентна светлост се истим влакном, враћа у мерни систем [27].



Слика 13. Схематски дијаграм електрохемијског сензора за глукозу (адаптирано на основу [26])



Слика 14. Схематски дијаграм оптичког сензора за мерење глукозе (на основу [27])

Иако тачност инвазивних система за мерење глукозе може бити под утицајем различитих фактора као што су калибрација, температура амбијента, количина узорка

крви, присуство лекова у крви, концентрација хематокрита, влажност и датум производње тест трака, системи са ланцетом су данас и даље стандардна техника за праћење и самосталну контролу дијабетичара. Уложено је доста напора да се ниво инвазивности смањи – или кроз мању запремину потребне крви до само неколико микролитара или узорковање на оним местима на телу који су мање осетљиви на бол од врхова прстију, као што су подлактица, надлактица или бутина [28].

Основна мана ових система је недостатак контроле у току спавања или мануалних активности, у којима се пропушта праћење хипер- и хипогликемијских епизода. Други недостаци су могућност инфекција услед честог узорковања крви, оштећење нервних завршетака, непријатност и бол приликом боцкања прста неколико пута у току дана, што често доводи до избегавања пацијента да врши самоконтролисање гликемије [29].

2.3. Минимално – инвазивне методе

Минимално инвазивне методе као узорак користе интерстицијску течност која се сакупља субкутаном (поткожном) имплантираним сензорима или сензори могу бити имплантирани интравенозно.

Ови глукометри се производе као системи за мониторинг пацијената у постељи, али и као модули који се могу носити имплантирани (слика 15). Иако минимално инвазивни, пацијенти ипак пријављују одређен ниво непријатности приликом коришћења ових сензора што представља значајну препреку у терапији [30]. Од бројних проблема издвајају се следећи као најтежи изазови:

- ❖ Стабилност сензора: увек актуелан проблем код биосензора
- ❖ Калибрација сензора: нимало тривијалан процес повезивања читавања концентрације глукозе сензора са реално измереним концентрацијама стандардним методама
- ❖ Биокompatibilност: одбацивање сензора од стране организма.

Биокомпатибилност је најчешће, најтежи проблем пошто имплантирање сензора под кожу доводи до нагомилавања ткива око сензора што може утицати на дифузију анализита до сензора и утицати на измерене вредности концентрације глукозе.



Слика 15. CGMS System Gold минимално-инвазиван глукометар компаније Medtronic MiniMed. Сензор се поставља под кожу у пределу абдомена и врши праћење нивоа глукозе у интерстицијској течности непрекидно и до 72 часа: А-сензор, Б-сензор инсертер, Ц-монитор који је у вези са рачунаром [30]

2.4. Неинвазивне методе

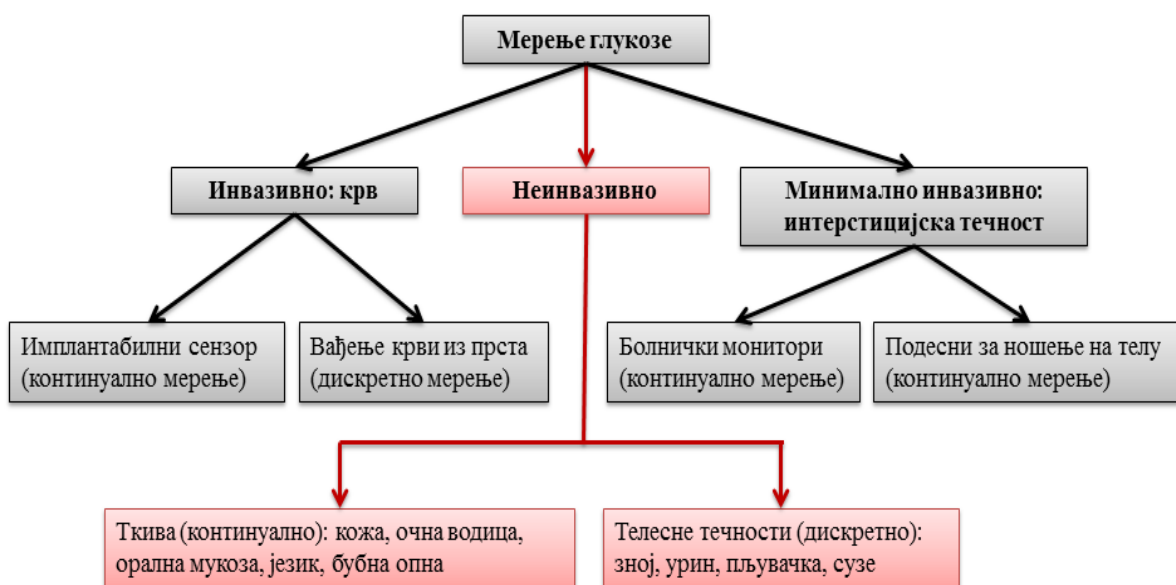
Неинвазивни сензори врше мерење концентрације глукозе или директно, на основу хемијске структуре молекула глукозе или индиректно мерењем неког ефекта секундарних процеса које ствара глукоза у крви, као што су промена температуре или промена рН вредности [31]. Једна од могућности за мерење концентрације глукозе на неинвазиван начин је коришћење неке друге телесне течности уместо крви, као што су пљувачка, урин, зној, сузе, очна водица.

Када су у питању континуалне методе мерења, оне могу бити остварене само преко одређених ткива као што су кожа, рожњача, орална мукоза, језик или бубна опна [32].

Истраживања на овом пољу укључују избор мерног принципа, избор места мерења на телу, развој сензора, *in vitro* евалуацију и побољшавање, *in vivo* тестови перформанси на лабораторијским животињама, и најзад клиничка испитивања на људима.

Развој оваквих сензора представља тежак задатак јер развијени сензор мора имати високу сензитивност, бити способан за детекцију врло слабих сигнала глукозе кроз ткиво које може да омета сигнал (коштано ткиво, масноћа, кожа...) и мора бити оспособљен за селекцију и издвајање информације о глукози од других конституената крви који су заступљени у већој концентрацији (протеини, хемоглобин, вода, ...) [33].

На слици 16 графички је представљена класификација модерних метода за неинвазивно мерење глукозе. Литература је богата публикацијама које пријављују истраживање и развој неинвазивних глукометара заснованих на методама реверзне јонтофорезе, полариметрије, конформације метаболичке топлоте, ултразвука, термалне емисије, електромагнетизма, фотоакустике, Раманове спектроскопије, апсорпције светлости и биоимпедансне спектроскопије. Осим избора технике и региона тела са којег ће се пратити ниво глукозе, пажња се придаје и могућим факторима који утичу на резултате мерења као што су знојење, боја коже, текстура коже, дебљина ткива, дисање, ток крви, покретање тела, амбијентална температура и притисак [34].



Слика 16. Класификација метода за мерење глукозе

Табела 3. Компаније које се баве истраживањем и развојем неинвазивних глукометара

Компанија	Производ	Метод	Место мерења, циљно ткиво	УРЛ
Calisto Medical	Glucoband	Биомагнетна резонанса	Кожа на ручном зглобу	http://www.calistomedical.com/
InLight Solutions		NIR – Блиска инфрацрвена спектроскопија	Непознато	http://www.inlightsolutions.com/index.html
Optiscan	OptiScanner	MIR – 9-10 μ m, 8 различитих таласних дужина	Кожа	info@optiscancorp.com
LighTouch Medical	LTM	Раманова спектроскопија	Крв, врх прста	http://www.lighttouchmedical.com/
Veralight, Inc	Scout DS	Флуоресценција, спектроскопија	Кожа, подлактица	http://www.veralight.com/index.html
Cybiocare	Photonic glucose sensor	NIR – Блиска инфрацрвена спектроскопија	Кожа	http://www.cybiocare.com/
OrSense Ltd.	NBM 200 MP (слика 17)	Оклузиона спектроскопска технологија	Крв, прст	http://www.orsense.com/
Sensys Medical Inc.	Sensys GTS™	NIR – Блиска инфрацрвена спектроскопија	Кожа, подлактица	http://www.sensysmedical.com/home.html
Sentek Group, Inc	Glucoview ocular insert	Crystalline Colloidal Array (CCA)	Очна водица	alsasom@aol.com

technology				
Sontra & Bayer Diagnostics	Symphony™ Diabetes Management System	Ултразвучна технологија	Кожа	http://www.sontra.com/
Visual Pathways Inc.	GlucoScope™ Monitor	Инфрацрвена спектроскопија	Очна водица	http://vispath.com/
ArithMed GmbH coop. Samsung Fine Chemicals Co., Ltd.	GluControl® GC300	NIR – Блиска инфрацрвена спектроскопија	Непознато	http://www.diabetesnet.com/diabetes-technology/meters-monitors/future-meters-monitors/arithmed-gmbh
Biovotion (Solianis)	Biovotion VSM	Импедансна спектроскопија	Кожа	http://www.biovotion.com/
SpectRx, Inc.	Altea MicroPor(TM) Laser	Ласерска технологија	Stratum corneum, интерстицијска течност	http://www.spectrx.com/
Aimedics	HypoMon® system	Мерење влажности коже и рада срца	Кожа, груди	http://www.hypomon.com/investor
NIR diagnostics	GlucoNIR™	NIR – Блиска инфрацрвена спектроскопија	Кожа	http://www.nirdiagnostics.com/
Integrity Applications	GlucoTrack	Симултано три технике: ултразвук, кондуктивност коже, топлотни	Ушна ресица	http://www.integrity-app.com/

капацитет



Слика 17. Неинвазивни сензор за мерење концентрације глукозе заснован на методи окузионе спектроскопије NBM 200 MP, OrSense Ltd. [35]

У наставку ће бити дат кратак приказ основних метода на којима се заснива већина сензора за неинвазивно мерење концентрације глукозе у крви, док се у Прилогу 2 налази табеларни преглед патената пријављених у области неинвазивног мерења глукозе у последњих 10 година, са кратким описом принципа рада и методе на којој је патент заснован.

2.4.1. Апсорпциона спектроскопија

Спектроскопска мерења глукозе у крви имају неколико предности. Као прво, метода је неинвазивна јер се информација о концентрацији глукозе у крви добија преко интеракције светлости и материје. Друга предност је могућност анализе више анализата, не само глукозе. Спектрална информација је комплексна и концентрације више компоненти могу бити одређене у исто време коришћењем хемометријских техника. Најзад, једна велика предност је што није потребан никакав хемијски агенс.

Када светлост ступа у интеракцију са биолошким ткивом, може наступити трансмисија, апсорпција, рефлексија или расејање у зависности и пропорционално хемијским компонентама узорка [36]. Ова својства интеракције светлости и материје се може искористити за аквизицију оптичког спектра глукозе, на неком делу тела и то на

потпуно неинвазиван начин. Оптичке методе су веома привлачне за развој уређаја за неинвазивно мерење концентрације глукозе у крви, јер захтевају релативно једноставан уређај којим се лако рукује, ниску цену и добијање резултата у кратком реалном времену [37].

Многа истраживања у области биомедицинске спектроскопије су рађена у видљивом и инфрацрвеном региону спектра између 590-950nm, [38], 1212-1850nm [39-41] и 2120-2380nm [42]. Ови опсези таласних дужина су изабрани зато што вода која чини велики процентуални удео ткива, има у овим областима релативно слабу апсорпцију светлости, па је мерни сигнал глукозе довољно јак. На тржишту постоји велики број сензора заснованих на коришћењу ове методе, као што се то може уочити у Табели 3.

Основни проблем у развоју и клиничкој примени ових уређаја за оптичко неинвазивно мерење концентрације глукозе је врло слаб сигнал који производе молекули глукозе у интеракцији са светлошћу. Не само да је интензитет промена сигнала у зависности од промене концентрације слаб, већ велику тешкоћу представља и екстракција сигнала глукозе из мноштва других сигнала који потичу од других компоненти ткива и који имају значајно веће концентрације од глукозе као што су протеини, уреа, мокраћна киселина, хемоглобин, албумин, вода исл [43]. Овај проблем често резултује ниском сензитивношћу и специфичношћу оптичким метода за праћење глукозе и потребно је много напора да се проблем превазиђе [3].

Средња инфрацрвена област (MIR) је мање фаворизована у односу на блиску инфрацрвену, због ограничених могућности пропагације светлости кроз ткиво. Вода јако апсорбује светлост ових таласних дужина, а апсорпционе траке других конституената ткива су веома широке и преклапају се са тракама глукозе, па је на тај начин дужина оптичког пута и дубина пенетрације ове светлости кроз ткиво прилично ограничена.

Побољшање неинвазивних техника за мерење глукозе заснованих на NIR технологији је предмет многобројних истраживања у свету и постоји више предлога решења како да се појача сигнал глукозе и његова екстракција из спектра ткива која укључују или

побољшање саме технологије аквизиције спектра или напредне методе за нелинеарно моделиње података [44-46].

Будући да су оптичке неинвазивне методе тема истраживања ове дисертације више о овој теми биће у поглављу 4. Методе и технике.

2.4.1.1. NIR сензор за мерење концентрације глукозе

Kawano и сарадници су 2013. године пријавили развој и одређивања фактора који утичу на сензитивност сензора за мерење концентрације глукозе на бази спектра коже у блиском инфрацрвеном домену [47].

Испитивања развијеног сензора вршена су само на једном испитанику у циљу утврђивања фактора који могу да утичу на тачност мерења и калибрације. За калибрацију је коришћен једноставан метод парцијалне линеарне регресије методом најмањих квадрата. Утврђено је да се највећа тачност сензора постиже уколико су испуњени следећи услови: (а) спектри се узимају на доњој страни длана, (б) са рефлектансном сондом већег пречника (18mm), (г) уколико је сензор фиксиран за сто и приликом прислањања длана на сензор силом не већом од силе гравитације, и (д) скоро симултаним мерењем концентрације глукозе у крви стандардном методом.

2.4.2. Реверзна јонтофореза

Јонтофореза је метод који се користи администрацију лекова већ више деценија, који користи мали електрични набој да достави лек или неке друге хемијске супстанце у организам трансдермалном рутом. Процес који се назива „реверзна јонтофореза“ (*reverse iontophoresis*) [48], односи се на супротан метод - метод екстракције молекула из тела, преко коже, а коришћењем електричне струје.

Након што је неколико научних студија постигло доказ концепта за неинвазивно мерење глукозе засновано на принципу реверзне јонтофорезе, развијен је уређај тзв. GlucoWatch [49]. Мерење концентрације глукозе код овог уређаја врши се преко коже,

тако што се изврши екстракција глукозе путем електро-осмотског тока након апликације на место додира са телом електричне струје ниске јачине.

Резултати клиничких истраживања показали су да се помоћу овог уређаја може мерити концентрација глукозе у опсегу 2.2 до 22.2 mmol/l, и то у континуитету до 12 часова, при чему је време кашњења за реалном вредношћу било око 18мин. Очитавања сензора и концентрација глукозе у крви су у линеарној вези.

Иницијална евалуација GlucoWatch глукометра, показала су да је то врло прецизан уређај за мерење концентрације глукозе, као и да је употреба уређаја безбедна и не производи оштећења на кожи [50]. Даља евалуација извршена у две опсежне клиничке студије и у оквиру домаћег амбијента пацијената показала је разлику у односу на мерење класичном методом помоћу вађења крви из прста ланцетом и употребе уређаја са трачицама, и то -0.01 и 0.26mmol/l [51]. Ове студије су пријавиле да не постоје оштећења коже приликом редовне употребе, у форми едема и еритрема, или су ове промене веома благе и нестају након неколико дана. Учестаност мерења и потпуна аутоматизација процеса мерења како је закључено, чине GlucoWatch веома ефикасним у детекцији хипогликемије и препоручују га за употребу у редовној медицинској пракси [52]. Такође је закључено, да ношење овог уређаја толеришу и деца и адолесценти и да је употреба код дијабетичара у овом добу, доводило до детекције ноћних епизода хипогликемије и адекватне правовремене реакције [53, 54].

Међутим, каснија истраживања уређаја типа GlucoWatch G2, показала су да је у групи од 200 корисника са дијабетесом типа 1, дошло до постепеног смањења употребе и то услед иритације коже (76%), честих пропуштених мерења (56%), сувише честих аларма за хипогликемију или хипергликемију (47%) као и погрешних очитавања концентрације глукозе (33%) [55]. Последња процена GlucoWatch уређаја закључила је да његова употреба не доводи до побољшања у клиничким резултатима, и да је врло вероватно да ће корисници са дијабетесом одустати од употребе услед великог броја непријатних споредних ефеката [56].

Недавно је још један сензор заснован на принципу реверзне јонтофорезе представљен на тржишту [57]. Овај бифункционални сензор развијен је за симултану екстракцију и детекцију субкутане глукозе.



Слика 18. GlucoWatch – уређај за неинвазивно мерење глукозе методом реверзне јонтофорезе [58, 59]

Сензор има планарну конструкцију састављену од три електроде и вишеслојне сензитивне мембране коју сачињавају посредник, ензим и повезујући агенс. Мембрана на бази хидрогела се поставља на горњи део сензора да служи као колектор екстраховане глукозе. Сензор је испробан за неинвазивно мерење глукозе на огољеној кожи мишева као моделу, и постигнута је линеарна веза у моделу ($r^2 = 0.99$) између субкутане концентрације глукозе (у опсегу од 0-18 mM) и читавања сензора. Постигнути резултати сугеришу да је овакава сензор подесан за субкутано неинвазивно мерење глукозе.

2.4.3. Фотоакустична спектроскопија

У фотоакустичној спектроскопији, кратки пулсеви ласерске светлости се усмеравају на ткиво и резултујући акустични сигнал зависи од оптичких и физичких карактеристика узорка. Такав, резултујући акустични сигнал се може искористи за одређивање концентрације глукозе у крви на неинвазиван начин. Развој оптоелектронике омогућује фотоакустичном методу потенцијал за портабилност уређаја као и дуг век трајања компоненти уколико се користе пиезоелектричне компоненте и компактна електроника, као и диодни ласери са извором оптичког зрачења неколико реда величине испод прага

бола или прага оштећења ткива [60]. Резултати истраживања ове методе, показали су да се концентрација глукозе може израчунати из фотоакустичних резултата мерења и то коришћењем индивидуалне линеарне регресије. Публиковани *in vitro* и *in vivo* резултати пријављују постигнут коефицијент корелације од 0,96 у линеарној регресији између предвиђених и клинички измерених концентрација глукозе. Поновљивост и сензитивност фотоакустичних мерења глукозе су предмет даљих истраживања.

Weiss и сарадници су 2007. године пријавили развој новог неинвазивног сензора (Aprise®, Gluco Inc, Boulder, CO) на бази фотоакустичних својстава крви [61]. Овај истраживачки тим је имао средњу релативну грешку мерења од 19.9% између резултата мерења сензором, и стварних вредности концентрације глукозе у крви, што сматрају да доказује потенцијал употребе у терапији дијабетеса.

Нешто другачији концепт који комбинује средњи регион инфрацрвене области (MIR) и фотоакустичну детекцију представио је немачки тим истраживача 2005. године [62]. Основни концепт овог уређаја за неинвазивно мерење глукозе *in vivo*, је употреба квантих каскадних ласера као пулног извора оптичке енергије и квантификацију апсорпције коришћењем фотоакустичног метода. У експериментима су коришћена два таква ласера који емитују светлост на 1080 и 1066 cm^{-1} .

Ове таласне дужине представљају максимум и минимум мода глукозе. Коришћење 1080 cm^{-1} постигнута је висока корелација са концентрацијом глукозе у *in vitro* студијама.

2.4.4. Конформација метаболичке топлоте

Конформацију метаболичке топлоте су прво предложили Ко и сарадници, и овај метод се базира на концепту да је концентрација глукозе функција скупа метаболичких параметара: генерисане топлоте, концентрације хемоглобина, оксихемоглобина, брзине протока крви и њихових комплексних међудејстава [63]. Систем развијен на овом принципу интегрише термалне и спектроскопске сензоре који континуално мере параметре који су у релацији са концентрацијом глукозе, и последично се користе за

моделирање регресионог модела и вршење калибрације одакле се добија концентрација глукозе.

У поменутом истраживању концентрација глукозе је мерена у распону од 50 до 400 mg/dl (2,775-22,2mmol/l) и добијена је прецизност мерења од 10mg/dl (0.555mmol/l), док је коефицијент корелације износио 0,96.

Први развијени уређај за неинвазивно мерење концентрације глукозе заснован на овом принципу састојао се од сензора који прикупља податке и електронских делова смештених у чип картицу. Сензор за прикупљање података, садржи различите изворе зрачења и детекторе који интерагују са људским телом када се прст постави на сензор [64]. Мерење телесне температуре врши се на врху прста преко 4 сензора, брзина протока крви у прсту је у пропорцији са одређеном термалном проводношћу коже, трансфер топлоте се мери преко два термистора, а концентрација хемоглобина и оксихемоглобина се изводе из оптичких мерења заснованих на принципу дифузне рефлектансе. Сви ови независни сензорски сигнали се обрађују мултиваријационом статистичком анализом. Регресиона анализа показује корелациони коефицијент од 0.91 у лабораторијским условима.

Клиничка испитивања су у току ради даље карактеризације перформанси ове технологије.

2.4.5. Биоимпедансна спектроскопија

Биоимпедансна спектроскопија се налази у широкој употреби за различите биолошке и медицинске сврхе. Анализа био-електричном импедансом користи електроде за апликацију струје врло слабе јачине у физиолошке течности или ткива. Мера отпора протоку струје кроз ткиво рефлектује промене у диелектричној димензији узорка и тако је могуће установити хемијски састав узорка [37].

Биоимпедансна спектроскопија је искоришћена као основни принцип на којем се заснива сензор за неинвазивно оптичко континуално мерење глукозе 2003. године [65].

Прва серија експеримената тада урађена сматрало се да је доказала исправност концепта на којем је уређај заснован. Развијени сензор користи електромагнетне таласе одређене фреквенције који ступају у интеракцију са кожом и поткожним ткивом и мери електрична својства.

Импеданса сензора на задатој резонантној фреквенцији зависи од промена импедансе у кожи и ткиву, као и променама глукозе у крви које су праћене варијацијама у проводљивости. Серија експеримената показала је добру корелацију између читавања сензора и промена у концентрацији глукозе, али је закључено да неки фактори као што су знојење, варијације у температури као и промена места сензора имају утицај на мерења и поузданост сигнала.

На основу резултата поменуте студије, развијен је мониторинг уређај Pendra, који подсећа на ручни сат и производ је пуштен на холандско тржиште 2003. Године, након одобрења Европског комитета (the Conformite Europeene (CE)) [66]. Постмаркетиншка валидациона студија је касније демонстрирала да уређај Pendra има недовољну тачност, опрема се показала погодном само за малу групу корисника у зависности од диелектричних својстава коже и произвођач је повукао инструмент са тржишта уз признање ограничених перформанси и потребе за даљим побољшањима.

Caduff и сарадници су касније вршили побољшања на овом сензору, и пријавили да су у котролисаним условима постигли бољи корелациони коефицијент и стандардну грешку предикције, али у неконтролисаним, реалним условима, резултати су били лошији и да и даље постоји простор за побољшања [67].



Слика 19. Pendra, уређај за неинвазивно мерење глукозе на принципу биоимпедансне спектроскопије [68]

Даља побољшања су уследила у следећој серији испитивања и резултирала су развојем мултисензорског система са додатним сензорима за мерење фактора који су идентификовани као пертурбације информације о глукози са циљем њихове елиминације [69]. Мултисензорски приступ је довео до јасних предности у односу на претходне верзије, и у даљим истраживањима планирано је да се изврши комбинација прикупљених досадашњих сазнања са бољим разумевањем физиологије *in vivo* процеса [70].

2.4.6. Ултразвук

Ултразвук се углавном користи у побољшању трансдермалне испоруке лекова, и овај феномен је познат под називом сонофореза или фонофореза. Показано је да се сонофореза такође може искористити и за екстракцију молекула глукозе из коже [71], и да тако може послужити као метод за неинвазивно мерење концентрације глукозе.

Овај метод користи ултразвук од 2020kHz фреквенце, који се обично данас производи модерном опремом базираном на пиезоелектричном ефекту. Ултразвук повећава пермитивност коже до интерстицијске течности, чиме омогућава транспорт молекула глукозе ка површини епидермиса која тада може бити мерена стандардним електрохемијским сензорима.

Претходни третман коже ултразвуком побољшава трансдермални транспорт, од неколико процената па до неколико редова величине, у зависности од услова, и на тај начин се обезбеђује довољна количина анализата за детекцију. Ова техника је евалуирана на људима, а компарација са нивоом глукозе у венској крви показала је добру корелацију [72]. У истом истраживању предложен је и трансдермални система у виду затворене петље попут фластера или наруквице који комбинује трансдермалну испоруку инсулина као одговор на очитану вредност глукозе.

Ултразвук се може користити за мерење глукозе и на друге начине. Димензија, као што је дебљина коже (дермис, епидермис, поткожно масно ткиво) се може мењати у зависности од концентрације глукозе и на тај начин са променом димензије мења се

дужина оптичког пута односно, време прелета ултразвучног пулса. Мерење времена прелета ултразвука се тако може искористити као извор информације о количини глукозе у том ткиву [73].

2.4.7. Електромагнетне методе

Последњих година, нарочит интерес је посвећен истраживањима промена диелектричних својстава које изазива глукоза у људским ткивима, у циљу искоришћења ових феномена за развој неинвазивне методе за мерење глукозе.

Gulin и сарадници су 2003. године, пријавили неинвазивни метод мерења глукозе коришћењем електромагнетног сензора који се заснива на коришћењу Еди струја [74]. Овај метод омогућује детекцију нивоа гликемије у крви кроз варијацију диелектричних параметара крви. Како је показано *in vitro*, и у статичним и у симулираним динамичким тестовима циркулације крви, могуће је на овај начин постићи неинвазивно мерење гликемије. Принцип и метод за неинвазивно мерење показали су се охрабрујућим, а резултати дају добру корелацију између сигнала са сензора са концентрацијом глукозе у крви измереном стандардном методом, али модел захтева додатна усавршавања.

Тура и сарадници су развили сензор заснован на принципу електромагнетне индукције и способности овог сензора тестиране су *in vitro* на растворима сличних својстава крви [75]. Прелиминарна испитивања раствора са концентрацијама глукозе од 5 -78mg/dL, показала су да је развијени електромагнетни сензор у могућности да детектује варијације концентрације глукозе и да је веза између излаза са сензора и концентрације глукозе у растворима, у основи линеарна.

2.4.8. Флуоресценција

Флуоресценција је алат који се налази у широкој употреби у биохемији, биофизици, аналитичкој хемији, имунологији и биологији ћелије. Употреба и примена флуоресценције налазе се у експанзији захваљујући развоју нових технологија светлосних извора и детектора [76].

Проблеми са постојећим уређајима за континуално мерење глукозе *in vivo*, стимулисале су развој алтернативних приступа мерењу глукозе и у последње време, уређаји засновани на примени флуоресценције показали су бројне предности [29]. Системи засновани на флуоресценцији привукли су много пажње, нарочито услед добрих својстава које имају приликом анализа у биологији [77].

Познато је да сузе, као телесна течност рефлектују концентрацију глукозе сличну оној у крви, и да се могу искористити као извор информација о глукози, и управо су оне искоришћене као узорак из којег сензори који користе појаву флуоресценције могу да измере концентрацију глукозе и то на неинвазиван начин, са временским кашњењем од приближно 30мин, при чему не постоји интерференција услед флукуација интензитета светлости из околине [78].

Сензор може бити израђен у облику једнократног контактеног сочива, које захтева ексцитациони извор и детектор. Оваква контактна сочива могу омогућити кориснику са дијабетесом да колориметријске промена, односно промене боје сочива, служе као индикатор концентрације глукозе у сузама и крви [79]. Резултати *in vivo* анализа са таквим транспарентним контактним сочивима која се ексцитују на 488nm, показују резултате који су у корелацији са контролним вредностима глукозе. Особи са дијабетесом је довољно да преконтролише боју сочива у огледалу и упореди је са прекалибрисаном листом боја, у којој свака боја одговара одређеној концентрацији глукозе [80].

Међутим, будући да су контактна сочива у контакту са организмом, дугорочне студије токсичности и биокомпатибилности су неопходне [81].

2.4.9. Полариметрија

Полариметрија је сензитивна, неинвазивна техника за мерење оптичке активности неорганских и органских компоненти. Супстанца се сматра у оптички активном уколико се линерано поларизована светлост ротира када пролази кроз њу. Интензитет

оптичке ротације је одређен молекуларном структуром и концентрацијом хиралних молекула у супстанци.

Полариметријски метод је једноставан и прецизан начин за одређивање и истраживање структуре у макро, полу-микро и микро анализама скупих и јединствених узорака. Полариметрија се користи у контроли квалитета, контроли процеса и истраживању фармацеутских, хемијских и прехранбених производа, као и есенцијалних уља и зачина. У Сједињеним Америчким Државама, полариметрија је у тако широкој употреби, да *United States Pharmacopoeia* и *Food & Drug Administration* организације укључују у спецификације бројних производа и полариметријске карактеристике.

Дакле, полариметрија је као метод, дуги низ година присутна у фармацеутској, прехранбеној и другим индустријама у циљу мерења супстанци као што је глукоза [36]. Међутим, кожа као ткиво сматра се да није погодна за полариметријска мерења, јер високи коефицијент расејања светлости доводи до комплетне деполаризације уласног снопа светлости. Из тог разлога, највећи број истраживања у примени полариметријског метода за неинвазивно одређивање глукозе посвећен је очној водици, која представља савршени оптички медијум са довољним оптичким путем и има време кашњења од максимално 5мин у односу на промене концентрације глукозе у крви [82].



Слика 20. Пример равански поларизоване светлости (прерађено на основу [3])

Апарат за одређивање нивоа глукозе код пацијента укључује извор светлости који ствара усмерен сноп светлости изабране таласне дужине. Овај сноп светлости је тако подешен да пролази кроз део ока и рефлектује се од очног сочива под одређеним углом. Анализатор поларизованости мери поларизованост рефлектоване светлости која излази из ока. Процесор одређује оптички пут рефлектоване светлости кроз очну водицу ока. Затим се концентрација глукозе израчунава на основу измерене поларизације и одређеног оптичког пута [83].

Иако на полариметријске методе врло слаб неповољан утицај имају температурне и рН флукуације, неопходно је савладати још неке додатне проблеме како би се извршила успешна квантификација концентрације глукозе *in vivo* [84]. Постоје ограничења у погледу изложености ока директној светлости, затим уклањања артефаката из добијеног сигнала, као и оптичког шума који стварају друге супстанце; постоје и проблеми у развоју техника за мерење врло малих углова [36].

Најзад, модификовано интраокуларно сочиво и поларизациони модулатор на бази течних кристала покретан синусоидним сигналимa, такође су предложени као технике побољшања у циљу напредовања ове методе ка *in vivo* мерењима глукозе у људском оку [85, 86].

Полариметрија је основа и методе испитиване у циљу развоја уређаја за неинвазивно мерење глукозе у овој дисертацији, али са модификацијом примене на кожу и трансдермално мерење, па ће више речи о овој методи бити у поглављу 5 – Методе и технике.

2.4.10. Раманова спектроскопија

Раманова спектроскопија је техника заснована на појави нееластичног расејања монохроматске светлости, обично произведене ласером. Нееластично расејање је феномен који се јавља када се фреквенца фотона монохроматске светлости промени након интеракције са узорком. Фотони ласерске светлости су најчешће апсорбовани од стране узорка, а онда поново реемитовани. Фреквенција реемитованих фотона је

померена у односу на оригиналну монохроматску фреквенцу, што се назива Раманов ефекат. Овај померај – Раманов померај обезбеђује информације о вибрационим, ротационим и другим транзицијама молекула ниских фреквенци, односно мале енергије. Раманова спектроскопија се може применити за изучавање чврстих, течних и гасовитих узорака.

Овај тип спектроскопије користи изворе ласерског зрачења од видљивог до MIR дела спектра и мери врло слабе сигнале у транспарентним узорцима. Измерени фотони у нормалним случајевима имају већу таласну дужину и мању енергију (10^{-3} пута) од улазне светлости, и зато захтевају дужи период аквизиције сигнала у односу на друге оптичке методе [87]. Вода има слаб индекс расејања и то Рамановој спектроскопији даје предност врло слабе интерференце од стране воде приликом анализа других субстанци. Друга предност је што су резултујуће траке уске и имају врло изражене пикове, што олакшава посао раздвајања сигнала, за разлику од апсорпционе спектроскопије где то није случај [88].

Стимулисана Раманова спектроскопија се користи за неинвазивно мерење концентрације Рамански активних молекула, преферентно глукозе у очној водици. Уређај и метод користе 2 монохроматска ласерска снопа који се усмеравају у очну водицу, односно у око. Овај процес доводи до Рамановог расејања што резултира одговарајућим Рамановим померајем који се детектује на излазу из ока. Овако добијени сигнал се пречишћава и појачава, а затим претвара у електрични сигнал као репрезент концентрације глукозе у очној водици [89].

2.4.11. Спектроскопија термалне емисије

Термална емисиона спектроскопија је нов, модеран метод, истраживан у сврху примене за неинвазивно мерење глукозе, који користи природно инфрацрвено зрачење које људско тело емитује.

Мониторинг уређај развијен од стране компаније Infratec, користи овај принцип рада за неинвазивно мерење концентрације глукозе преко бубне опне [90]. Спектрална

емисивност инфрацрвеног зрачења бубне опне човековог организма садржи спектралну информацију различитих супстанци у крви и у директној је вези са концентрацијом глукозе. Бубна опна је изабрана као циљно ткиво јер је познато да дели снабдевање крвљу са хипоталамусом, терморегулационим центром људског тела и зато представља важно место за мерење телесне температуре.

Развијени инструмент користи методе аналитичке хемије и спектроскопије за раздвајање спектралних карактеристика различитих конституената крви и ослања се на коришћење ИР филтера. Прототип уређаја је калибрисан коришћењем нелинеарних регресионих модела на укупном броју од 20 испитаника и тестиран је на 6 испитаника у потпуно слепој студији. Прва независна клиничка студија напредног прототипа за неинвазивно мерење глукозе заснованог на термалној емисији у средњој инфрацрвеној области добила је клинички прихватљиву тачност резултата и то без потребе за индивидуалним дневним калибрацијама уређаја.

Метод и инструмент који раде на овом принципу су и пријављени као патент [91].

2.5. Преглед стандарда и статистичких метода за процену перформанси уређаја за мерење концентрације глукозе у крви

2.5.1. Грешке мерења концентрације глукозе и публиковани стандарди

Тестови за контролисање глукозе имају важну улогу у дијагнози и терапији пацијенат а дијабетесом. Нажалост, сваки тест, па и лабораторијски, садржи одређену грешку. Клиничка својства тестова, сензитивност и специфичност, који се једним термином називају дијагностичком ефикасношћу, садрже довољан број грешака, независно од извора грешке. За лекара који треба да изврши дијагнозу, једина важна грешка јеукупна грешка мерења која обједињује све могуће грешке.

Тотална укупна грешка представља разлику између измерене вредности концентрације глукозе и стварне вредности концентрације глукозе. Ова разлика настаје не само као последица постојања грешке анализе, већ може укључивати и грешек настале пре и после мерења. У преаналитичке грешке спадају оне грешке које настају пре вршења мерења, и укључују на пример, недовољну чистоћу коже на месту узимања узорка капиларне крви, што резултује узимањем нерепрезентативног узорка, затим разређивање капиларне крви уколико се кап крви не размаже адекватно на трачицу и слично. Постаналитичке грешке су оне које се јављају након мерења.

Ниво потребних перформанси уређаја регулише се стандардима, који морају бити засновани на клиничким потребама, али у довољно реалним границама тако да могу бити достигнуте. Клинички захтеви прецизирају потребе које ови уређаји треба да задовоље, независно од тога да ли је те потребе могуће испунити. Пример стандарда постављеног од Америчке Асоцијације за Дијабетес из 1987. године, који је заснован на клиничким захтевима и поставља као критеријум да грешка мерења буде мања од 10% у 100% мерења, је пример нереално постављеног стандарда и самим тим недостижног [92].

У табели 4 приказани су и бјављени стандарди који регулишу тачност уређаја за мерење концентрације глукозе, и њихова карактеризација на основу специфицираних граница унутар којих треба да се нађу грешке мерења [92].

Интернационална организација за стандардизацију (ISO) 15197 и Институт за клиничке и лабораторијске стандарде CLSI C30А објавиле су скупове стандарда који посебно регулишу захтеве за уређаје за мерење концентрације глукозе. Интернационална организација за стандардизацију 15197 дефинише минимум прихватљиве тачности као:

„ Деведесет пет процената (95%) индивидуалних резултата мерења концентрације глукозе треба да буде у границама $\pm 0.83 \text{ mmol/l}$ (15mg/dl) према процедури датој од стране произвођача за концентрације глукозе $\leq 4.2 \text{ mmol/l}$ (75mg/dl) и унутар $\pm 20\%$ за концентрације глукозе $> 4.2 \text{ mmol/l}$ (75mg/dl).“ [93]

Једноставније речено, до 5% резултата мерења глукозе може бити медицински неприхватљиво. У случају уређаја за самомерење глукозе, то значи да уколико корисник мери концентрацију глукозе у крви 4 пута дневно, сваких пет дана, корисник може да има медицински неприхватљив резултат (једном у 20 мерења).

Табела 4. Објављени стандарди за мерење глукозе [92]

	Процент специфицираних података	
	<100%	100%
Један скуп граница	ISO 15197 CLSI C30A FDA (SMBG) CLIA 88 ADA 1996	ADA 1987
Више граница	-	Мрежа грешака (Error grid)

2.5.2. Clarke Error мрежа (*Clarke Error Grid*)

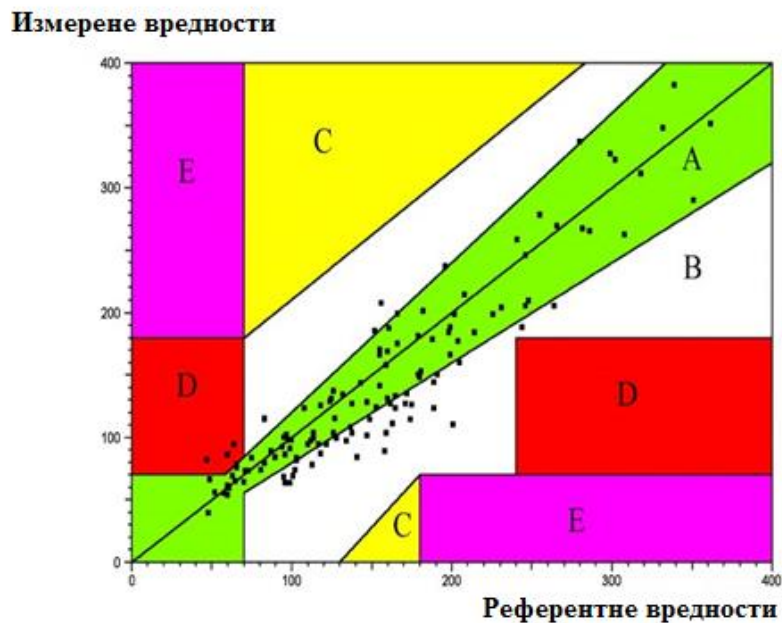
Кларкова мрежна анализа грешака (Clarke Error Grid Analysis – EGA) је развијена 1987. године за потребе квантификовања тачности уређаја за самомерење глукозе [94]. Користи се за квантификовање клиничке тачности развијених уређаја, путем компарације са референтним вредностима. Данас, EGA је прихваћена као златни стандард за одређивање тачности глукометара.

Кларкова мрежа грешака заправо представља дијаграм расипања (*Scatter plot*) који резултате мерења глукометром дели на 5 региона (Слика 21): А, В, С, D и Е.

Вертикална оса представља резултате мерења тестираног глукометра, док су на хоризонталној оси одговарајуће вредности добијене коришћењем референтне методе (лабораторијска мерења). Дијагонала представља савршено поклапање између резултата добијених глукометром и референтном методом. Тачке изнад дијагонала представљају веће вредности измерене глукозе, а тачке испод, мање вредности

измерене глукозе у поређењу са тачним вредностима које су добијене референтном методом.

Овај метод је заснован на претпоставкама које рефлектују принципе медицинске праксе: 1) циљни опсег у којем треба бити ниво глукозе у крви је између 70 и 180 mg/dl (3.9 – 10 mmol/l), 2) пацијент треба да предузме кораке да промени ниво глукозе у крви уколико је измерени ниво глукозе ван прецизираних граница, 3) корективна терапија није адекватна уколико су резултати терапије такви да се ниво глукозе у крви нађе ван дефинисаних граница и 4) не сме се дозволити пропуст да ниво глукозе мањи од 70 mg/dl односно, већи од 240 mg/dl буде неадекватно третиран [94]. Вредност од 240 уместо 180 mg/dl, процењује се на основу резултата у пракси да уколико се примени терапија при нивоу од 180 mg/dl, често ниво глукозе падне испод дозвољене границе [94].



Слика 21. Пример Кларкове мрежне анализе грешака [95]

На основу ових претпоставки, мрежа је подељена у пет региона, односно зона са различитим нивоом тачности, односно нетачности мерења глукометром. Зона А представља вредности глукозе које одступају од референтне вредности за 20% или су у

зони хипогликемије ($< 70 \text{ mg/dl}$). Вредности глукозе које се нађу у овој зони се могу сматрати тачним у клиничком смислу, јер би водили ка клинички коректној терапији. Горња и доња В зона представљају вредности глукозе које одступају од референтних вредности $>20\%$, али ово одступање је бенигног карактера или не захтева корективну терапију.

Зона С резултује прејаком корективном терапијом нивоа глукозе, таква терапија може проузроковати да ниво глукозе падне испод дозвољене границе или се повећа изнад дозвољеног нивоа од 180 mg/dl . Зона D представља зону грешака које су опасне. Стварне вредности глукозе у овој зони су ван регије која претпоставља да је потребна терапија, али су вредности које је пацијент измерио глукометром у зони за коју је предвиђена терапија. Зона Е је зона „погрешне терапије“. Вредности које је измерио пацијент су супротне стварним вредностима и терапија коју ће пацијент применити је супротна од оне која би била потребна.

Укратко речено, вредности у зонама А и В су клинички прихватљиве, док у зонама С, D, и Е су потенцијално опасне и могу водити ка клинички вероватно значајним грешкама, које даље воде ка последицама опасним по здравље пацијента.

ЕГА представља важан и веома користан методолошки допринос за евалуацију тачности уређаја за мерење глукозе. Ова анализа на веома тачан и адекватан начин приказује резултате мерења тако да се задовоље питања од клиничког интереса за пацијента. Такође, овај метод се врло лако може и модификовати за друге дозвољене границе нивоа глукозе, што је некада заиста потребно, као на пример код пацијената у трудноћи.

У протеклим годинама од првобитног објављивања, метод Кларкове мрежне анализе грешака је изузетно прихваћен и примењиван у истраживањима и данас се сматра својеврсним стандардом за евалуацију уређаја за самомерење глукозе.

2.5.3. Процена тачности постојећих уређаја за инвазивно мерење глукозе

Самоконтролисање концентрације глукозе у крви код дијабетичара омогућује пацијенту да ефективно контролише свој ниво глукозе у крви.

Клиничке предности самоконтроле дијабетичара су широко прихваћене и уређаји за самоконтролу нивоа глукозе у крви се препоручују од стране лекара као интегрална компонента терапије дијабетеса.

Интернационални стандард DIN EN ISO 15197:2003 регулише спецификације и захтеве које уређаји за самоконтролисање нивоа глукозе у крви морају да испуне, односно дефинише захтеве у погледу перформанси система, тачности и прецизности уређаја [96]. Поред тога, овај стандард дефинише и процедуре за верификацију и валидацију перформанси од стране предвиђених корисника, тј. у овом случају дијабетичара. Захтеви у погледу минималне тачности система за мерење глукозе у крви, засновани су на захтевима из медицинске праксе и прецизирају да $\geq 95\%$ индивидуалних резултата мерења треба да буду у границама $\pm 15 \text{ mg/dl}$ ($\pm 0.8325 \text{ mmol/l}$) у односу на резултате пријављене од стране произвођача према прописаној мерној процедури за концентрације глукозе $< 75 \text{ mg/dl}$ (4.2 mmol/l), односно у границама $\pm 20\%$ за концентрације глукозе $\geq 75 \text{ mg/dl}$ [96].

У Европи, произвођачи уређаја за самомерење концентрације глукозе морају да обезбеде доказе о слагању са прописима стандарда DIN EN ISO 15197:2003, како би добили *Conformite' Europe'enne* (CE) ознаку за свој производ.

Евалуација 27 система за мерење концентрације глукозе у крви, на инвазиван начин, помоћу тест трачица, показала је да 16 од њих задовољавају минимум захтева тачности од стране стандарда, односно 95% измерених резултата је било у границама минимално прихватљиве тачности. То значи да чак 40% постојећих система за инвазивно мерење концентрације глукозе у крви, који се налазе у редовној употреби широм света, не задовољава минимум захтева у погледу тачности прописаних од стране DIN EN ISO

15197:2003 [97]. Употреба неадекватних уређаја носи са собом врло висок ризик од погрешног избора терапије пацијента са дијабетесом и последично настанак озбиљних здравствених компликација. У Табели 5 наведени су резултати истраживања тачности за 27 изабраних система за мерење концентрације глукозе у крви који се налазе у употреби широм света.

Оптичко неинвазивно транскутано мерење концентрације глукозе у крви

Јелена Мунћан – Докторска дисертација

Табела 5. Резултати оцене тачности система за мерење концентрације глукозе у крви (адаптирано из [97])

Уређај за мерење концентрације глукозе	ISO 15197		Концентрација глукозе < 4,1625mmol/l			Концентрација глукозе ≥ 4,1625mmol/l			
	Испуњени захтеви	Процент	±0.8325 mmol/l	±0.555 mmol/l	±0.2775 mmol/l	±20%	±15%	±10%	±5%
Accu-Chek Active	да	100.0 % (200/200)	100% (30/30)	93% (28/30)	47% (14/30)	100% (170/170)	98% (166/170)	88% (149/170)	52% (88/170)
Accu-Chek Aviva	да	100.0 % (200/200)	100% (36/36)	83% (30/36)	69% (25/36)	100% (164/164)	99% (162/164)	95% (156/164)	71% (117/164)
Ascensia Contour	да	98.5% (197/200)	100% (36/36)	86% (31/36)	64% (23/36)	98% (161/164)	91% (149/164)	74% (121/164)	44% (72/164)
Beyer Contour TS	не	90.0% (180/200)	98% (39/40)	83% (33/40)	43% (17/40)	88% (141/160)	70% (112/160)	45% (72/160)	18% (29/160)
Beurer GL 30	не	91.3% (179/196)	61% (22/36)	44% (16/36)	22% (8/36)	98% (157/160)	90% (144/160)	68% (108/160)	37% (59/160)

Оптичко неинвазивно транскутано мерење концентрације глукозе у крви

Јелена Мунћан – Докторска дисертација

Табела 5. Резултати оцене тачности система за мерење концентрације глукозе у крви (адаптирано из [97]) – наставак 1

Уређај за мерење концентрације глукозе	ISO 15197		Концентрација глукозе < 4,1625mmol/l			Концентрација глукозе ≥ 4,1625mmol/l			
	Испуњени захтеви	Процент	±0.8325 mmol/l	±0.555 mmol/l	±0.2775 mmol/l	±20%	±15%	±10%	±5%
Bionime Rightest GM101	да	100.0 % (200/200)	100% (40/40)	100% (40/40)	80% (32/40)	100% (160/160)	99% (158/160)	93% (148/160)	61% (97/160)
Bionime Rightest GM300	да	100.0 % (200/200)	100% (40/40)	93% (37/40)	75% (30/40)	100% (160/160)	95% (152/160)	84% (135/160)	53% (85/160)
Clever Chek TD-4222	не	90.5 % (181/200)	71% (24/34)	56% (19/34)	21% (7/34)	95% (157/166)	84% (139/166)	68% (113/166)	37% (62/166)
Finetest	да	97.5 % (195/200)	100% (32/32)	91% (29/32)	63% (20/32)	97% (163/168)	92% (155/168)	65% (110/168)	27% (45/168)
Finetest Auto-coding	не	94.5 % (189/200)	89% (34/38)	63% (24/38)	24% (9/38)	96% (155/162)	90% (145/162)	71% (115/162)	39% (63/162)

Оптичко неинвазивно транскутано мерење концентрације глукозе у крви

Јелена Мунћан – Докторска дисертација

Табела 5. Резултати оцене тачности система за мерење концентрације глукозе у крви (адаптирано из [97]) – наставак 2

Уређај за мерење концентрације глукозе	ISO 15197		Концентрација глукозе < 4,1625mmol/l			Концентрација глукозе ≥ 4,1625mmol/l			
	Испуњени захтеви	Процент	±0.8325 mmol/l	±0.555 mmol/l	±0.2775 mmol/l	±20%	±15%	±10%	±5%
FineTouch	не	90.5 % (180/200)	94% (34/36)	72% (26/36)	31% (11/36)	89% (146/164)	82% (134/164)	71% (116/164)	41% (68/164)
For a TD-4227	не	89.0 % (178/200)	84% (32/38)	50% (19/38)	16% (6/38)	90% (146/162)	78% (126/162)	60% (97/162)	30% (48/162)
FreeStyle Freedom	да	100.0 % (200/200)	100% (38/38)	92% (35/38)	66% (25/38)	100% (162/162)	100% (162/162)	94% (152/162)	69% (111/162)
FreeStyle Lite	да	100.0 % (200/200)	100% (36/36)	89% (32/36)	47% (17/36)	100% (164/164)	99% (162/164)	87% (142/164)	53% (87/164)
GlucoCard - X - meter	да	99.0 % (198/200)	95% (36/38)	92% (35/38)	74% (28/38)	100% (162/162)	93% (150/162)	82% (133/162)	52% (84/162)

Оптичко неинвазивно транскутано мерење концентрације глукозе у крви

Јелена Мунћан – Докторска дисертација

Табела 5. Резултати оцене тачности система за мерење концентрације глукозе у крви (адаптирано из [97]) – наставак 3

Уређај за мерење концентрације глукозе	ISO 15197		Концентрација глукозе < 4,1625mmol/l			Концентрација глукозе ≥ 4,1625mmol/l			
	Испуњени захтеви	Процент	±0.8325 mmol/l	±0.555 mmol/l	±0.2775 mmol/l	±20%	±15%	±10%	±5%
Glucifix mio	не	93.5 % (187/200)	80% (32/40)	50% (20/40)	25% (10/40)	97% (155/160)	94% (150/160)	76% (121/160)	41% (65/160)
GlucoHexal	не	80.0 % (160/200)	70% (21/30)	30% (9/30)	7% (2/30)	82% (139/170)	65% (111/170)	43% (73/170)	16% (27/170)
Gluco-Test TD-4209	не	94.5 % (189/200)	91% (31/34)	79% (27/34)	50% (17/34)	95% (158/166)	88% (146/166)	68% (113/166)	31% (52/166)
IME-DC BG meter	не	88.5 % (177/200)	76% (26/34)	47% (16/34)	26% (9/34)	91% (151/166)	87% (144/166)	70% (117/166)	37% (62/166)
One Touch Ultra 2	да	100.0 % (200/200)	100% (36/36)	97% (35/36)	69% (25/36)	100% (164/164)	96% (158/164)	76% (124/164)	43% (71/164)

Оптичко неинвазивно транскутано мерење концентрације глукозе у крви

Јелена Мунћан – Докторска дисертација

Табела 5. Резултати оцене тачности система за мерење концентрације глукозе у крви (адаптирано из [97]) – наставак 4

Уређај за мерење концентрације глукозе	ISO 15197		Концентрација глукозе < 4,1625mmol/l			Концентрација глукозе ≥ 4,1625mmol/l			
	Испуњени захтеви	Процент	±0.8325 mmol/l	±0.555 mmol/l	±0.2775 mmol/l	±20%	±15%	±10%	±5%
One Touch Ultra Easy	да	99.0 % (198/200)	100% (36/36)	94% (34/36)	75% (27/36)	91% (150/164)	91% (150/164)	71% (116/164)	30% (50/164)
Optimum Xceed (E)	да	98.5% (197/200)	98% (39/40)	93% (37/40)	43% (17/40)	99% (158/160)	93% (149/160)	78% (125/160)	44% (71/160)
Optimum Xceed (F)	да	99.0 % (198/200)	98% (39/40)	90% (36/40)	63% (25/40)	99% (159/160)	95% (152/160)	77% (123/160)	46% (74/160)
SensoCard Plus	да	99.0 % (198/200)	97% (33/34)	68% (23/34)	26% (9/34)	99% (165/166)	98% (162/166)	92% (152/166)	58% (97/166)

Табела 5. Резултати оцене тачности система за мерење концентрације глукозе у крви (адаптирано из [97]) – наставак 5

Уређај за мерење концентрације глукозе	ISO 15197		Концентрација глукозе < 4,1625mmol/l			Концентрација глукозе ≥ 4,1625mmol/l			
	Испуњени захтеви	Процент	±0.8325 mmol/l	±0.555 mmol/l	±0.2775 mmol/l	±20%	±15%	±10%	±5%
SmartLAB sprint	да	96.0 % (192/200)	89% (34/38)	55% (21/38)	13% (5/38)	98% (158/162)	96% (155/162)	89% (144/162)	58% (94/162)
Stada Glucocheck	не	88.0 % (176/200)	71% (27/38)	58% (22/38)	24% (9/38)	92% (149/162)	82% (133/162)	66% (107/162)	43% (69/162)
Wellion Linus	да	95.0 % (190/200)	79% (30/38)	50% (19/38)	8% (3/38)	99% (160/162)	93% (151/162)	80% (130/162)	49% (80/162)

*Вредности у процентима су (број тачних мерења / број укупних мерења)

3. Уочавање проблема и циљеви истраживања

3.1. Методе за неинвазивно мерење гликемије – нерешена питања

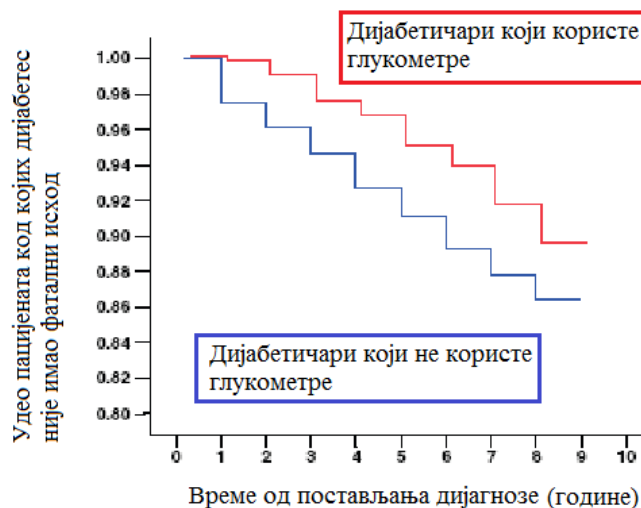
Уређаји за мерење нивоа глукозе у крви који се и данас сматрају најпрецизнијим и најпоузданијим спадају у класу уређаја који су инвазивни, засновани су на биохемијском принципу и користе тест трачице и узорак крви из прста који се вади ланцетом. Постоји више компанија и бар 20 различитих верзија сличних уређаја (Поглавље 2 – Преглед и анализа постојећег стања предмета изучавања).

Инвазивни уређаји налазе се у веома широкој употреби и представљају доминантну форму глукометара за самоконтролу гликемије пацијената. Основна нежељена карактеристика ових глукометара је неопходност узимања узорка капиларне крви из прста. Узимање крви из прста по више пута дневно је многим пацијентима веома непожељно, услед доживљаја бола и страха од игала. Као последица, често се дешава да пацијент избегава контролу гликемије и запоставља коришћење уређаја, па чак и потпуно прекида са употребом уређаја (слика 22).

Блиска инфрацрвена спектроскопија је највише истраживана од свих неинвазивних технологија [31, 37]. Прецизност ове технологије међутим, за сада није постигнута услед различитих непредвидљивих утицаја на варијације спектра које нису повезане са глукозом, а дешавају се услед промена у протоку крви, температуре, расејања светлости, преклапања са спектрима других метаболита који загушују сигнал глукозе, и нарочито се као проблем истиче јака апсорпција воде у овом региону.

Друга неинвазивна технологија која се највише истражује је заснована на промени расејања светлости ткива. Индекс рефракције плазме и интерстицијске течности, како се концентрација глукозе повећава, мења коефицијент расејања за приближно 1% на сваких 5 mmol/l [98]. Полариметријске методе такође имају своје недостатке. При

физиолошким концентрацијама глукозе и оптичким путевима од чак 1cm, оптичка ротација услед глукозе је реда величине 5 хиљдитих делова степена, при чему полариметријске методе искључују кожу као место мерења јер је ткиво коже медијум који изразито неправилно расејава светлост због чега се неинвазивна мерења одликују великим коришћењем ових метода одликују великим шумом у сигналу [99].



Слика 22. Дугорочни исходи коришћења глукометара за самоконтролу код дијабетеса типа 2 [100]

Код полариметријских метода, проблеми настају и услед промене телесне температуре, хидратације ткива, као и неопходности постизања прецизне позиције уређаја који обезбеђује извор светлости. Такође, постоји и проблем недовољне специфичности метода, јер у ткивима постоје и други молекули као што су албумин или аскорбинска киселина, који су такође оптички активни и могу да поларизују светлост [101].

3.2. Избор места мерења

Оптичка и неинвазивна дијагностика било ког анализата у људском организму веома зависе од састава и морфологије ткива на мерном месту. Присуство глукозе у крви мења веома комплексна својства скоро свих делова организма. За оптичка мерења, прва препрека проласку светлости је кожа, која такође има гликемијску информацију захваљујући снабдевању крвљу преко микроциркулације у кожи.

Место мерења је један од кључних фактора за неинвазивно мерење концентрације глукозе. За места на којем је најбоље мерити концентрацију глукозе предложени су кажипрст, унутрашња страна доње усне, подлактица и танка кожица између палца и кажипрста за мерења употребом блиске инфрацрвене спектропије; око и очне структуре су обично изабрана као најбоља места мерења глукозе методом Раманове спектроскопије и различитим методама које су засноване на расејању светлости или поларизацији [102]. Без обзира на оптичку технику мерења, хемијска и физичка својства места мерења имају врло велики утицај и чак могу бити пресудни у добијеном односу између сигнала глукозе и шума приликом мерења.

Дебљина ткива на месту мерења је од критичног значаја за резултат мерења, без обзира на спектрални опсег. Ткиво мора бити довољне дебљине да би садржало глукозу, али ипак довољно танко да би обезбедило довољну спектралну снагу.

Према резултатима детаљних испитивања различитих места на људском телу коришћењем инфрацрвене спектропије, показало се да то идеално место треба да поседује следећа својства: минимална количина телесних масноћа, претежно водена средина оптичког пута дужине од 5 – 10mm, и изразито добар проток зрачења.

Табела 6. Избор различитих места мерења концентрације глукозе у људском организму



У студији евалуације погодних места за мерење глукозе [102], испитивана су следећа места: језик, образ, горња усна, доња усна и танка кожа на превоју између палца и кажипрста. Како је закључено на основу добијених резултата, ткиво на језику садржи најмањи проценат масноће и тиме омогућује минималан шум у добијеним инфрацрвеним спектрима на регионима који садрже спектралну информацију о глукози. Са друге стране, најлошије место за мерење испоставило се да је танани кожни превој између палца и кажипрста, услед највећег процента масноћа. Остала испитивана места по квалитету добијеног сигнала иду следећим редослед: после језика образ, затим горња усна, доња усна и на крају наравно, кожа између прста и кажипрста. Треба напоменути да ови резултати важе за први овертон блиског инфрацрвеног региона (1,52 – 1,85 μm) [102].

У полариметријским методама и другим методама које користе феномен расејања светлости, као место мерења искључиво се бира део тела који омогућује мали коефицијент расејања као што је рожњача, при чему је основни недостатак ових метода што постоји време кашњења (20-30мин износи кашњење за промену глукозе у сузама у односу на промену у крви [3]) промене концентрације глукозе у очној водици у односу на њену концентрацију у крви.

При томе су још и ротација рожњаче, промена индекса преламања рожњаче и покрети ока потенцијални извори мерних грешака [103].

3.3. Мотивација и циљеви истраживања

Успешно решења проблема дијабетеса захтева као неопходно да се у сваком тренутку може познавати ниво глукозе у крви, ради правовремене реакције у виду примене оралних антидијабетика, инсулинских инјекција или изменама у исхрани. Без адекватне информације о нивоу глукозе, коректан и оптималан третман није могућ без озбиљних компликација које могу да погоде унутрашње органе, циркулацију и очни апарат.

Тренутно најзаступљеније методе за мерење концентрације глукозе у крви су инвазивне, у смислу да захтевају узорак капиларне крви из прста. Коришћење ланцете и игала за вађење крви из прста више пута у току дана већина дијабетичара налази да им представља нелагодност и тешкоћу и због тога најчешће не користе глукометре довољно редовно. Насупрот њима, и поред великог улагања напора у развој неинвазивних глукометара, тренутно не постоји ниједан такав уређај у широкој употреби.

Циљ истраживања у овој дисертацији је проналажење нових начина за неинвазивну детекцију и одређивање концентрације глукозе. Као што је већ поменуто, највише истраживане методе су блиска инфрацрвена спектроскопија и методе засноване на расејању и оптичкој ротацији светлости што је и почетна тачка у овим истраживањима.

Примењене новине у анализи спектра из блиског инфрецрвеног дела, које ће бити представљене у овом раду састоје се у другачијем начину анализе спектра водених раствора, где се вода не третира као што је то обично случај као „непријатељ“ који заглашује сигнал од интереса, у овом случају глукозе, већ се преко промена у молекуларној мрежи воде прати како различита концентрација глукозе утиче на организацију воде. Овај принцип, лежи у основи Аквафотомике, нове методе за анализу интеракције воде и блиске инфрацрвене светлости [104], која ће се применити за анализу водених раствора глукозе.

Друга новина, односи се на примену метода поларизације светлости. Примена ново развијене методе Опто-магнетне имиџинг спектроскопије која се заснива на поларизацији рефлектоване светлости [105] и у овом случају испитује се у сврху неинвазивног мерења концентрације глукозе преко коже. Примарна разлика ове методе састоји се у обрнутом принципу, уместо да се поларизована светлост усмерава на ткиво и мери степен промене или деполаризације светлости, у овој методи је светлост коју обезбеђује извор, бела дифузна светлост, али се усмерава под специфичним углом, тако да светлост која се рефлектује од површине узорка у овом случају епидерма или дерма коже, бива поларизована. Друга важна разлика у примењеној полариметријској методи је управо промена места мерења. Полариметријске методе су у свим истраживањима

искључиво усмерене на око и очну водицу као места мерења. У овом раду, за место мерења изабрана је кожа на подлактици, непосредно изнад ручног зглоба која је релативно танка и богата крвним судовима. Опто-магнетна имицинг спектроскопија је до сада успешно примењена за биофизичку карактеризацију коже (фототип коже, влажност коже, проводљивост и др.)[106].

Оптичке методе имају богат потенцијал за развој неинвазивних уређаја, јер је основни алат код ових метода светлост и интеракција светлости са материјом. Са друге стране, кожа као највећи орган на људском телу нуди велику могућност избора места постављања уређаја, што може кориснику обезбедити осећај савршене константне контроле нивоа глукозе које уопште не мора бити свестан. Ниво иритације или оштећења коже ношењем оваквог уређаја зависе само од материјала и начина постављања уређаја, који се пак може тако дизајнирати да се његово место на телу мења и тиме чак спречи било каква реакција коже на уређај.

3.4. Циљеви истраживања

Сходно претходном излагању могу се дефинисати главни циљеви истраживања ове докторске дисертације:

- (1) Примена неинвазивних, оптичких метода: UV/VIS/IR, FTIR спектроскопије у истраживању оптичких карактеристика водених раствора глукозе у циљу утврђивања спектралних подручја у којима долази до промене спектра воденог раствора глукозе у зависности од промене концентрације глукозе у распону 5-20 mmol/l
- (2) Примена неинвазивне, оптичке методе - Опто-магнетне имицинг спектроскопије (OMIS) у истраживању оптичких карактеристика водених раствора глукозе концентрације у опсегу 5-20 mmol/l, и то за Брустеров угао за воду - 53° и Брустеров угао за глукозу - 60°

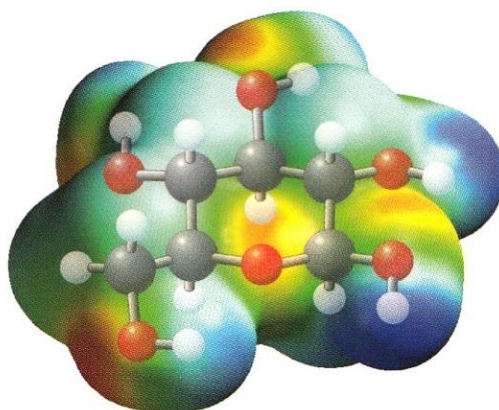
- (3) Евалуација неинвазивних, спектроскопских метода FTIR и OMIS спектроскопије у *in vivo* условима, транскутано (преко коже) – на испитаницима код којих се концентрација глукозе у крви мења у распону од 4 - 20 mmol/l
- (4) Иницијално истраживање методе Хиперспектралног имиџинга (HSI) за неинвазивно, транскутано одређивање концентрације глукозе у крви једног испитаника
- (5) Утврђивање најповољнијег спектралног домена за мерење концентрације глукозе у крви применом метода FTIR и OMIS спектроскопије
- (6) Примена савремених метода анализе спектралних података Парцијалне линеарне регресије методом најмањих квадрата (PLSR), Дводимензионалне корелационе спектроскопије (2DcoS), неуронских мрежа и других за утврђивање концентрације глукозе на основу спектра познатих и непознатих испитаника
- (7) Развој алгоритама за обраду података у програмском пакету Matlab
- (8) Истраживање и развој прототипа уређаја за мерења концентрације глукозе у крви помоћу методе Опто-магнетне имиџинг спектроскопије и примена савремених метода анализе спектралних података Парцијалне линеарне регресије методом најмањих квадрата (PLSR) за утврђивање концентрације глукозе једног познатог и једног непознатог испитаника коришћењем статистичког модела формираног на основу базе података опто-магнетних спектра

4. Материјал

4.1. Глукоза

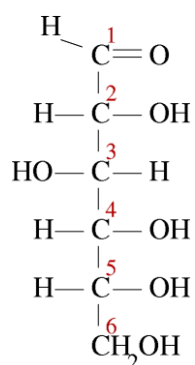
4.1.1. Физичка и хемијска својства

Глукоза спада у групу моносахарида (простих шећера), и једна је од најважнијих угљених хидрата тј. органских једињења који се састоји од угљеника, водоника и кисеоника. Хемијска формула глукозе је $C_6H_{12}O_6$, и класификује се као алдоза – моносахарид који има једну алдехидну групу ($-CH=O$) по молекулу, односно и као хексоза тј. моносахарид са 6 угљеникових атома. Будући да глукоза има алдехидну групу на првом угљениковом атому у ланцу, она спада у алдохексозе.



Слика 23. 3D модел молекула глукозе

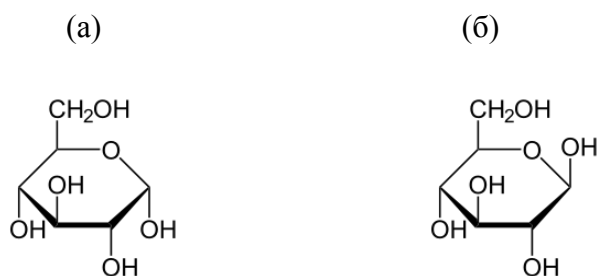
Постоје два изомера (једињења са истом хемијском, али различитом структурном формулом) шећера алдохексозе који се називају глукоза и имају хемијску формулу $C_6H_{12}O_6$. Само један од ова два изомера је биолошки активан, тј. могу га користити живи организми и то је D – глукоза. Овај облик глукозе се још назива и декстроза.



Слика 24. D – глукоза (декстроза) – ланчана структура. Алдехидна група је на првом угљениковом атому. Глукоза је хексоза тј. има 6 угљеникових атома.

Назив декстроза потиче од латинске речи *dextro-* што значи десни, и изведено је на основу оптичких својстава овог стереоизомера глукозе. Глукоза је хирални молекул, што значи да нема унутрашњу симетрију и не може се поклопити са својим ликом у огледалу. D – глукоза је хирални молекул који је оптички активан и може да ротира раван поларизоване светлости у смеру казаљке на сату посматрано из правца доласка светлости. За D – глукозу се каже да је десно ротирајућа. Њен стереоизомер – L – глукоза, има структурну формулу као лик у огледалу и она је лево ротирајућа. Овај облик глукозе се не може наћи у природи, а људски организам не може да га користи.

У растворима, само врло мали део глукозе има структуру ланца, око 0.02%, а највећи део глукозе има структуру прстена [107], и то различитих цикличних изомера – пираноза и фураноза, при чему фуранозе постоје у занемарљивој количини, пиранозе чине скоро 99%.



Слика 25. (а) α – D – глукопираноза, (б) β – D – глукопираноза

Прстенаста структура настаје од отвореног ланца глукозе, реакцијом нуклеофиличне адиције између алдехидне групе на C-1 атому и хидроксилне групе –ОН на C-4 или C-5 атому, чиме се прави хемиацетилна група –C(OH)H-O-. На тај начин се формира молекул са 6 чланова у прстену, који се назива пираноза. Врло ретко, у реакцији између C-1 и C-4 угљениковог атома добија се молекул са прстеном од 5 чланова, који се назива фураноза.

У пиранози угљеников C-1 атом, се назива аномером и он представља центар хемиацетилне функционалне групе. Позиција –ОН групе на аномерном угљениковом атому је важна и разликује се: α – позиција је одређена када се –ОН група налази на супротној страни прстена од C6, док је β - позиција ако се –ОН група налази на истој страни као и C6 (слика 25).

Ове прстенасте структуре нису планарне и могу заузимати неколико просторних конформација. Глукопираноза представља доминантну форму глукозе у растворима, и једину форму глукозе у чврстом стању. У чврстом стању, глукоза представља кристалну, безбојну супстанцу, високо растворљиву у води са максималном растворљивошћу од 91 g/100 mL.

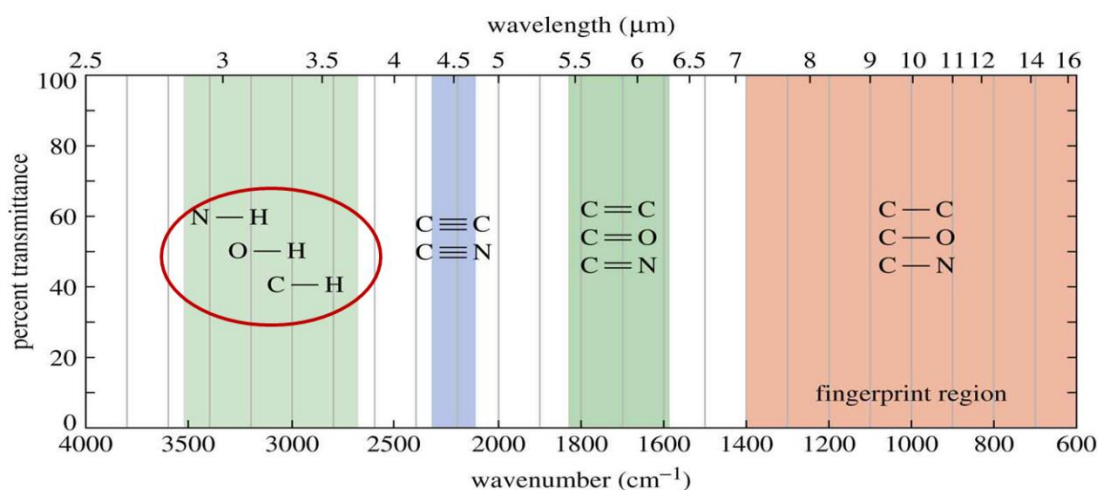
Глукоза има моларну масу 180.16 g/mol, густине је 1.54 g/cm³, температура топљења за α – D – глукозу износи 146°C, а за β – D – глукозу износи 150°C. При високим температурама разлаже се на угљеник и воду.

4.1.2. Оптичка својства глукозе

Фундаменталне вибрационе фреквенције већине органских и неорганских једињења налазе се у средњој инфрацрвеној области електромагнетног спектра, док је апсорпција у блиској инфрацрвеној области заснована на овертоновима (вишим хармоницима) и комбинационим тракама. Функционалне групе за које су фундаменталне вибрације више од 2000cm⁻¹, су функционалне групе које имају водоник, као што су C – H, O – H, и N – H. Апсорпција у блиском инфрацрвеном региону, односи се на овертонове и

комбинационе траке примарно C – H, O – H, и N – H група чије фундаменталне молекуларне вибрације леже у средњој инфрацрвеној области (слика 26).

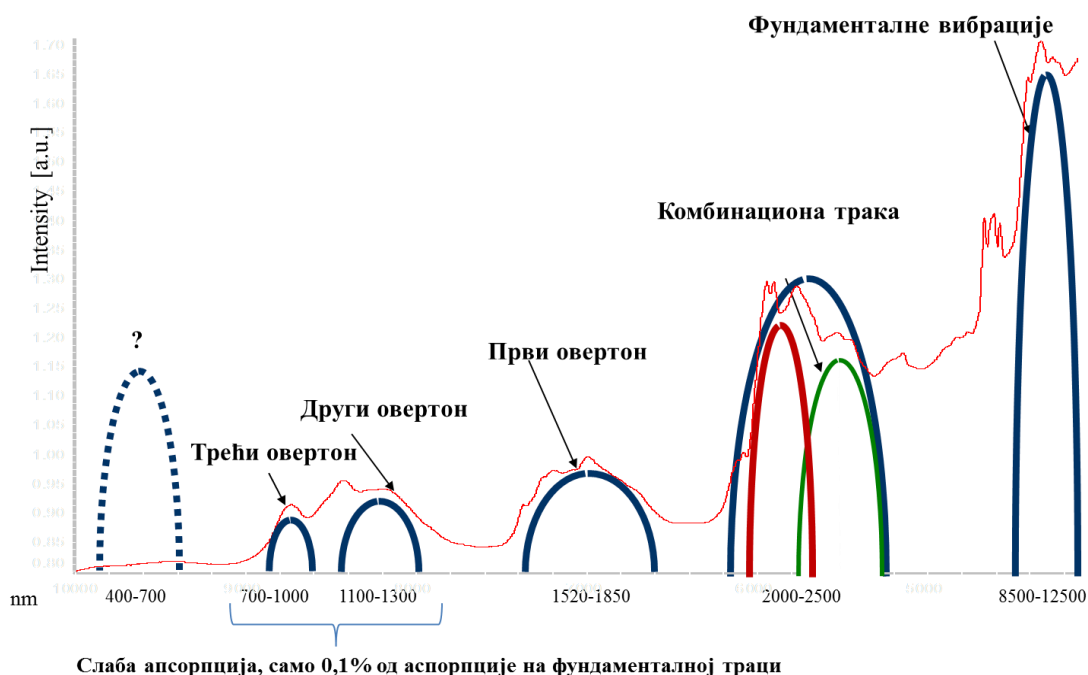
У структурној формули глукозе има неколико хидроксилних и метил група и оне су функционалне групе чија се апсорпција дешава у NIR области.



Слика 26. Преглед функционалних група које апсорбују у NIR региону. У овој области, апсорпционе траке глукозе су везане за вибрације функционалних група C–H, O–H, и N–H

Глукоза има фундаментални апсорпциони мод у средњој инфрацрвеној области (МИР) око 9.6μm. Друге апсорпционе траке укључују комбинациону траку између 2,0 и 2,5 μm и први овертон (хармоник) између приближно 1.52 и 1.85 μm. У региону од 700 до 1300nm налазе се овертонови вишег реда (слика 27). Ови овертонови, други и трећи, показују веома слабу апсорпцију глукозе, мању од 0.1% у поређењу са фундаменталном апсорпционом траком. Други овертон глукозе налази се у спектралном региону између 1100nm и 1300 nm, а први овертон између 1500 nm и 1800 nm.[3]

У NIR области најјаче апсорпционе траке глукозе одговарају вибрацијама истезања O – H везе на 3550cm⁻¹ (2817nm), затим вибрацијама истезања C – H везе на 2961 cm⁻¹ и 2947 cm⁻¹ (3377nm и 3393 nm). Могуће комбинационе траке су друга O – H овертон трака на 939 nm (3νOH) и друга C-H овертон трака на 1126 nm (3νCH).



Слика 27. Упрости́ени приказ апсорпционог спектра глукозе: положаји фундаменталног тона глукозе, виших тонова и комбинационих трака (на основу података из литературе [3])

Прва овертон О-Н трака може бити приписана таласној дужини на 1408nm ($2\nu_{OH}$). Трака на 1536nm одговара О – Н и С – Н комбинационој траци ($\nu_{OH} + \nu_{CH}$). Трака на 1688 nm је утврђено да одговара С – Н овертону ($2\nu_{CH}$). Друге траке на таласним дужинама већим од 2000nm су вероватно комбинације С – Н вибрација истезања и ν_{CH} , ν_{OH} деформација на 2261 и 2326 nm ($\nu_{CH} + \nu_{CCH}$, ν_{OH}) [3].

У инфрацрвеној области Рамановог спектра глукоза има траке на 420, 515, 830, 880, 1040, 1100, 1367, и 1460cm^{-1} .

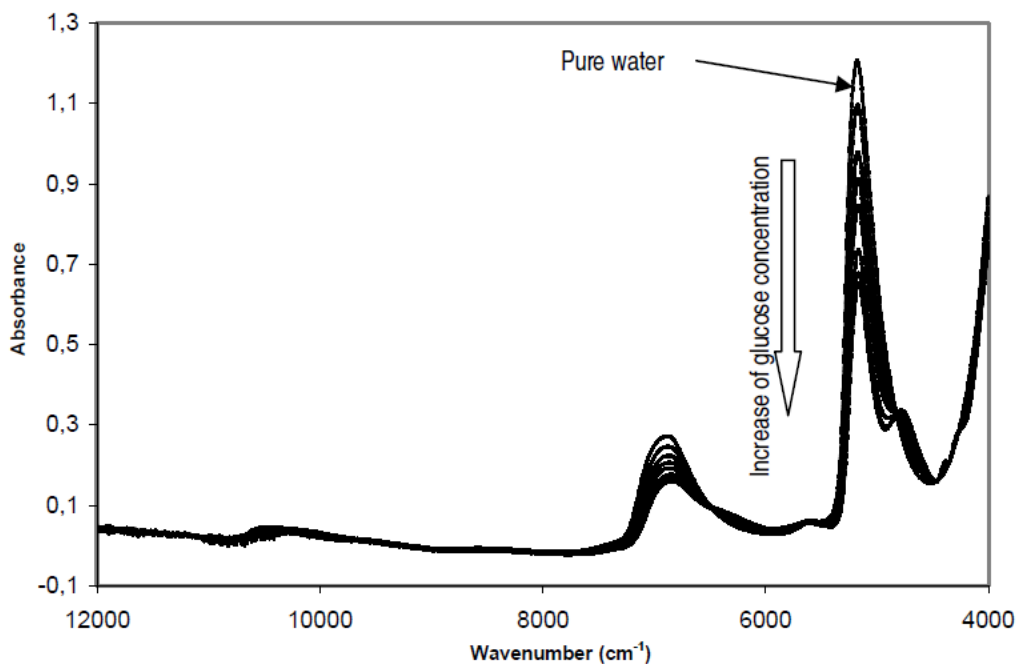
4.1.3. Глукоза у воденим растворима

У области истраживања интеракције воде и глукозе доминира примена NIR спектроскопије. У NIR делу спектра доминирају вибрације које потичу од ОН групе.

Ове молекуларне вибрације воде се могу поделити на три главна типа: симетрично и асиметрично истезање – 2 типа валенционих вибрација и 1 тип деформационих вибрација – вибрација савијања [108].

NIR спектар воде је окарактерисан са 4 основна максимална пика који се јављају на $\lambda_1 = 970 \text{ nm}$ ($\nu_3 = 10309 \text{ cm}^{-1}$), $\lambda_2 = 1190 \text{ nm}$ ($\nu_3 = 8403 \text{ cm}^{-1}$), $\lambda_3 = 1450 \text{ nm}$, ($\nu_3 = 6898 \text{ cm}^{-1}$) и $\lambda_4 = 1940 \text{ nm}$ ($\nu_3 = 5154 \text{ cm}^{-1}$).

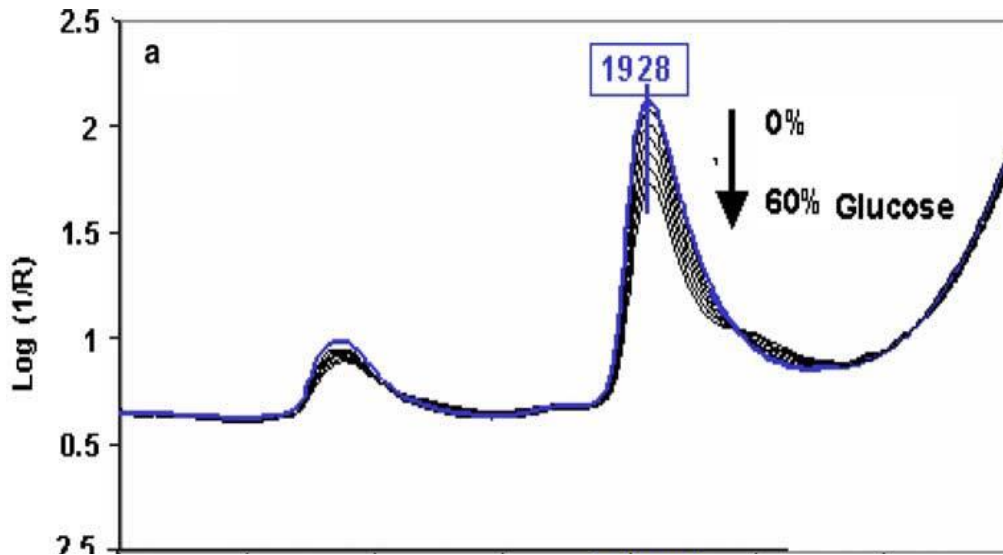
NIR спектар водених раствора глукозе (слика 28) је окарактерисан појавом пикова за глукозу на следећим таласним дужинама: 1587 nm ($\nu \approx 6301 \text{ cm}^{-1}$), 2121 nm ($\nu \approx 4715 \text{ cm}^{-1}$), 2271 nm ($\nu \approx 4403 \text{ cm}^{-1}$) из чега се може закључити да анализа водених раствора глукозе може бити најефективнија за регион од $1800\text{-}2200\text{nm}$, где глукоза снажно апсорбује [108] и у којем се могу проучавати промене које настају у структури воде под утицајем пертурбација које уноси глукоза.



Слика 28. Спектар чисте воде и водених раствора глукозе растуће концентрације [108]

Овај регион је такође проучаван и у студији Ђианкома и сарадника [109] који су проучвали утицај глукозе на промене у воденој мрежи. У поменутој студији откривено

је да са порастом удела глукозе у воденом раствору овај пик постаје симетричнији, али долази до његовог помеаја и симултаног пада апсорбансе ка већим таласним дужинама. Закључак ове студије је да су спектралне промене у води узроковане присуством глукозе, аналогне оним до којих долази приликом пада температуре воде [109].



Слика 29. NIR спектар раствора воде и глукозе различитих концентрација (од 0-60%). У спектру воде максимум на 1928nm одговара апсорпцији воде, док пик у региону од 1800-2100nm одговара комбинационој траци [109]

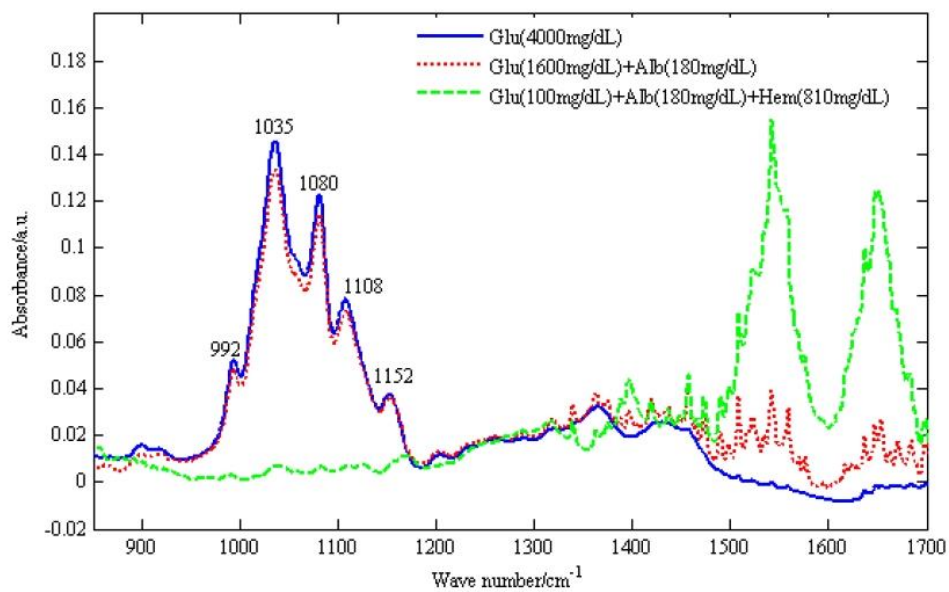
Комбинациона трака како се може видети са слике 29 састоји се заправо од два пика. Однос ова два пика показује да при повећаним концентрацијама глукозе долази до пораста оне компоненте воде која апсорбује на већим таласним дужинама – тј. то су молекули воде који граде једну водоничну везу. Према овој студији, уочено је да глукоза показује тенденцију да се радије инсертује у већ постојеће кластере воде уместо да се везује за слободне молекуле. Растварање глукозе у води доводи до прекидања једног броја водоничних веза у воденим кластерима и стварања нове генерације водоничних веза између глукозе и воде. Са повећањем концентрације глукозе долази до спектралних модификација сличним оним који настају услед промене температуре. Глукоза тако има ефекат разарања структура слично температури, што значи да доводи до разарања постојећих кластера у води, на тај начин што повећава растојање између молекула воде и повећава број слободних молекула

воде. Финални резултат је какогод, повећање броја водоничних веза, што одговара повећању апсорпције.

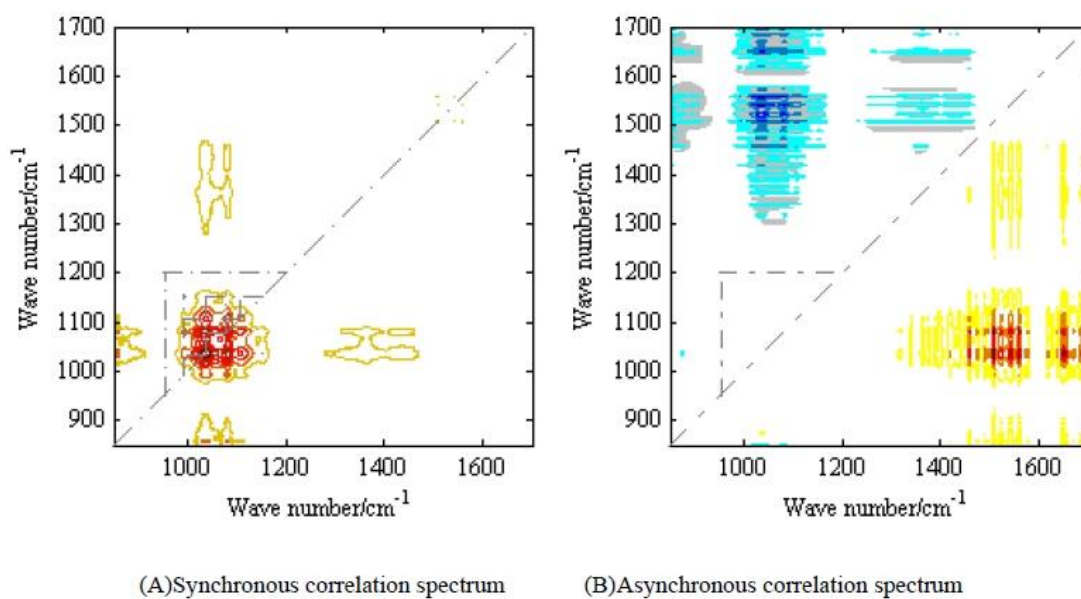
Овај резултат настаје као последица тога што слободни молекули воде бивају притиснути једни уз друге и бивају принуђени да се везују што доводи до повећања стабилности и повећање апсорпције у односу на чисту воду.

Може се закључити да се глукоза у мањим концентрацијам понаша као разграђивач структура постојећих у води, међутим у већим концентрацијама стимулише стварање водених кластера [110].

Испитивања глукозе у средњем инфрацрвеном региону [111] вршена су за двокомпоненти раствор – вода и глукоза у концентрацијама глукозе која одговара вредностима 100-4000мг/дл. За водене растворе глукозе уочено је да је карактеристичан апсорпциони пик лоциран у региону од 900-1200 cm^{-1} , где се јављају 5 карактеристичних апсорпционих пикова: на 992 cm^{-1} , 1035 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} , 1108 cm^{-1} , и 1152 cm^{-1} (слика 30). Даља истраживања водених раствора рађена су само за опсег физиолошких вредности 100-500мг/дл применом 2Д спектроскопске корелационе анализе. На слици 31 приказане су корелационе контурне мапе за водене растворе глукозе.



Слика 30. Средњи инфрацрвени спектар дво, тро и четворо-компонентих раствора [111]. Водени раствор глукозе дат је спектром плаве боје.



Слика 31. Синхрона и асинхрона корелациона мапа водених раствора глукозе у опсегу хуманих физиолошких вредности [111]

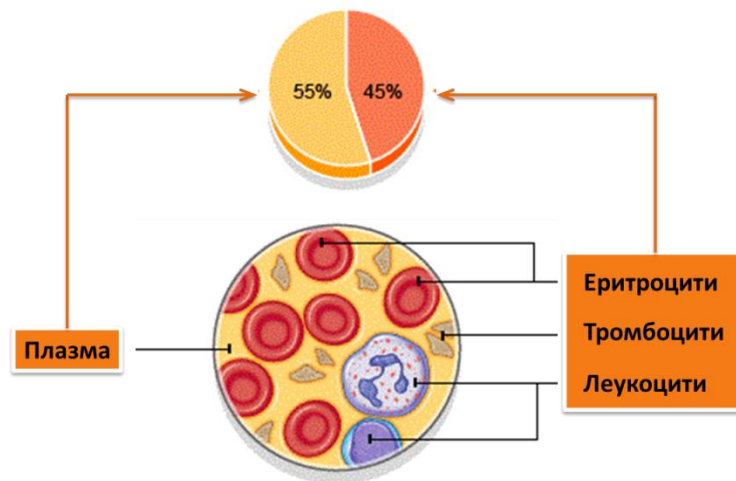
На синхронном спектру (слика 31 А) аутопикови се јављају на 992cm^{-1} , 1035cm^{-1} , 1080cm^{-1} , 1108cm^{-1} , и 1152cm^{-1} . На аутопику на 1152cm^{-1} , се може приметити како контурни слојеви расту што значи да се интензитет апсорбансе на уоченим таласним бројевима мења у зависности од пертурбације, односно промене концентрације глукозе. У исто време, позитивни крос-пикови настају између свака два сигнала на уочених пет таласних бројева, што значи да се интензитети на свих 5 пикова мењају у истом смеру приликом спољне пертурбације, односно промене концентрације глукозе. То значи да свих пет пикова потичу од исте супстанце. На асинхроној мапи (слика 31Б), интензитет апсорпције у опсегу 950cm^{-1} - 1200cm^{-1} , је скоро једнак нули. То значи да промена интензитета пикова на уочених пет таласних бројева прати исти тренд и у истој фази је са променом концентрације глукозе, односно апсорбанса на свих пет пикова расте са порастом глукозе, односно опада са опадањем концентрације.

4.2. Крв и крвни судови

4.2.1. Структура крви и крвних судова

Крв је специјализовано течено ткиво одговорно за имунолошке функције, уклањање отпадних продуката организма, транспорт хормона, регулацију рН у организму, контролу телесне температуре, и снабдевање кисеоником и нутријентима. Крвно ткиво може да се подели на течни део који се назива плазма и део чврстих компоненти (хематоцити) који чине еритроцити задужени за респирацију, леукоцити који обезбеђују имуни одговор и бране организам од инфекција и болести, и тромбоцити чија улога је згрушавање крви на месту оштећења (Слика 32).

Плазма се састоји од 90% воде и чини више од 55% запремине крви. Остатак запремине плазме чине већим делом протеини (8% - фибриноген, албумин, глобулин), док нутријенти (аминокиселине, шећери и масти), хормони и електролити чине само 2%. Највећи део запремине чврстих компоненти крви чине еритроцити чији број и величина су много већи од свих других компоненти (еритроцити око 95%, леукоцити 1% и тромбоцити 4,9%).



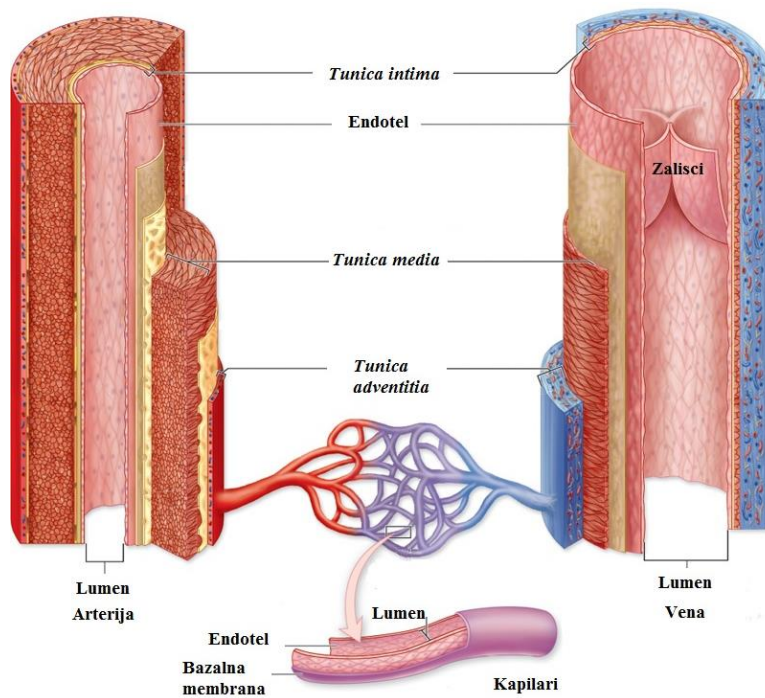
Слика 32. Састав крви

Око 70% од укупне запремине крви чини венска, 20% је артеријска и 5% капиларна крв. За детекцију глукозе важна је разлика између артеријске и венске крви за спектроскопске анализе и ова разлика може бити значајно велика зависно од различитих физиолошких услова [112].

Крв циркулише (кружи) кроз организам кроз систем затворених цеви – крвних судова, који се анатомски и функционално могу поделити на венске и артеријске.

Артерије су крвни судови који полазе из срца и носе артеријску крв, крв богату кисеоником (изузетак је само једна артерија *arteria pulmonalis*, која носи венску крв). Вене су крвни судови који доводе крв у срце и носе венску крв – крв богату угљендиоксидом. Служе као и депо крви. Изузетак су 4 плућне и умбиликална вена које носе крв богату кисеоником.

Дијаметар крвних судова се смањује идући од аорте ка артеријским капиларима (али површина укупног пресека сукцесивно расте), па се затим поново повећава од венских капилара ка горњој и доњој шупљој вени (површина укупног пресека се смањује). Смањење дијаметра прати и смањење дебљина зида крвних судова и обрнуто.



Слика 33. Структура зидова крвних судова – вена и артерија

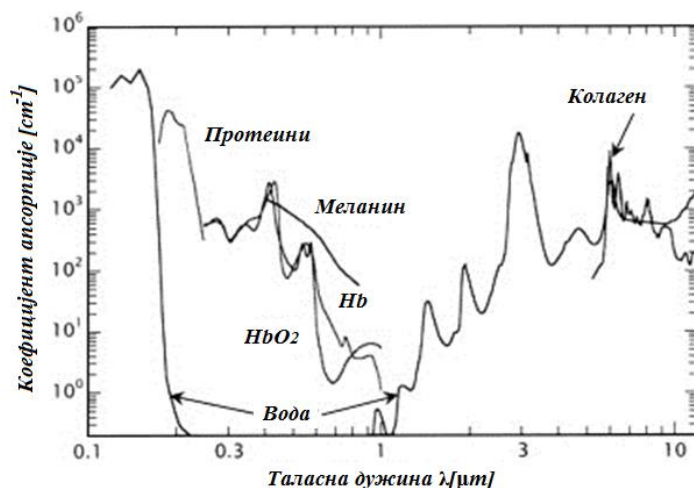
Артерије и вене су крвни судови са трослојним зидовима: *tunica intima* – најдубљи слој који је у додиру са крвљу и састоји се од ендотелијалних ћелија, *tunica media* – слој сачињен од глатких мишића и *tunica adventitia* – слој сачињен од фиброзног ткива (Слика 33). Вене за разлику од артерија имају мање еластичног ткива и глатких мишића, а више везивног ткива у спољашњем слоју; такође оне имају и залиске који омогућују проток крви у једном смеру – ка срцу.

Артериоле су мале артерије које крв достављају у капиларе. Венуле су мали крвни судови који капиларе повезују са венама. Капилари су микроскопски мали крвни судови који повезују артериоле са венулама и имају најближу интеракцију са ткивима. Имају зидове састављене од само једног слоја ћелија – ендотелног слоја. Њихов примарна функција је размена нутријената, кисеоника и ћелијског отпада и угљендиоксида између крви и ткива. Овакву размену им омогућује управо овако танак једнослојни омотач.

4.2.2. Оптичка својства крви и крвних судова

Оптичка својства крви нарочито зависе од концентрације еритроцита, њиховог облика, брзине, агрегације, осмоларности и седиментације. Хемоглобин је протеин који формира ове крвне елементе, и одговоран је за транспорт кисеоника од плућа до свих ткива, као и за транспорт повратних отпадних гасова до плућа одакле се избацују дисањем. Хемоглобин у оксидованом стању познат је као оксихемоглобин (HbO_2) док је де-оксидована форма позната као деоксихемоглобин (Hb). Артеријска крв која код одраслих особа у 98% засићена кисеоником, је јарко црвене крве, док венска крв која је око 75% засићена је тамно црвене до пурпурне боје [113].

Светлост таласних дужина већих од 950nm је снажно апсорбована од стране воде, и у оптичком прозору од 700 nm - 900 nm, доминантан апсорбер блиске инфрацрвене светлости је хемоглобин (слика 34). У области од 4.6 μm до 5.4 μm долази до атенуације углавном због садржаја воде у крви, док у области од 7 μm до 10 μm , хемоглобин поново има јачу апсорпцију од воде, што доприноси већем тотално коефицијенту атенуације светлости [114].

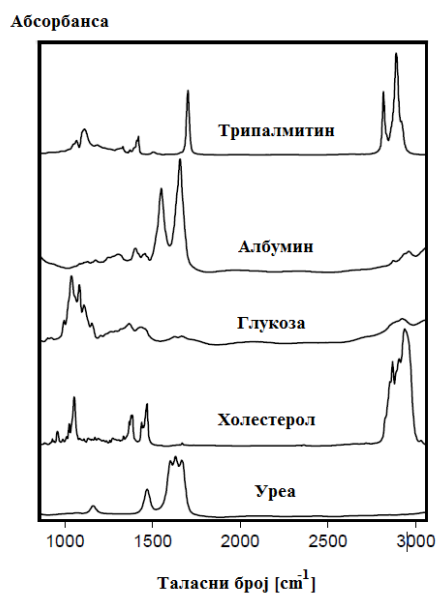


Слика 34. Коефицијенти оптичке апсорпције најважнијих ткивних хромофора у опсегу 0.1 – 12 μm [115]

Глукоза у крви или у серуму, се углавном квантификује коришћењем апсорпционе спектроскопије у средњој инфрацрвеној области (МИР) или у блиској инфрацрвеној

области (NIR), и то на таласним дужинама који одговарају комбинационим вибрационим тракама (2000nm – 2500nm), првом апсорпционом овертону (1400 nm - 1800nm) или тракама другог овертона (950 nm - 1250 nm) [116].

Карактеристичне таласне дужине за глукозу у средњем инфрацрвеном региону су 8.68 μm , 9.017 μm , 9.259 μm , и 9.66 μm [112]. Само пик на 9.66 μm одговара глукозу када се посматра са другим конституентима крви. Карактеристични спектри за глукозу и неке конституенте серума приказани су на слици 35. На пример, пик на 7.36 μm се појављује и за албумин, хемоглобин и друге састојке крви. Пик на 9.259 μm се појављује за албумин и хемоглобин, а на 9.017 μm се појављује за хемоглобин. Уколико се користи интерстицијска течност за детекцију глукозе, тада је елиминисан утицај хемоглобина, па се за квантификацију глукозе може користити пик на 9.017 μm . Проблем у квантификације глукозе преко спектра може настати и када појава великих широких пикова маскира неки карактеристични пик за глукозу. На пример, уреа показује снажан пик на 8.620 μm који маскира карактеристичан пик за глукозу на 8.680 μm [112].



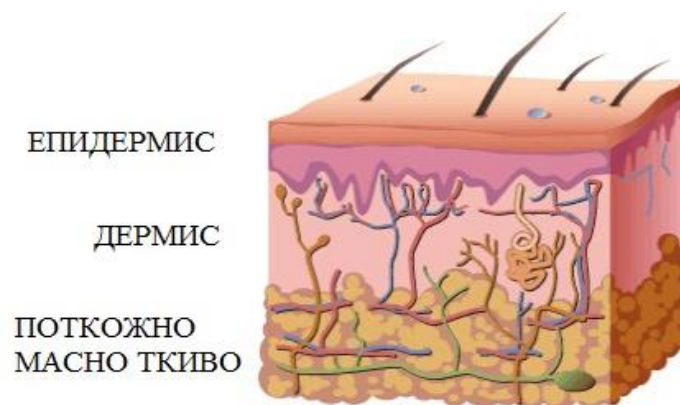
Слика 35. МИР апсорпциони спектар за неке конституенте серума [116]

4.3. Кожа

4.3.1. Структура коже

Кожа представља баријеру организма која га штити од превеликог губитка воде, уласка потенцијално опасних супстанци и оштећења ћелија услед УВ зрачења.

Епителијално ткиво се састоји од епидермиса, дермиса и субкутаних (поткожних) слојева, који су углавном састављени од масног ткива и не пружају информацију о крви.

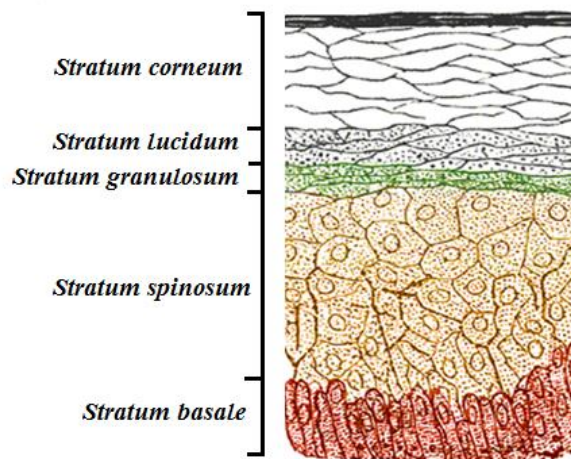


Слика 36. Структура коже са основним слојевима [117]

На слици 36, приказани су основни слојеви коже. Дебљина епидермиса зависи од места на телу, на пример на очним капцима износи $50\mu\text{m}$, $176\mu\text{m}$ на врховима прстију и чак је 1 mm на длановима и стопалима [118]. Епидермис се може поделити на следеће слојеве (слика 37): *stratum corneum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum*, и *stratum basale*. Епителне ћелије из првог површинског слоја *stratum corneum*, се константно одбацују с коже и формирају прилично липидни слој дебљине приближно $10\text{-}20\mu\text{m}$. Својства овог слоја представљају битну препреку за неинвазивно транскутано мерење глукозе на неинвазиван начин [119]. Остали слојеви епидермиса сачињени су или од кератиноцита и меланоцита, пигментних ћелија које примарно дефинишу боју коже.

Овај слој нема васкуларизацију и нутријенте добија дифузијом из дермиса што има утицаја на мерење глукозе преко коже [120].

Дебљина дермиса варира од 0.3mm на очним капцима до 3mm на длановима и стопалима. Скоро половина дермиса је састављена од колагена и еластичних влакана, док интерстицијска течност чини око 45%, остали део запремине дермиса чине крвни судови, нерви, фоликуле длака и знојне жлезде. Горњи део дермиса је папиларни дермис и садржи мрежу крвних судова и сензорне нервне завршетке. Ретикуларни дермис, који представља дубљи слоја, садржи слабо везане структуре епителијалног порекла као што су жлезде и фоликуле [120]. Управо из овог слоја се узима узорак капиларне крви приликом коришћења инвазивних уређаја за мерење концентрације глукозе. Крвни судови у дермису, мењају пречник у зависности од оптерећења, температуре, старости као и болести [121].



Слика 37. Структура епидермиса [122]

4.3.2. Оптичка својства коже

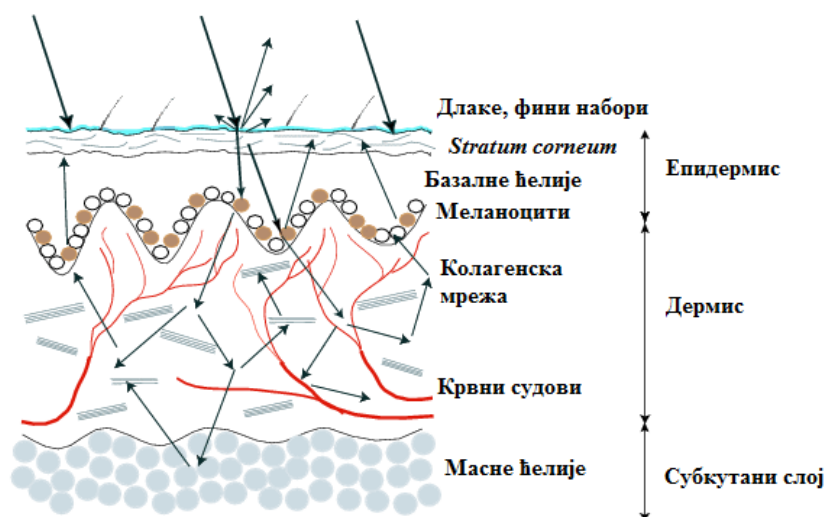
Епидермис представља слој који апсорбује светлост; у њему су присутни меланин и други специфични пигменти који омогућују заштиту од УВ зрачења. Светлост таласне дужине која одговара блиској инфрацрвеној области, пролази кроз *stratum corneum* и епидермис – трансмитанса је између 90 и 95%, независно од пигментације коже.

У дермису је расејање светлости од велике важности и примарно је одговорно за апсорпцију на таласним дужинама мањим од 600nm [121]. Изнад овог прага долази до општог смањења апсорпције хемоглобина и пигмената коже које дозвољава значајну пенетрацију светлости у видљивој црвеној области и блиској инфрацрвеној.

Оптичка својства коже, будући да је она делом прокрвљен орган, одређују не само структурне компоненте коже, већ и компоненте крви и крвних судова (Слика 38).

Светлост таласне дужине 1150nm, најбоље пенетрира кроз кожу, од тога четвртина улазног зрачења пролази кроз цео дермис.

Након тога, апсорпција воде постаје значајна, и зато се опсег од 600 – 1300 nm, назива „оптички прозор“ за кожу [103]. Између 1520 и 1850 nm, доминира расејање светлости, а апсорпција од стране воде и масноћа је значајна (Слика 34). Између 2000 nm и 2500 nm, доминира апсорпција, где су вода, масти, и протеини примарни абсорбанти [121]. Хемијске, структурне и физиолошке варијације као што су температура коже, стање хидратације, стање локалног крвотока утичу на промену оптичких својстава коже и на дубину пенетрације светлости у ткиво, на пример, дубина продирања светлости у ткиво се повећава ако је температура нижа [123].



Слика 38. Оптичка својства коже зависе не само од структурних компоненти коже, већ и крвних судова и крви

Апсорпција зрачења у видљивој области (400 nm -700nm) је највећим делом од стране меланина и хемоглобина у ткиву. Хемоглобин у обе своје форме, као оксидован и деоксидован апсорбује и у УВ делу спектра, али апсорпција постаје значајна у поређењу са другим хромофорама ткива тек у видљивој области. Оксихемоглобин и деоксихемоглобин имају изражене пикове на 414 nm и 433 nm, респективно (слика 34). Затим њихова апсорпција опада за чак неколико редова величине у љубичастој и плавој, па поново се повећава у зеленој области где оксихемоглобин (HbO_2) има апсорпционе пикове на 542 nm и 576 nm, а деоксихемоглобин (Hb) има апсорпциони пик на 556 nm. Апсорпција ових хромофора затим поново пада за неколико редова величине у области жуте и црвене боје. Иако не апсорбује јако црвену и инфрацрвену светлост, апсорпција од стране хемоглобина значајно доприноси апсорпцији васкуларизованих ткива, па тако и коже, у блиској инфрацрвеној области [115, 124].

У пигментираним ткивима, као што су кожа и коса, меланин има значајну улогу у детерминисању оптичких апсорпционих својстава. Апсорпциони спектар меланина нема изражене спектралне карактеристике у видљивом делу спектра, његов спектар монотонно опада са таласном дужином и на таласној дужини од 780 nm је само 10% од оне вредности коју има на 400 nm [125, 126].

У блиској инфрацрвеној области, осим хемоглобина који значајно доприноси оптичкој апсорпцији васкуларизоване коже на таласној дужини од 1000 nm, вода и протеини су основне хромофоре које доминирају као апсорбери. Вода је најважнија хромофора у инфрацрвеној области и значајно доприноси апсорпцији ткива за таласне дужине веће од 900 nm.

Апсорпциони спектар воде је одређен резонансом симетричних и асиметричних вибрационих модова којима су приписане следеће таласне дужине: $\nu_1=3651.7\text{cm}^{-1}$ ($\lambda=2.74\mu\text{m}$) и $\nu_3=3755.8\text{cm}^{-1}$ ($\lambda=2.66\mu\text{m}$), респективно, и резонансом мода симетричног савијања на $\nu_2=1595\text{cm}^{-1}$ ($\lambda=6.27\mu\text{m}$)[115]. Ови вибрациони модови и њихове комбинације доводе до стварања нових пикова и то лоцираних на $\lambda=0.96, 1.44, 1.95, 2.94, 4.68$ и $6.1\mu\text{m}$ [127]. Апсорпција воде у блиској инфрацрвеној области је иницијално слаба, али се врло брзо појача и достиже максимум на $\lambda=2.94\mu\text{m}$ [128]. И

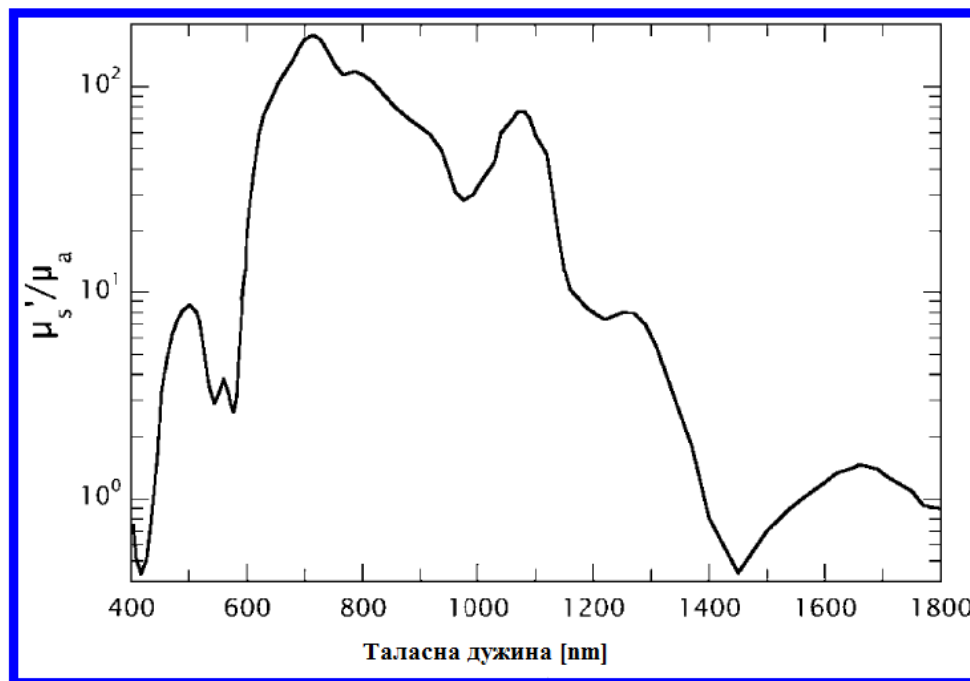
даље у далекој инфрацрвеној области (6 – 15 μm). , вода снажно апсорбује и има још један максимум на $\lambda=6.1\mu\text{m}$ [115].

Друге значајне хромофоре у кожи су протеини. Инфрацрвени спектар протеина се одликује различитим вибрационим модовима пептидне везе ($\text{O}=\text{C}-\text{N}-\text{H}$). Најважније су (1) истезање $\text{C}=\text{O}$ везе (амид I трака) која је за колаген лоцирана на $\nu_1=1640 - 1660\text{cm}^{-1}$ ($\lambda=6.02 - 6.10\mu\text{m}$); (2) $\text{N} - \text{H}$ деформација у равни са истезањем $\text{C} - \text{N}$ везе, (амид II трака) лоцирана на $\nu_2=1535 - 1550\text{cm}^{-1}$ ($\lambda=6.45 - 6.51\mu\text{m}$) за колаген и (3) истезање $\text{C} - \text{N}$ везе са деформацијом у равни $\text{N} - \text{H}$ везе (амид III трака), лоциране на $\nu_3=1230 - 1270\text{cm}^{-1}$ ($\lambda=7.87 - 8.13\mu\text{m}$) за колаген [115]. Колаген и вода деле апсорпциони пик на $\lambda=6.1\mu\text{m}$, где је апсорпција колагена више од два пута већа од апсорпције воде.

За спектроскопска мерења која укључују кожу, осим апсорпције веома је битно и оптичко расејање. Оптичко расејање настаје услед просторних варијација рефрактивног индекса ткива. Ове варијације зависе од структуре, величине, и морфологије ћелијских и ванћелијских компоненти [129-133]. Ефекат који било који извор расејања има на дистрибуцију светлости зависи не само од оптичких својстава ткива, веч и од локације и оријентације других извора расејања. Чак и код система са већом густином извора расејања светлости, до значајно великог расејања долази само када постоји значајна варијација у рефрактивном индексу која је компарабилна или већа од половине таласне дужине упадне светлости [134]. На пример, микроструктуре у људској рожњачи су веома правилне, такве да фибрили колагена имају пречник приближно 30nm, распоређени су правилно тако да је растојање између оса фибрила приближно 65 nm. То значи да је варијација рефрактивног индекса по просторној димензији веома мала у поређењу са таласним дужинама видљиве светлости, иако су индивидуална влакна колагена добри извори расејања. Међутим, када је у питању дермис, чија колагена влакна имају значајну варијабилност пречника (30 nm-300 nm), оријентације и растојања између појединих влакана. Оваква варијабилност структуре доводи до значајних разлика у рефрактивном индексу по просторној димензији, и те разлике су компарабилне са таласним дужинама видљиве светлости, услед чега је дермис оптички непрозиран [115].

Уколико апсорпција светлости доминира над расејањем, може се применити Бер-Ламберов закон (*Beer - Lambert*) за одређивање мере абсорбованог зрачења. Међутим, када је расејање доминантно или бар заступљено у истој мери као апсорпција, то није могуће. На Слици 39, представљен је релативни интензитет апсорпције и расејања коже као функција таласне дужине.

За $\lambda < 450 \text{ nm}$, оптичка активност пептидне везе, резидуа ароматичних аминокиселина, ДНК и хемоглобина чини апсорпцију доминантним обликом оптичке активности коже. За таласне дужине $\lambda = 450\text{-}1750 \text{ nm}$, кожа расејава светлост и зато је расејање доминантно у односу на апсорпцију, иако за таласне дужине $\lambda = 450\text{-}600 \text{ nm}$, меланин и хемоглобин апсорбују у значајној мери, док је слична ситуација и за таласне дужине $\lambda > 1350 \text{ nm}$, расејање је доминантно, али вода апсорбује значајан део светлости. На већим таласним дужинама, апсорпција воде се значајно повећава и за $\lambda < 1750 \text{ nm}$, апсорпција ткива доминира над расејањем [115].



Слика 39. Однос редукованог коефицијента расејања и коефицијента апсорпције људске коже. За таласне дужине мање од 450nm и веће од 1800 nm, апсорпција од стране хемоглобина и протеина у ултраљубичастој, воде у средњој и далекој инфрацрвеној области доминантно одређује оптичка својства коже [115].

4.4. Припрема материјала за испитивања

4.4.1. Вода и раствори глукозе у води

Раствори глукозе у води прављени су на два начина: коришћењем 10% раствора глукозе и коришћењем глукозеу праху. Основне информације о коришћеном материјалу и произвођачу материјала дате су табеларно (Табела 7).

Раствори глукозе припремљени су техником паралелних разблажења, на основу прорачунатих потребних удела масе глукозе и воде, који следе у наставку.

Табела 7. Материјал коришћен у испитивањима

Материјал	Ознака	Паковање	Произвођач
Глукоза у праху	D – (+) – Glucose, C ₆ H ₁₂ O ₆ , ≥ 99.5% (GC)	1кг	Sigma – Aldrich, USA
Раствор глукозе	Glucosi infundibile 5%	500мл	Hemofarm A.D, РСрбија
Ултра чиста вода	Aqua Purificata, Aqua destilatae	15000 мл	Koto derma, РСрбија

Рецептура за добијање по 1dl раствора глукозе концентрација 5mmol/l, 10mmol/l, 15mmol/l, 20mmol/l коришћењем 10% раствора Glucosi Infundibile дата је у Прилогу 2.

4.4.1. Глукоза у праху

Постоји неколико техника за припрему узорак у чврстом стању:

а) Прављење пасте или суспензије – у овој техници се fino измрвљен узорак меша са минералним уљем (нпр. “Nujol” , парафинско уље које је хемијски инертно и има врло једноставан инфрацрвени спектар, или “ Flurolube ” халогени полимер уколико неке траке угљоводоника из спектра Нујола сметају идентификацији узорка) док се не направи густа паста у мермерном или ахатном авану, потом се веома танак филм ове смесе премаже на плочице

б) Прављење раствора – у овој техници се узорак у чврстом стању може растварати у не-воденом раствору, под условом да не реагује са растварачем и да растварач не апсорбује инфрацрвено зрачење. Тада се капљица добијеног раствора поставља на површину плочице од алкалних метала и чека се док растварач не испари остављајући само танак премаз раствореног узорка.



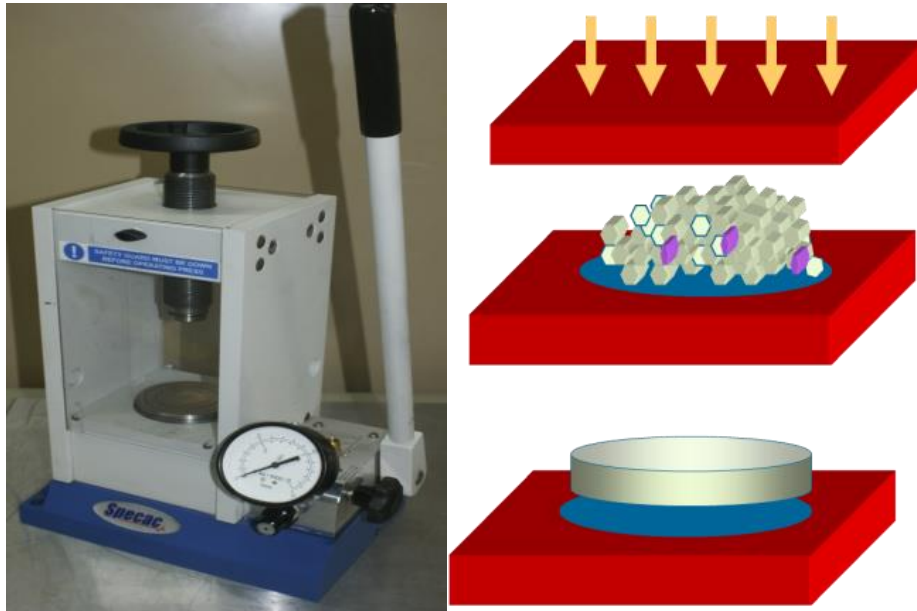
Слика 40. Лабораторијска опрема за припрему пасте

ц) Превлачење филма – уколико је узорак по својој природи аморфан, онда се узорак поставља на површину NaCl или KBr плочица испаривањем раствора, при чему се мора водити рачуна да направљен филм не буде велике дебљине, како би могао да пропусти инфрацрвено зрачење



Слика 41. NaCl плочице за наношење филма

д) Пелет техника (пелет, пилула, таблета, диск) – у овој техници се мала количина фино измрвљеног узорка миксира са сто пута већом количином калијум бромаида и компресује у танак транспарентни пелет коришћењем хидрауличне пресе. Тако настали пелети, су транспарентни за инфрацрвено зрачење и користе се у анализи.



Слика 42. Ручна хидраулична преса и схематски приказан поступак прављења пелета

5. Методе и технике

5.1. *Accu Check Active* – референтна метода

Као референтна метода за одређивање концентрације глукозе у крви испитаника коришћена је инвазивна метода коришћењем глукометра *Accu Check Active* (Roche Diagnostics, Mannheim). *Accu Check Active* систем користи узорак капиларне крви из прста и тест траке. Потребан узорак крви је око 1 – 2 μ l, а време потребно за мерење и приказивање резултата је око 5 секунди.



Слика 43. Систем *Accu Check Active*

Accu Check Active систем је заснован на коришћењу ензима специфичних за глукозу. Ензими су оксидоредуктазе, и оксидишу глукозу у глуконо лактон. Електрони из глукозе прелазе на оксидирану форму или на неки молекул медијатор, доводећи глукозу у редуковану форму. Даље, овај медијатор молекул предаје електроне на електроду која се користи за електрохемијско мерење или се електрони предају неком молекулу индикатору који формира одређену боју. На тај начин, путем

електрохемијских мерења, добија се сигнал глукозе у електричном облику, који се приказује на дигиталном дисплеју, а фотометријски део тест трачице користи се за поређење боје индикатора са датом скалом боја, приложеном уз паковање тест трачица, на којој свака нијанса боје даје одређену вредност глукозе.

Accu Chek Active систем и метод је предмет патентних апликација US 5,366,609; US 5,424,035; US 5,463,467; US 5,889,585; US 6,055,060; US 6,906,802 [135].

Као ензим користи се глукоза дехидрогеназа (GDH), као коензим пирило квинолин квинон (PQQ). У Табели 8 је дат приказ ензима, коензима, медијатора и индикатора који се користе у Accu Chek Active систему [136]. Ензим је одговоран за специфичност теста на глукозу, али није у потпуности специфичан само на глукозу. У случају коришћења неких лекова или ретких болести, малтоза, ксилоза или галактоза могу се појавити у организму, што може довести до лажних читавања глукозе [136].

Дифузија глукозе је процес сензитиван на температурне промене, са приближно 2% промене у брзини дифузије на промену од 1К температуре [136], што утиче тачност мерења глукозе. Roche diagnostics је увео код каснијег производа, Accu – Chek Aviva измене које узимају у обзир корекцију мерења на основу праћења и температуре на месту одвијања реакције.

Табела 8. Елементи сензорског система Accu Chek Active (извод из [136])

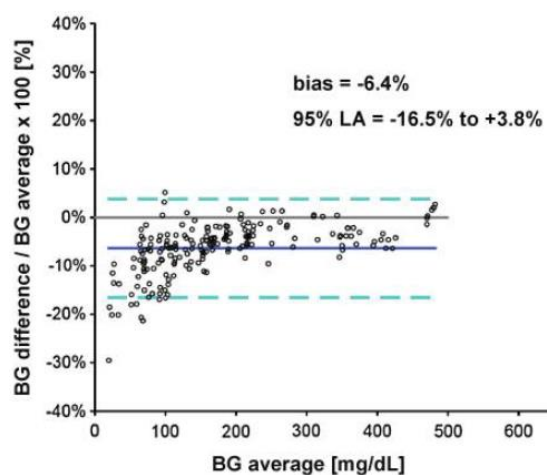
Производ	Ензим	Коензим	Медијатор	Индикатор
Accu Chek Active	GDH (GlucDOR)	PQQ	Квинон имин/фенилендиамин	Фосфомолибденска киселина

У упутству произвођача за руковање и одржавање уређаја наводи се и као границе детекције ниво глукозе од минимално 0,6mmol/l (10mg/dl), односно максимално 33.3mol/l(600mg/dl). Пре тестирања препоручује се да руке буду опране водом и сапуном, што омогућује одстрањивање нечистоћа са коже (храна, пиће, крема исл.) што

може утицати на резултате мерења. Произвођач препоручује овај поступак припреме и у циљу стимулисања протока крви. [135]

Тачност Accu Chek Active система била је предмет евалуације коју су обавили Фрекман и сарадници у оквиру студије испитивања тачности 27 уређаја за мерење глукозе која се могу наћи на тржишту [97]. Резултати студије приказани су детаљно у Табели 5, Поглавља 2 – Преглед и анализа постојећег стања предмета изучавања, и наведено је да резултати испитивања тачности Accu Chek Active система у потпуности задовољавају захтеве прописане од стране Интернационалне организације за стандардизацију објављене у оквиру стандарда (ISO) 15197 који регулише захтеве у погледу тачности уређаја за мерење концентрације глукозе у крви.

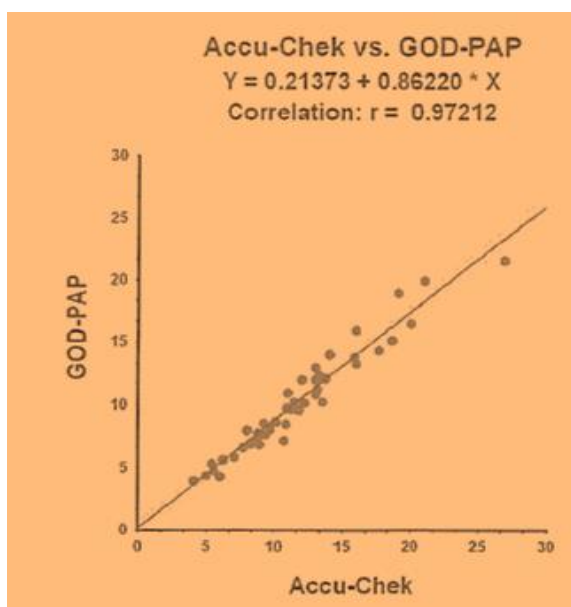
На слици 44, приказани су резултати евалуације Accu Chek Active система на Бланд-Алтмановом графикону (*Bland-Altman plot*) који приказује релативне разлике у процентима између индивидуалних резултата мерења уређаја Accu Chek Active и коресподентних резултата добијених референтном методом.



Слика 44. Бланд-Алтманов графикон Accu Chek Active система. Релативне разлике изражене процентуално, између индивидуалних резултата мерења Accu Chek Active система и коресподентних резултата мерења референтном методом приказана су у односу на средњу вредност резултат мерења обеју метода. X оса представља средњу вредност резултата мерења добијених једном и другом методом, а Y оса представља разлике између ових двеју вредности дате у процентима. Пуна линија на 0% разлика је линија идентичних мерења, пуна тамно плава линија представља биас, а испрекидане светло плаве линије представљају 95% од граница прописаних стандардом [97].

Према резултатима ове евалуације, Ассу Чеk Аctive систем је један од најтачнијих система, у потпуности задовољава захтеве прописане стандардима.

На слици 45 приказани су резултати евалуације урађене у *DIA Systems, LLC (USA)*. Као што се може приметити, на дијаграму са слике 45, постоје одступања између резултата добијених мерењем концентрације глукозе у капиларној пуној крви коришћењем Ассу Чеk Аctive уређаја и мерењем концентрације глукозе у капиларној плазми коришћењем GOD – PAP теста. Одступања нису велика за концентрације од 5 до 15 mmol / l, али се повећавају за веће концентрације глукозе. Ова одступања нису од великог значаја за клиничку праксу, али јесу битна уколико се резултати добијени коришћењем капиларне крви и уређаја Ассу Чеk Аctive, користе као вредности за калибрацију статистичког модела. Вредности концентрације глукозе у капиларној пуној крви и концентрације глукозе у плазми, изражене у mmol су у корелацији, са коефицијентом корелације $r = 0.972$.



Метода поређења (референтна метода):

Глукоза оксидаза GOD – PAP
(Trace Sci., Melburne, Australia)

Анализатор:

Спектрофотометар

>>VP-SuperSystem<<

(Abbott, Chicago, IL, SAD)

Узорци:

Капиларна пуна крв: (Ассу-Чеk)

Капиларна плазма (GOD – PAP)

Слика 45. Оцена тачности мерења Ассу Чеk Аctive система, поређењем са референтном методом GOD – PAP*

За калибрацију је препоручљиво прерачунати концентрацију глукозе добијене коришћењем Accu Chek Active уређаја, према изразу:

$$Y [mmol/l] = 0.21373 + 0.86220 \cdot X[mmol/l], \quad (1)$$

где су: Y – концентрација глукозе у крвној плазми, а X – концентрација глукозе у пуној капиларној крви добијене коришћењем Accu Chek Active уређаја.

5.2. vis - NIR спектроскопија

Спектроскопска мерења се могу вршити кроз мерења апсорпције (трансмисије), расејања или емисије. Апсорпциона спектроскопија мери, односно квантификује концентрације субстанци преко детектовања трансмитованих (пропуштених) или рефлектованих фотона који имају исту таласну дужину као светлост која се пропушта односно пада на узорак.

Оптичке методе су међу најстаријих и најбоље изученим методама за мерење биохемијских анализа и представљају срж многих медицинских и биолошких истраживања. Прве основе спектроскопских мерења поставио је још Исак Њутн.

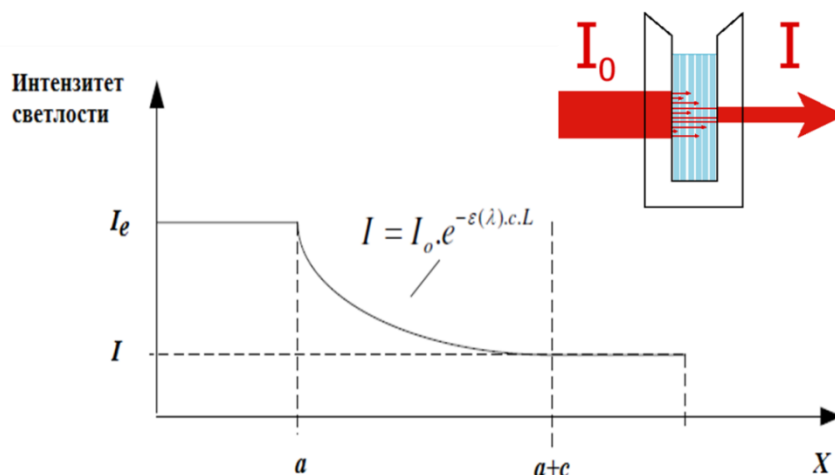
Родоначелником инфрацрвене спектроскопије сматра се сер Вилијам Хершел (Sir William Herschel) који је 1800. године, открио инфрацрвено зрачење. Први инфрацрвени спектрометар настао је још 1850. године.

Основу мерења концентрације субстанци представља Бер-Ламберов закон (Слика 46). Када улазни зрак светлости пролази кроз узорак, интензитет пропуштене светлости се експоненцијално умањује.

У изразу који се може видети и поред функције на слици :

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon(\lambda)cL} \quad (1)$$

су I – интензитет пропуштене (трансмитоване светлости), I_0 – интензитет упадне светлости, ε [$\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$] – апсорптивност (коэффициент екстинције) супстанце на специфичној таласној дужини, c [mol] – концентрација абсорбента, L [cm , mm] – дужина оптичког пута медијума.



Слика 46. Бер – Ламбер - Беров закон

Трансмитања (T) светлости пропуштене кроз медијум са супстанцом абсорбером, представља однос пропуштене светлости (I) и упадне светлости (I_0), а абсорбанса се дефинише као негативан природан логаритам трансмитансе:

$$A = -\ln T = -\ln \frac{I}{I_0} = -\varepsilon(\lambda)cL, \quad (2)$$

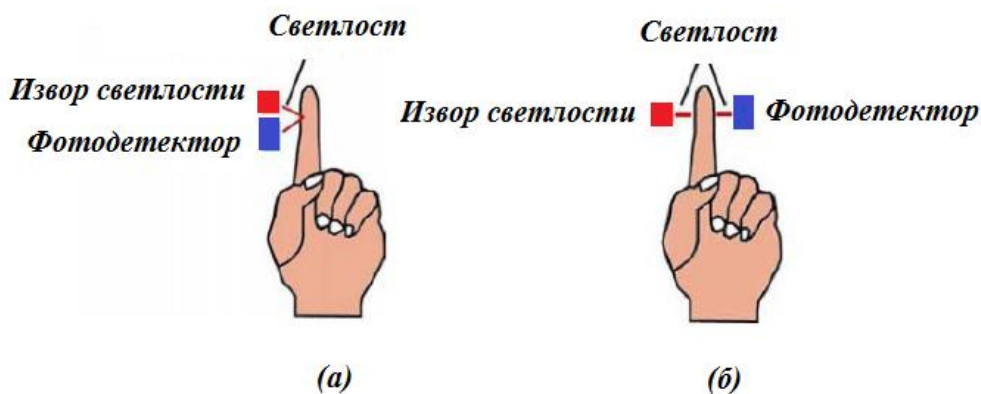
где су: A – абсорбанса (а.у. – јединице абсорбансе), а T – трансмитања (бездимензиони број, може да се изражава у процентима).

Уколико у медијуму постоји више од једне супстанце које абсорбује, Бер Ламберова закон и даље важи и апсорпција медијума је једнака суми апсорпција појединих абсорбената:

$$A_{\Sigma} = \varepsilon_1(\lambda)c_1L_1 + \varepsilon_2(\lambda)c_2L_2 + \dots + \varepsilon_n(\lambda)c_nL_n. \quad (3)$$

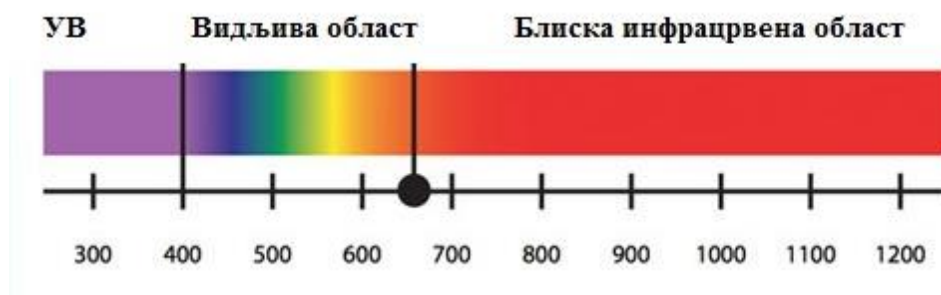
Апсорпциони мод се може користити уколико се користи изоловани узорак који се може поставити у одговарајућу кивету и у инструмент. Међутим, оптичка својства људског тела или делова људског тела ин виво, мере се или у трансмисионом моду или рефлектансном.

У трансмисионом моду, детектор се поставља тако да буде у истој линији са извором светлости, читавајући максималну вредност пропуштене светлости. Недостатак овог мода је ограниченост у погледу избора места мерења, као што су врхови прстију, носна преграда (септум), образ, језик и ухо тј. дакле они делови људског тела који су довољно танки да могу да пропусте светлост, а омогућују и позиционирање потребних делова инструмента – извора светлости и фотодетектора. С друге стране, рефлектансни мод омогућује већи избор места мерења – рефлектансна сонда омогућује постављање и на места као што су чело, образ, груди и друго (Слика 47).



Слика 47. Рефлектансни мод мерења (а) и трансмитансни мод (б)

У *vis/NIR* спектроскопији користи се извор светлости који покрива опсег видљивог светла (400 nm - 700nm) и блиског инфрацрвеног (800 nm - 2500 nm) (Слика 48). Коришћењем светлости у видљивом и блиском инфрацрвеном домену, врло је лако утврдити у реалном времену, на потпуно неинвазиван начина, спектралне карактеристике целих објеката, што је од великог значаја за примену у мерењима код биолошких система.



Слика 48. Видљива и блиска инфрацрвена област електромагнетног зрачења

5.3. Блиска инфрацрвена спектроскопија и Аквафотомика

5.3.1. Блиска инфрацрвена спектроскопија

Блиска инфрацрвена спектроскопија (Near infrared - NIR) је једна од спектроскопских метода која покрива само блиски инфрацрвени део електромагнетног спектра од приближно 800nm до 2500nm. Откриће блиске инфрацрвене спектроскопије се приписује енглеском научнику, немачког порекла Вилијему Хершелу (Frederick William Hershel, 1738-1822), који је разложио сунчеву светлост помоћу призме и открио да се температура значајно повећава идући ка црвеној и испод црвене области електромагнетног спектра; тај регион се данас назива блиска инфрацрвена област.

NIR спектроскопија је насла своју практичну примену тек шездесетих година прошлог века и то најпре у пољопривреди, као аналитичка метода која је касније постала и регуларан део контроле квалитета у индустријској пракси. Тек са развојем хеометријских метода за обраду података и развоја нових спектроскопских конфигурација заснованих на употреби оптичких влакана долази до врло широке и опсежне примене NIR спектроскопије. Последњих година NIR спектроскопија је постала опште прихваћена и у фармацеутској индустрији за тестирање и анализу материјала, контролу квалитета и процеса. Појачан интерес за спектроскопију у области биомедицине директан је резултат једне велике предности блиске инфрацрвене

спектроскопије у односу на друге аналитичке методе, а то је једноставна и скоро минимална припрема узорака.

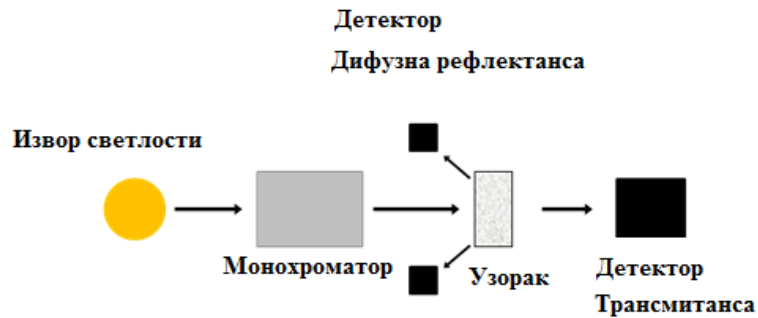
5.3.2. Основни принципи блиске инфрацрвене спектроскопије

Блиска инфрацрвена област обухвата регион електромагнетног спектра од 780nm – 2500nm. У овој области најизраженије апсорпционе траке потичу од овертонова и комбинација фундаменталних вибрација –CH, -NH, -OH и –SH функционалних група. Апсорпционе траке у овој области су типично широке, преклапају се и углавном су 10-100 пута слабије од њихових одговарајућих фундаменталних апсорпционих трака у средњој инфрацрвеној области. Ове карактеристике ограничавају могућности NIR спектроскопије у класичном смислу, дакле, није могућа једноставна идентификација апсорпционих трака преко положаја у спектру, већ захтевају сложене дата мининг методе за обраду података. Мали апсорпциони коефицијент омогућује велику дубину пенетрације светлости, па је потребно подешавање дебљине узорка. Овај аспект представља предност, с обзиром да омогућује анализу узорака који јако апсорбују светлост као и оних који светлост расејавају и то у моду трансмитансе или рефлектансе, без посебне припреме узорака.

Аналитички сигнал који се добија од узорка је двојачке природе – поседује информације и о физичким и о хемијским карактеристикама узорка јер потиче од апсорпције и од расејања светлости. С једне стране то је предност, јер се само једним мерењем могу добити и физичке и хемијске карактеристике узорка, али с друге стране ефекти расејања који потичу од варијација физичких карактеристика узорка могу представљати значајан аналитички проблем.

5.3.3. Инструментација и припрема узорака

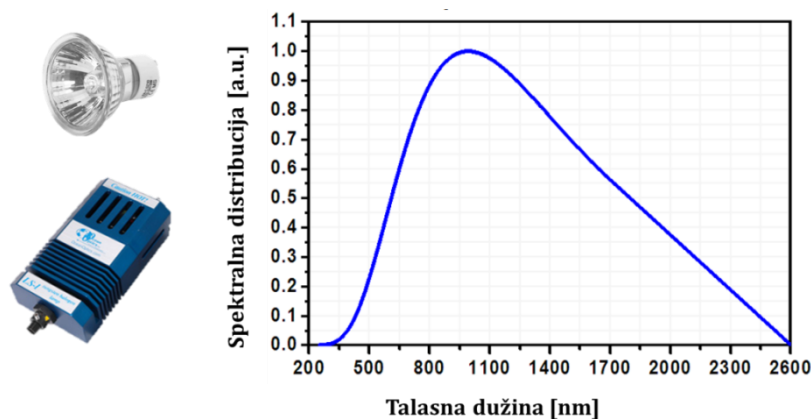
Инструментација за блиску инфрацрвену спектроскопију се не разликује посебно од инструмената за инфрацрвену спектроскопију; генерално чине је извор светлости, монохроматор, носач узорка и детектор који омогућује мерење трансмитансе или рефлектансе (Слика 49).



Слика 49. Схема експерименталне инсталације за блиску инфрацрвену спектроскопију

Као извор светлости обично се користе волфрам халогенске лампе (*tungsten halogen*), јер су малих димензија и компактне и омогућају одговарајућу дистрибуцију спектралне снаге (Слика 50). Детектори укључују силицијум, олово сулфид (PbS) и индијум галијум арсенид (InGaAs).

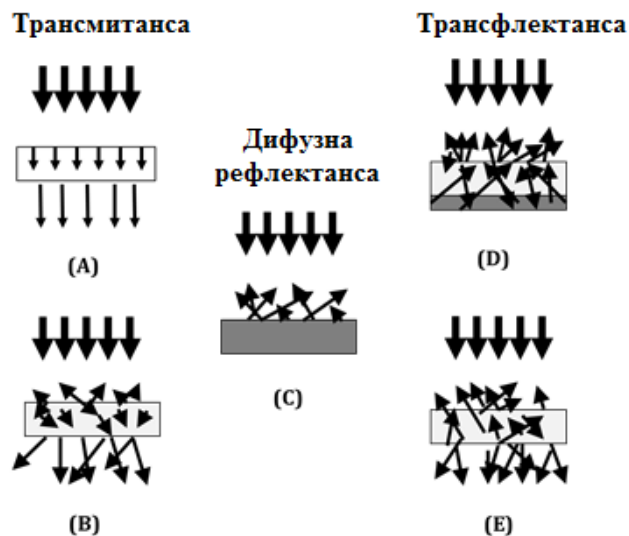
Силицијумски детектори су веома брзи, имају низак ниво шума, малих су димензија и високо сензитивни у региону до 1100nm. Олово сулфид детектори су спорији, али су веома популарни, јер покривају опсег од 1100-2500nm, а дају добар однос сигнал/шум. Најскупљи детектори су индијум галијум арсенидни јер комбинују јер по брзини су у рангу силицијумских, али дају опсег као олово сулфидни.



Слика 50. Типичан изглед лампе, кућишта и спектрална дистрибуција волфрам халогенског извора светлости

Постоји велики број оптичких конфигурација за раздвајање полихроматског NIR спектралног региона у монохроматске фреквенце. Одабир одговарајуће технологије је

заснован на потребној сензитивности, поузданости, једноставности за употребу и потребе имплементације.



Слика 51. Различити модови мерења у NIR спектроскопији: (А,Б) трансмитанса, (Ц) дифузна рефлектанса, (Д,Е) трансфлектанса

Аквизициони мод диктиран је од стране својстава узорка (слика 51). Транспаретни материјали се скоро увек мере у моду трансмитансе (слика 51(А)). За непровидне течности, аморфне или чвртсе узорке обично се мери дифузна трансмитанса (слика 51(Б)), дифузна рефлектанса (слика 51(Ц)) или трансфлектанса (слика 51(Д), 51(Е)). У сваком случају апсорбанса се рачуна релативно у односу на стандардну референцу, преко измерене трансмитансе, а према изразу $\log(1/T)$, односно преко рефлектансе $\log(1/R)$.

5.3.4. Хеометрија

С обзиром да су NIR спектри састављени од широких, преклапајућих и недовољно дефинисаних апсорпционих трака које садрже хемијску и физичку информацију о свим компонентама узорка, то је аналитичка информација спектра заправо мултиваријационе природе. За квалитативну или квантитативну анализу NIR спектра, односно, за успостаљање релација између спектралних карактеристика и својства узорка неопходна

је примена математичких и статистичких метода које се једним именом зову хеометријске методе, или краће хеометрија, а које су неопходне за екстракцију релевантних информација односно редукцију ирелевантних информација.

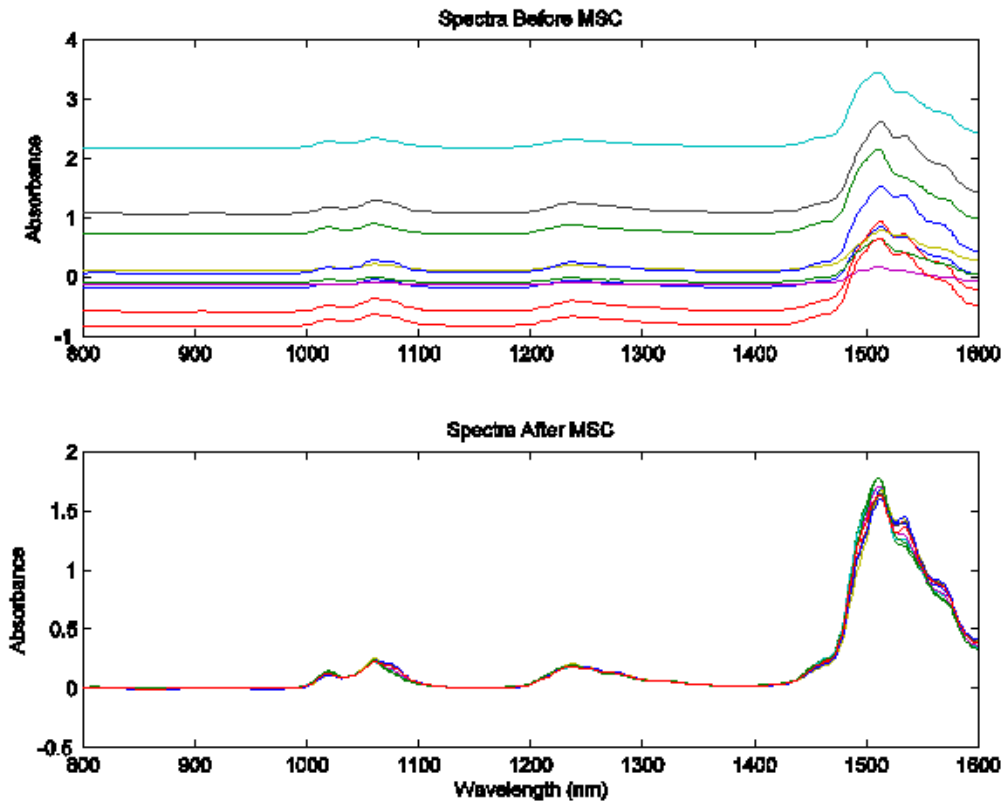
5.3.4.1. Препроцесирање података

У снимљеним спектрима често се јављају нежељени ефекти који утичу на квалитет информација, као што су расејавање светлости, варијације у оптичком путу и случајни извори шума који потичу од променљивих карактеристика узорка, инструмента или других случајних догађаја због којих се јавља потреба за препроцесирањем спектра и издвајањем само битних и смислених информација. Непосредно снимљен спектар, односно непосредни излаз из инструмента се назива сиров спектар и најчешће је први корак у обради података управо пречишћавање тј. препроцесирање спектра у циљу уклањања, редуковања или стандардизовања нежељених утицаја на спектар. Избор препроцесирања представља врло важан корак у обради података јер од њега много зависи квалитет информација које ће се добити. Такође, различите методе препроцесирања могу дају различите излазне податке.

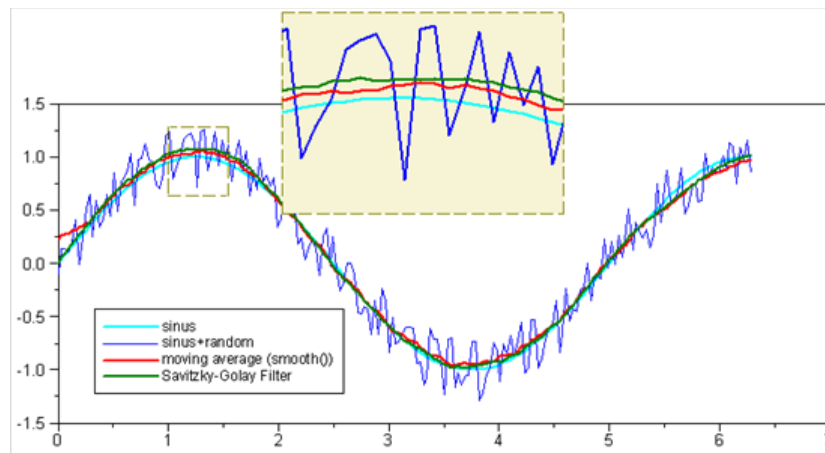
Препроцесирање се своди на математичке операције над снимљеним спектрима. Две најчешће методе које се користе су Мултипликативна корекција расејања (*Multiplicative scatter correction - MSC*) и један тип нормализације који се назива стандарна нормализација варијансом (*Standard normal variate - SNV*).

Ове две методе се користе за корекцију расејања светлости које доводи до варијације у базној линији спектра и првобитно су развијене само за препроцесирање рефлектансе, али се исто могу применити и за спектре снимљене у моду трансмитансе.

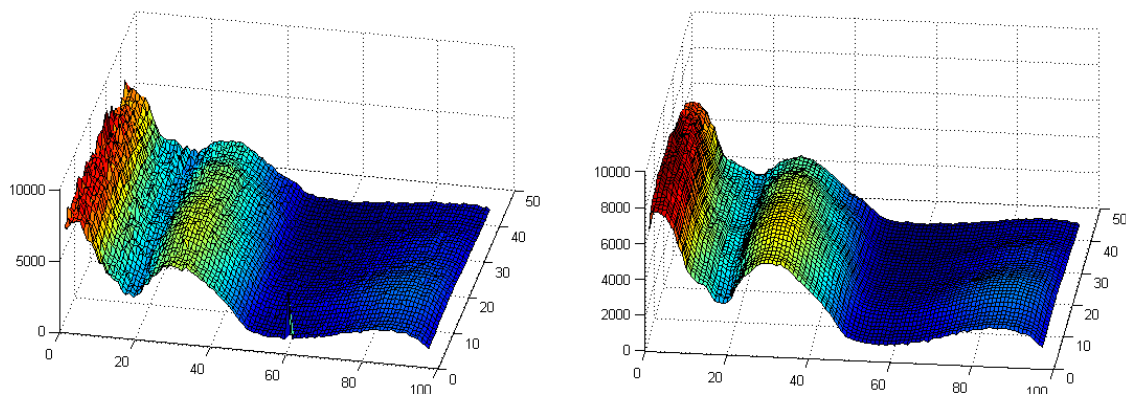
Варијације у положају базне линије спектра долази у случају када варира дужина оптичког пута и увек се могу елиминисати или редуковати неким типом нормализације.



Слика 52. Пример препроцесирања спектра и уклањања варијавија у офсету базне линије применом мултипликативне корекције расејања (MSC)



Слика 53. Принцип Савицки-Голеј полиномијалног алгоритма



Слика 54. Примена Савицки-Голеј алгоритма за заглађивање спектра на примеру NIR спектра добијених обрадом хиперспектралне слике: спектри пре препроцесирања (лево) и после препроцесирања (десно)

С обзиром да су NIR спектри састављени од благих широких пикова који се често састоје од заправо више пикова који се преклапају, диференцирање спектра (први и други извод) могу помоћи у раздвајању тих пикова и побољшању резолуције. Примена извода такође може поправити и утицај варијација базне линије.

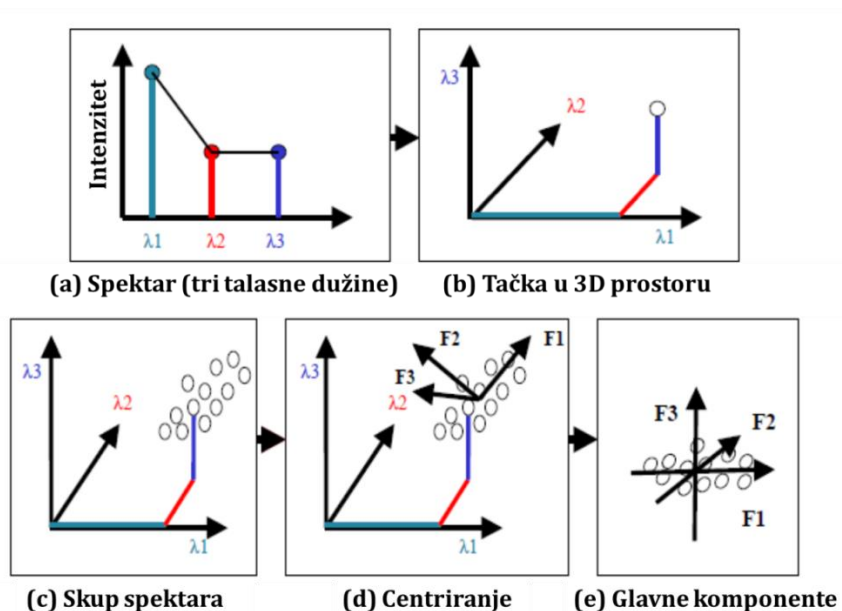
Међутим, примена извода има негативну последицу да се повећава и шум, па се често примена извода комбинује са још једном методом, а то је заглађивање спектра, и најчешће се заглађивање врши по Тејлоровом (*Taylor* – апроксимација по Тејлоровом реду) или Савицки-Голеј (*Savitzky-Golay* – коришћење полинома) алгоритму.

5.3.4.2. **Анализа главних компоненти – PCA (*Principal Component Analysis*)**

Анализа главних компоненти користи се углавном као метода редукције променљивих. С обзиром да спектрални подаци представљају огроман скуп променљивих постоји потреба за њиховом редукцијом и оперисањем са мањим скупом података. Важно је напоменути да су многе од ових променљивих у корелацији, што цео скуп података чини редувантним. Анализа главних компоненти врши редукцију сувишних променљивих и проналази правце главних варијација у подацима тј. главне компоненте.

РСА је математичка процедура која спектралне податке претвара у ортогоналне (међусобно независне) компоненте чија линеарна комбинација апроксимира оригиналне податке. Новодобијене променљиве се називају главне компоненте, сопствени вектори или фактори (принципал компоненти - *PCs*, *eigenvectors*, *factors*) и они одговарају правцима највећих варијанси у скупу спектралних података. Прва главна компонента обично представља правац највеће варијансе у скупу, а свака следећа је мања. Процедура трансформације оригиналног скупа спектралних података је схематски представљена на слици 55 на примеру једног спектра са три променљиве (таласне дужине) ради једноставности. У реалним условима број променљивих (таласних дужина) зависи од резолуције и опсега мерења спектрометра. Ако је опсег мерења спектрометра од 800 до 1200nm, а резолуција спектрометра је 2nm, то ће у том скупу података бити 200 променљивих од којих су многе корелисане (међусобно зависне).

Дакле, за реални спектар са p таласних дужина (променљивих), трансформација ће се вршити у p -димензионалном простору. На слици 55, трансформација спектра од три таласне дужине одвија се у тродимензионалном простору.



Слика 55. Илустрација принципа анализе главних компоненти на примеру спектра састављеног од три таласне дужине

Трансформација спектра са три варијабле (слика 55а) врши се на следећи начин: формира се нови координатни систем где свака оса одговара по једној таласној дужини (55б), и на тај начин се оригинални спектар претвара у тачку у тродимензионом простору; у случају више спектра оригинални подаци трансформишу се у скуп тачака (облак) у 3D простору (55ц); тражи се средња вредност за све добијене тачке (трансформисане спектре) и у добијени центар се поставља нови центар координатног система (55д); одређивање главних компоненти се врши повлачењем оса у правцима највећих варијација у позицијама тачака (55е) и добијене осе представљају правце главних компоненти F1, F2 и F3, при чему је F1 прва главна компонента, односно правац највећих варијација.

Анализа главних компоненти корисна је и за уклањањање тзв. оутлајера, односно спектра који се јако разликују од остатка спектралног скупа. У трансформисаном координатном систему, оутлајер ће бити она тачка (спектар) чији положај се много разликује у односу на остале тачке. Такви спектри се онда уклањају из анализе јер нису репрезентативни, постоји могућност да садрже грешку и зато је потребно уклонити их из даље анализе.

5.3.5. Мултиваријационе методе за квантитативну анализу

Квантитативна анализа NIR спектра подразумева израчунавање количине неког састојка у узорку на основу његових спектра. Пре било каквог израчунавања на основу спектра, неопходно је извршити процес калибрације применом мултиваријационих метода. Процес калибрације састоји се од следећих корака:

- (1) селекција погодног калибрационог скупа – одабир скупа спектра узорка који су довољно репрезентативни (нпр. уклањање оутлајера)
- (2) аквизиција спектра и одређивање референтних вредности (нпр. концентрације неког састојка у узорку)
- (3) мултиваријационо моделирање које за циљ има успостављање релације између варијација у спектру и референтних вредности (нпр. успостављање релације у

промени апсорпције на некој таласној дужини спектра и концентрације састојка у узорку)

- (4) валидација направљеног модела коришћењем неке од метода валидације: унакрсна валидација, валидација на основу скупа и спољашња валидација

Мултиваријационе регресионе методе које се најчешће користе у квантитавној NIR анализи су Регресија главним компонентама (*Principal Components Regression - PCR*) и Парцијална регресија методом најмањих квадрата (*Partial Least Squares Regression - PLSR*). PCR метода користи главне компоненте добијене PCA анализом за стварање регресионог модела на основу којег се врши предикција својства од интереса – зависне варијабле (нпр. концентрације неког састојка у узорку коју желимо да израчунавамо на основу спектра). PLSR метода проналази правац највећих варијација поређењем спектралних својстава и вредности зависних варијабли, поредећи их у односу на нове израчунате осе које се називају PLSR компоненте или латентне варијабле. Основна разлика између ове две методе је да у PCR методу прва главна компонента представља правац највећих варијација у спектру, док у PLSR методи главна компонента представља најважније варијације које су у вези са варијацијама зависно променљиве. У оба случаја оптимални број фактора у калибрационом моделу (главних компоненти, односно у случају PLSR латентних варијабли) зависи од својства узорка и својстава зависно променљиве. Коришћење великог броја фактора може довести до тзв. оверфитовања модела са високим коефицијентом регресије и малом стандардном грешком калибрације, али зато са великом грешком предикције. Такав модел није довољно робустан и може се показати као неупотребљив када се тестира са независним новим валидационим скупом.

У неким случајевима, дешава се да веза између спектралних података и зависно променљиве није линеарна. У тим случајевима ове две методе се не могу употребити, јер оне претпостављају линеарну корелацију са зависно променљивом, и тада се користе друге нелинеарне методе или вештачке неуронске мреже.

5.3.6. Мултиваријационе методе за квалитативну анализу

У квалитативној анализи својства узорака која треба да се повежу са неким карактеристикама њихових спектра имају дискретне вредности које представљају неку квалитативну особину узорка као што су нпр. „добар“ и „лош“. За такве проблеме користе се мултиваријационе класификационе методе. На пример, овакви случајеви се јављају када је потребно извршити класификацију производа на основу њихових спектра на оне који су исправни и оне који су неисправни (нпр. у прехранбеној индустрији). Ове методе се деле на надгледане и ненадгледане. Ненадгледане методе су оне код који није познато који спектри припадају којој класи, док се у надгледаним методама унапред додељују класе одређеним скуповима спектра.

Ненадгледане методе или како су још познате, кластер анализе, дакле, не захтевају претходно знање о томе како су спектри подељени у групе, већ се груписање, кластеризација односно класификација врши директно. Овај тип класификације је веома користан у раним фазама анализе када се жели испитати постојање груписања у популацији спектра. Кластер анализе се могу вршити једноставним визуелним техникама као што је РСА анализа, где ће се јасно видети различите групе тачака (спектра) уколико постоји груписање по својствима. Осим РСА анализе користе се и тзв. хијерархијске методе и резултати се тада визуелно представљају у виду дрвета – дендограма.

Надгледане класификационе методе које се још називају и дискриминациона анализа, се користе за дефинисање правила класификације. Дакле, пре вршења анализе познато је припадност спектра одговарајућим класама, и циљ анализе је одређивање спектралних карактеристика (таласних дужина) који дефинишу класу, односно по којима је одређена класа препознатљива. У ове методе спадају линеарна дискриминациона анализа (*LDA – Linear Discriminant Analysis*), Квадратна дискриминациона анализа (*Quadratic Discriminant Analysis - QDA*), SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogies*) и KNN (*K – nearest neighbours*).

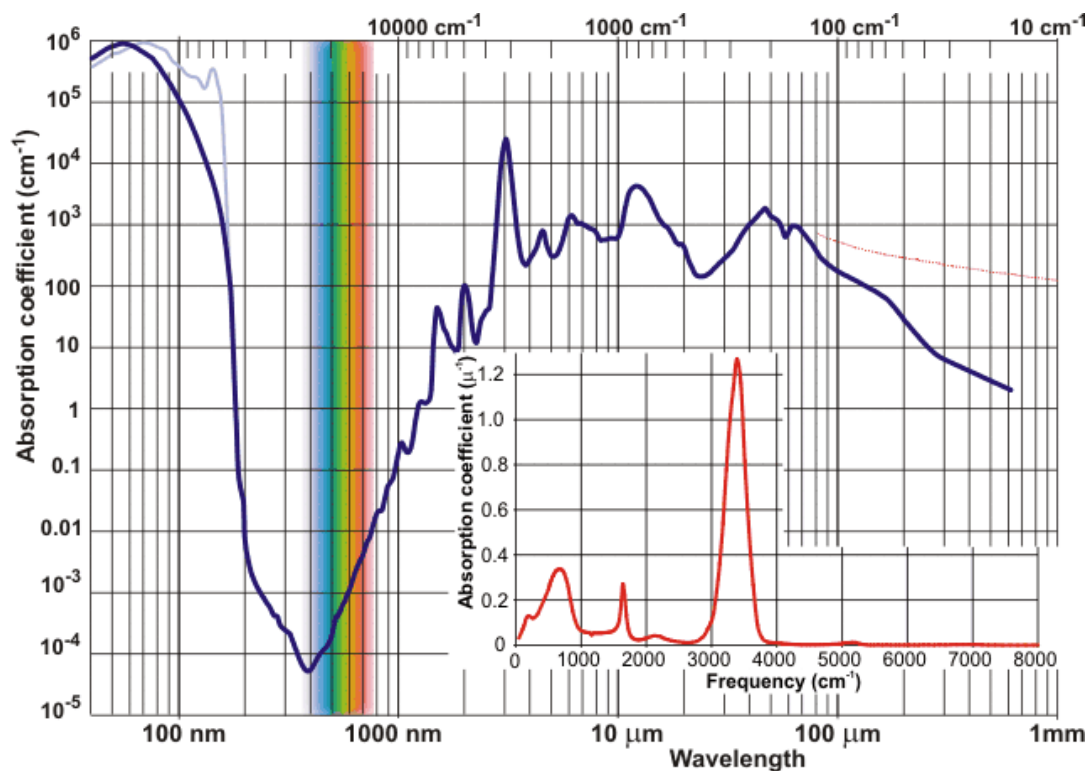
Крајњи циљ свих класификационих метода је проналажење математичког критеријума за изражавање сличности односно разлика група спектара, што ће даље послужити за класификацију узорака чија припадност класама није позната, а само на основу њихових спектара.

5.3.7. Аквафотомика

5.3.7.1. Вода и блиска инфрацрвена спектроскопија

Вода је снажан апсорбер инфрацрвене енергије (Слика 56) и погодна је за анализу само малих или врло танких узорака. Услед тога, непогодно је и непрактично користити је за неинвазивну анализу водених и биолошких система у реалном времену. Насупрот томе, апсорпција воде у видљивој и блиској инфрацрвеној области је неколико пута слабија, што значи да се овај спектрални регион може користити и за анализу дебљих узорака. Захваљујући томе, блиска инфрацрвена спектроскопија пружа могућност за анализу биолошких објеката у целини, на недеструктиван начин, веома брзо, користећи веће оптичке путеве (веће дебљине узорака) и то без посебне припреме узорака.

Коришћењем vis-NIR региона, лако је у реалном времену, вршити аквизицију спектралних података и мерење водених и живих биолошких система. Временски рашчлањена динамичка vis-NIR спектроскопија дозвољава спектралну аквизицију у реалном времену под дејством различитих пертурбација, односно омогућује праћење промена у разним хемијским везама унутар система, укључујући и воду као медијум. На тај начин, вибрације молекула воде могу бити опажене и анализирани у релацији са вибрацијама других молекула и функције система као целине. Сваки спектар таквог система рефлектује апсорбовану светлост на различитим таласним дужинама у зависности од доприноса (концентрације и структуре) сваког молекула као члана тог система. Поред тога, vis-NIR спектар садржи и физичку информацију, као што је информација о расејању светлости, и он је под снажним утицајем температуре и pH вредности.



Слика 56. Електромагнетни спектар воде [104]

Спектар воде у vis-NIR домену 680-2500nm, састоји се од два доминантна широка пика, познатих као први и други овертон и неколико изражених али мањих пикова, познатих као комбинационе траке. Спектрални регион овертонова обично се састоји од много мањих пикова који се преклапају. Зато, сирови vis-NIR спектар не даје јединствену апсорпциону траку. Да би се дошло до информација о појединачним молекулима или структурама, неопходна је примена алата као што је мултиваријациона анализа или други *data mining* приступ.

5.3.7.2. vis-NIR спектроскопија водених система

Одређене водене конфигурације као што су на пример, димери, тримери или хидратационе љуске, доприносе сасвим специфично изгледу спектра воде у vis-NIR области. С обзиром да су ове творевине веома сензитивне на конфигурације и наелектрисање растворених молекула или кластера, то NIR спектар растварача,

односно у овом случају воде, садржи веома значајне информације о раствореним супстанцама.

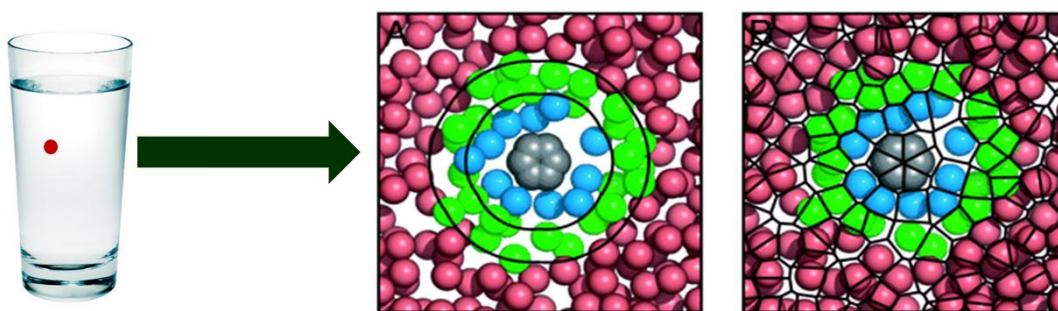
Раствори протеина или других биомолекула, суспензије малих честица у води и различитим биолошким системима као што су ћелије, биљке, телесне течности животиња као и ткива предмет су многих истраживања широм света, помоћу блиске инфрацрвне спектроскопије. У овим истраживањима, систематски су потврђиване поменуте апсорпционе траке воде у овом региону и то при различитим пертурбацијама (концентрација растворених супстанци, концентрације наночестица различитих димензија, концентрација молекула који не апсорбују у vis-NIR домену, температура, ниво осветљености и др.). Овако прикупљени спектри анализирани су уз помоћ метода мултиваријационе анализе. Као резултат, многе апсорпционе траке воде су установљене. Многе од ових таласних дужина тј. водене апсорпционе траке, се подударaju са већ пријављеним регистрованим воденим тракама или прорачунатим овертоновима већ публикованих водених апсорпционих трака у ИР региону. Најновија открића водених апсорпционих трака у овој области резултат су Лабораторије за Биомерења, са Кобе Универзитета у Јапану [104].

У истраживањима поменуте лабораторије, вршени су различити типови пертурбација воде, са на пример различитим типовима прионских протеина, соли као што је NaCl, витамин C и друго, али у резултатима анализа су се увек као најважније, најугицајније таласне дужине, откривене помоћу примене метода мултицаријационе анализе јављале оне које одговарају главним воденим апсорпционим тракама. Даље, њихова истраживања су показала да је могуће извршити предикцију величине кристала шећера и соли растворених у води, када се користе спектри ових раствора у vis-NIR домену. Штавише, супротно очекивањима, и при изразито малим концентрацијама у ррb, било је могуће израчунавање концентрације преко спектра раствора. Следеће истраживање показало је врло интересантне могућности vis-NIR спектроскопије. Мерење концентрације компоненте од интереса – полистирена, праћено је преко његове апсорпционе траке на 1620nm, и као што се очекивало, резултат одређивања концентрације преко спектра је имао мању тачност са смањивањем концентрације.

Међутим, када се одређивање концентрације вршило преко спектра у региону првог овертона воде на 1300-1600nm, чак и при смањивању концентрације полистиренских партикула, није долазило до смањивања тачности одређивања концентрације. Спектрална мерења у широком опсегу концентрација показивала су високу тачност. Слични резултати добијени су и за растворе протеина, метала и томе слично.

Сви ови резултати довели су до закључка да vis-NIR спектрални образац воде даје детаљну слику водене матрице и то како се она мења под утицајем осталих молекула у раствору (Слика 57).

По први пут, вода се разматра као основни заједнички чинилац водених и биолошких система. Вода је природни заједнички чинилац целог биолошког живота.



Слика 57. Молекули воде се прилагођавају молекулима који се у њој налазе и заузимају одређене конфигурације које се могу открити преко vis-NIR спектра воденог раствора.

Зато се интеракција воде и светлости изражена у облику спектра може сматрати својеврсним молекуларним огледалом, где је вода огледало које рефлектује остале молекуле који се у њој налазе (Прилог 1: Поглавље 4- Аквафотомика).

Како би се систематизовало знање и прикупљене информације о интеракцији воде у воденим и биолошким системима, а коришћењем светлости, предложено је формирање нове научне дисциплине Аквафотомике [104].

5.3.7.3. Аквафотомика – основни термини и дефиниције

Аквафотомика је нови термин, уведен за означавање концептуалног приступа води као мулти-елементном систему који се може описати преко њеног мулти-димензионалног спектра.

Термин Аквафотомика астављен је од три речи грчког порекла : *aqua* што значи вода, *photos* – светлост и суфикса – *omics* који се често користи у наукама и означава “све о нечему”, по узору на научне дисциплине геномика, протеомика и томе слично. Тако је овај термин сасвим пригодно описао суштину новоформиране научне дисциплине чији циљ је да обухвати сва постојећа знања о интеракцији воде и светлости.

Савремене технологије као што су UV, vis-NIR, IR, Раман и THz спектроскопија омогућују временски разложена и неинвазивна мерења, и уз помоћ мултиваријационе спектралне анализе представљају огроман извор информација које се могу систематизовати у једну базу знања – Аквафотом. Аквафотомика као један општи концепт је резултат великог броја експерименталних анализа и година искуства и прикупљања информација о воденим апсорпционим тракама и спектралним обрасцима понашања воде, на основу којих се долазило до закључака о структурама које вода гради, међусобним интеракцијама молекула воде, као и интеракција између воде и других компоненти водених система.

5.3.7.4. Координате водене матрице – WAMACS (*Water Matrix Coordinates*)

Апсорпционе траке воде могу се одредити на два начина: експериментално или прорачунавањем фреквенце овертонова за већ установљене траке. Прикупљање апсорпционих трака воде у јединствену базу података и повезивање са специфичним биолошким функцијама, омогућило би предикцију и боље разумевање биологије, хемије и физике воде и других водених система.

На основу искуства са вис-NIR спектроскопијом за сада је установљен један број водених апсорпционих трака које одговарају најважнијим променљивим у развијеним

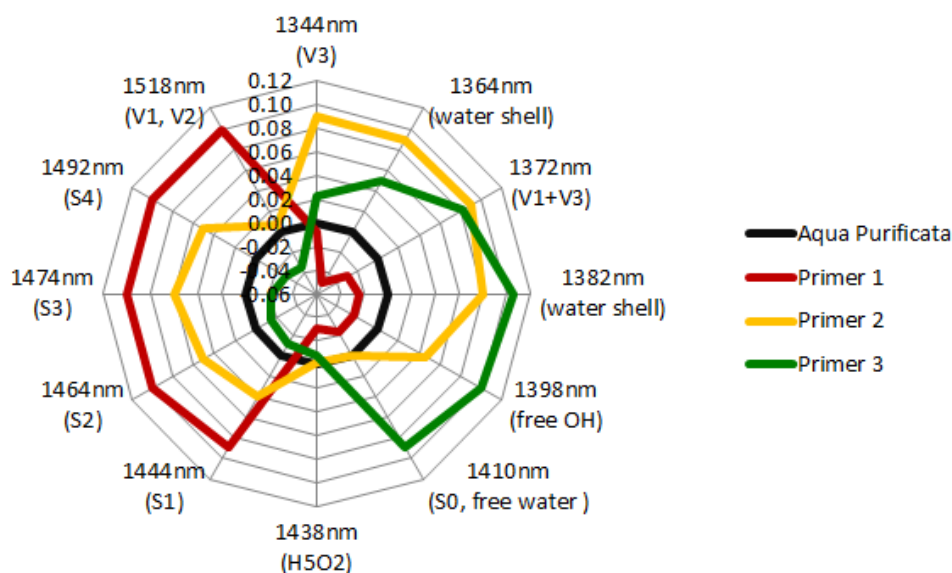
вис-NIR регресионим или класификационим моделима ствараним за одређене пертурбације различитих биолошких и водених система. Те установљене водене траке назване су координате водене матрице назване су координате водене матрице (WAMACS – *Water Matrix Coordinates*). У Табели 2, Прилога 1, приказане су WAMACS координате пронађене у области првог овертона воде (1300-1550nm) којих за сада има 12, и обележавају се са C_i , где је $i=1, \dots, 12$. Свака WAMACS координата заправо представља један опсег таласних дужина, односно траку, и оне су различите ширине (6-20nm). Табела 2 (Прилог 1) на илустративан начин приказује како је установљење ових 12 координата резултат великог броја испитивања различитих водених система и биолошких система при различитим променама (пертурбацијама) и изврстан је пример систематизованог знања попут периодног система елемената. Као што се види из Табеле 2 (Прилог 1), у свим посматраним системима, без обзира на тип пертурбације, сваки систем је показивао спектралне варијације унутар одређених вредности таласних дужина. То значи да су приликом моделирања, регресиони вектори или тежински коефицијенти главних компоненти показивали највећи утицај ових таласних дужина у моделима. Та открића довела су до закључка да постоје одређене водене молекуларне конформације унутар водене матрице и да постоји могућност да се оне посматрају и предвиде на основу спектра, а на основу њих одреди функционалност воде у том систему.

За сваку координату водене матрице израчунат је и приписан одређени вибрациони мод или молекуларна конформација воде (Табела 2, Прилог 1). Карактеризација WAMACS координата је следећа: C_1 : 1336-1348nm (ν_3), C_2 :1360-1366nm (OH-(H₂O)_{1,2,4} i O₂-(H₂O)₄), C_3 :1370-1376nm ($\nu_1+\nu_3$), C_4 :1380-1388nm (OH-(H₂O)_{1,4} i O₂-(H₂O)₄), C_5 :1398-1418nm (S_0), C_6 :1421-1430nm (H-OH savijanje i O-H...O), C_7 :1432-1444nm (S_1), C_8 :1448-1454nm (OH-(H₂O)_{4,5}), C_9 :1458-1468nm (S_2), C_{10} :1472-1482nm (S_3), C_{11} :1482-1495nm (S_4), и координати C_{12} :1506-1516nm (ν_1, ν_2). Набројане водоничне везе могу се описати на следећи начин: ν показује истежања OH везе молекула воде везаних водоничним везама (ν_1 – симетрична истежућа фундаментална вибрација, ν_2 – фундаментална деформациона вибрација савијања, ν_3 - H₂O фундаментална деформациона вибрација савијања); S представља број водоничних веза, тако нпр. S_0 означава слободне

молекуле воде. Водене структуре праве уједно и слабо везане структуре водених молекула везаних водоничним везама (водене траке на краћим таласним дужинама) и структуре које су снажније везане водоничним везама (водене траке на већим таласним дужинама).

5.3.7.5. Акваграм

За графички приказ координата водене матрице одређених приликом испитивања неког система, користи се посебан тип дијаграма – акваграм [137]. На акваграму се приказује нормализована вредност апсорбансе у воденим тракама на радијалним осама које полазе из заједничког центра дијаграма (слика 58).



Слика 58. Пример акваграма

Вредност апсорбансе која се наноси на акваграм је нормализована на следећи начин:

$$A_{\lambda} = \frac{A_{\lambda} - \mu_{\lambda}}{\sigma_{\lambda}}, \quad (1)$$

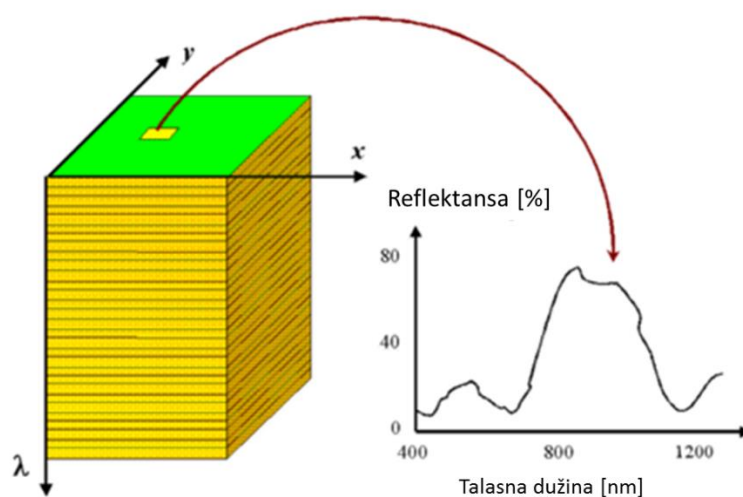
где је A_{λ} , нормализована апсорбанса узорка на датој таласној дужини λ , A_{λ} је апсорбанса узорка на тој истој таласној дужини, μ_{λ} је осредњена вредност апсорбансе за све испитиване узорке и σ_{λ} је стандардна девијација узорка на таласној дужини λ . На

основу израза (1) види се да вредност нормализоване апсорбансе зависи од посматране популације и биће различита за други скуп узорака. Од овако добијене нормализоване апсорбансе узорка одузима се нормализована апсорбанса чисте воде и са акваграма се посматрају одступања у односу на чисту воду која даје нулту линију на акваграму (Aqua Purificata, црна линија на слици 58).

На акваграму се могу уочити два карактеристична дела – леви део акваграма од 1444nm до 1517nm, односно од $S1$ до $(v1,v2)$ одговара води везаној водоничним везама, док десни део акваграма – од 1344nm до 1438nm, односно од $v3$ до $H5O2$, одговара води која није везана водоничним везама и која ступа у интеракцију са другим молекулима присутним у њој.

5.4. Хиперспектрални имиџинг

Последњих неколико деценија, многе истраживачке студије су се посветиле одређивању анализата од интереса помоћу неинвазивних или минимално инвазивних метода и техника.



Слика 59. Хиперспектрална слика – сваком пикселу хиперспектралне слике одговара један спектар [138]

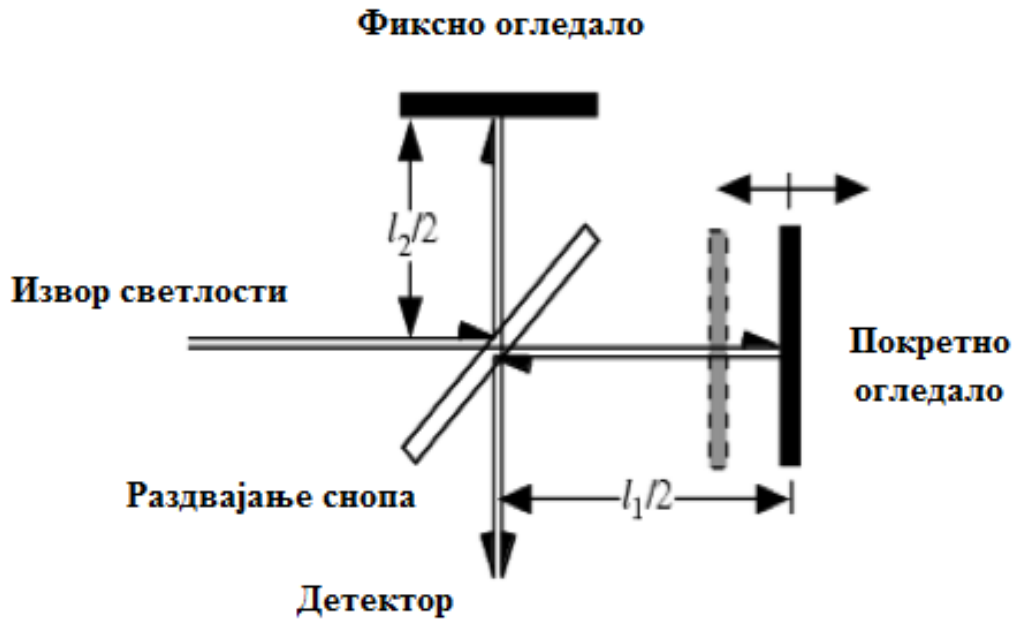
Хиперспектрални имиџинг је метода којом се врши аквизиција информација преко електромагнетног спектра и има широку примену у пољопривреди, обезбеђењу,

прехранбеној индустрији, минерологији, медицини и многим другим областима. Хиперспектрални сензори врше аквизицију података у виду скупа слика. Свака слика у том скупу представља један део електромагнетног спектра који се назива спектрална трака (*spectral band*) која је састављена од *voxel*-а, најмањих 3Д записа (2Д пиксел и таласна дужина). Континуалним слагањем ових спектралних трака добија се тродимензионална хиперспектрална слика или *data cube*, која се даље може обрађивати и анализирати. Из сваког *voxel*-а такве слике може се добити одговарајући спектар (Слика 59).

5.5. FTIR спектроскопија са микроскопијом

Преферирани метод за аквизицију инфрацрвених спектра данас је Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом која има низ предности. Главна предност у односу на дисперзивне инструменте је да се свака таласна дужина светлости може мерити у исто време. FTIR спектроскопија употребљава Мајкелсонов интерферометар. Мајкелсонов интерферометар развијен још 1920. године омогућује веома ефикасно коришћење енергије. Излаз из овог инструмента је интерферограм. У основи овај инструмент мери излазну енергију која је модулисана било којим материјалом који се нађе између извора зрачења и детектора. Ово је заправо исти тип мерења које омогућује и спектрофотометар. Значајна разлика је у томе што се као излаз не добија спектар већ интерферограм. Међутим, интерферограм се може трансформисати у спектар помоћу математичке методе која се зове Фуријеова трансформација.

Развијена још у 19. ом веку од стране француског математичара Фуријеа, ова техника омогућује конверзију али је потребно дуго време да се она изврши. Зато, ова техника није била практична опција за добијање инфрацрвеног спектра све до развоја брзих дигиталних рачунара. Повезивање интерферометра са компјутером омогућило је развој FTIR спектроскопије, односно инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом. Слика 60 показује Мајкелсонов интерферометар који се састоји од долазног снопа инфрацрвеног светла (извора) и два огледала.



Слика 60. Употреба интерферометра за мерење FTIR интерферограма

Једно од тих огледала је фиксирано док се остала покрећу напред-назад, тако да сноп напушта раздвајач зрака ка детектору, конструктивног и деструктивног утицаја свих таласних дужина истовремено. Положај покретног огледала омогућава континуирано бележење интензитета на детектору и на тај начин да се региструју као функција удаљености огледала.

Померање огледала се изводи познатом брзином, и формира се сигнал у временском домену. Инфрацрвени спектар је најкориснији када се приказује у фреквентном домену, тако да је x -оса спектра изражена у таласним бројевима (фреквенција).

Различити режими рада FTIR спектрометра дати су у Прилогу 1 (Поглавље 4.5. Режими рада FTIR спектрометра)

5.6. Опто – магнетна имицинг спектроскопија

5.6.1. Основни принципи

Тешко је рећи када је и ко први уочио да и светлост има посебна својства у правцима управним на кретање, односно да је извршио анализу лонгитудиналног и трансферзалног таласног кретања светлости.

Основне идеје могу се наћи код Њутна (Isaac Newton, 1642-1727), и Брустера (David Brewster, 1781-1868), али засигурно је Фреснел (Augustin - Jean Fresnel, 1788-1827) са основним објашњењима 1817 и 1821. године открио поларизацију светлости, а тиме и њена својства у правцима управним на правац њеног простирања [139].

Светлост је електромагнетни феномен и састоји се од два спрегнута таласа електричног и магнетног, који су међусобно управни, и који се под одређеним условима могу раздвојити (поларизовати). Поларизација светлости дешава се у интеракцији светлости са материјом под одређеним углом, као на пример, са углађеним површинама прозрних тела или пролазу светлости кроз неке кристале. Поларизација светлости у зависности од услова може бити веома сложена појава. Тако на пример, када се добија светлост, чији се вектор обрће око правца зрака у равни која је управна на зрак, и при томе периодично мења свој интензитет тада кажемо да је светлост елиптично поларизована. Када не долази до промене интензитета тада се добија кружна поларизована светлост. Међутим, када светлосни вектор не врши ротацију већ се само мења по интензитету у једном правцу тада кажемо да је светлост линеарно поларизована.

Код линеарно поларизоване светлости поларизациона раван светлосног таласа се поклапа са правцем магнетног вектора светлосног зрака који је управан на правац простирања зрака.

Ако се неки узорак осветли поларизованом светлошћу тада ће доћи до интеракције електричне компоненте светлости са материјом узорка. Могу се мерити рефлектоване

и/или апсорбоване особине испитиваног узорка на бази екцитације електричне компоненте светлости.

Како узорак поседује електрична и магнетна својства то ће рефлектована светлост бити електромагнетне природе изазвана електричном компонентом светлости. Међутим, ако узорак од датог материјала екцитирамо светлости под тачно одређеним углом тзв. Брустеровим углом, тада ће сам узорак извршити поларизацију светлости. Рефлектована светлост имаће само електричну компоненту у лонгитудиналном таласу, а магнетну компоненту у трансферзалном таласу (управним на лонгитудинални), односно својства узорка на бази електричног стања површине. На тај начин на бази светлости може се доћи од електричних особина материјала.

Опто-магнетна имицинг спектроскопија (Опто-магнетни фингерпринт) је заснована на електромагнетним својствима материје (ковалентне везе, водоничне везе, интеракције јона, електрона, ван дер Валсове интеракције) и интеракцији светлости и материје [105, 140], односно на односу електричних и магнетних сила ковалентних веза и интермолекуларних веза материје [141]. Ако се посматра ред величине електричних и магнетних сила, електричне силе су ближе класичној интеракцији (Кулонов закон), док је магнетна сила чак за 4 реда величине ближа по интензитету квантној интеракцији у односу на електричну [141]. С обзиром да је квантно стање материје примарно одговорно за конформационе промене на молекуларном нивоу, то значи да је много више вероватно да се детекција разлика између нпр. болесног и здравог ткива може добити мерењем њихових магнетних својстава, јер ће то дати већу осетљивост у односу на ниво осетљивости који се постиже мерењем електричних сила [142].

Развијени метод опто-магнетне имицинг спектроскопије заснован је на разлици између рефлексије узорка ексцитираног белом дифузном светлошћу и рефлексији узорка ексцитираног белом дифузном светлошћу под Брустеровим углом. Сваки материјал има специјалан Брустеров угао, при којем када је обасјан светлошћу, рефлектована светлост бива линеарно поларизирана. Налажењем разлике између рефлектоване беле светлости (електромагнетна својства) и рефлектоване поларизиране светлости (примарно

електрична компонента) добијају се магнетна својства материје узорка засноване на интеракцији светлости и материје.

Овај метод је до сада успешно коришћен у проучавању воде и водоничних веза [141], карактеризацији воде [143, 144] и у раној медицинској дијагностици [145].

5.7. Инструментација и опрема

5.7.1. вис – NIR спектроскопија

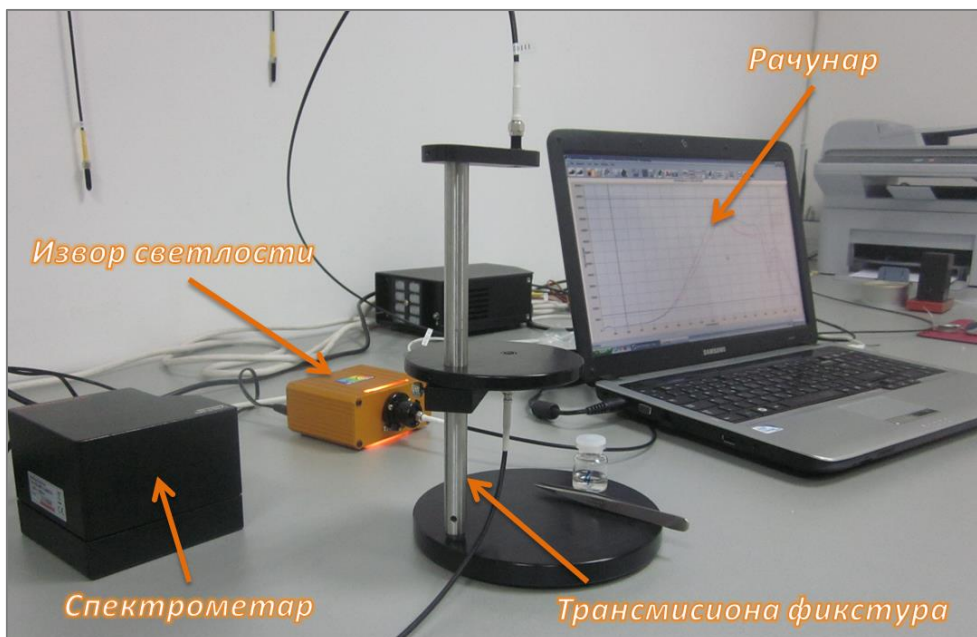
За испитивање у трансмитансном и рефлектансном моду, коришћен је вис/NIR мини спектрометар TM-VIS/NIR C10083CA, спектралне резолуције макс. 8nm, са изменљивим изворима светлости (беле LED диоде и волфрам халогнеска лампа). Као додатна опрема коришћена је рефлектансна сонда са подесивом фикстуром RPH3 (*Stellarnet, USA*). За трансмисиона мерења коришћена је трансмисиона фикстура TXF – 4 (*Stellarnet, USA*) са два колинеарна оптичка влакна.

За испитивања у апсорпционом моду коришћен је мини спектрометар TG-COOLED NIR-I C9913GC, спектралне резолуције макс. 7nm. Узорци су постављани у кварцну кивету оптичког пута 1mm.

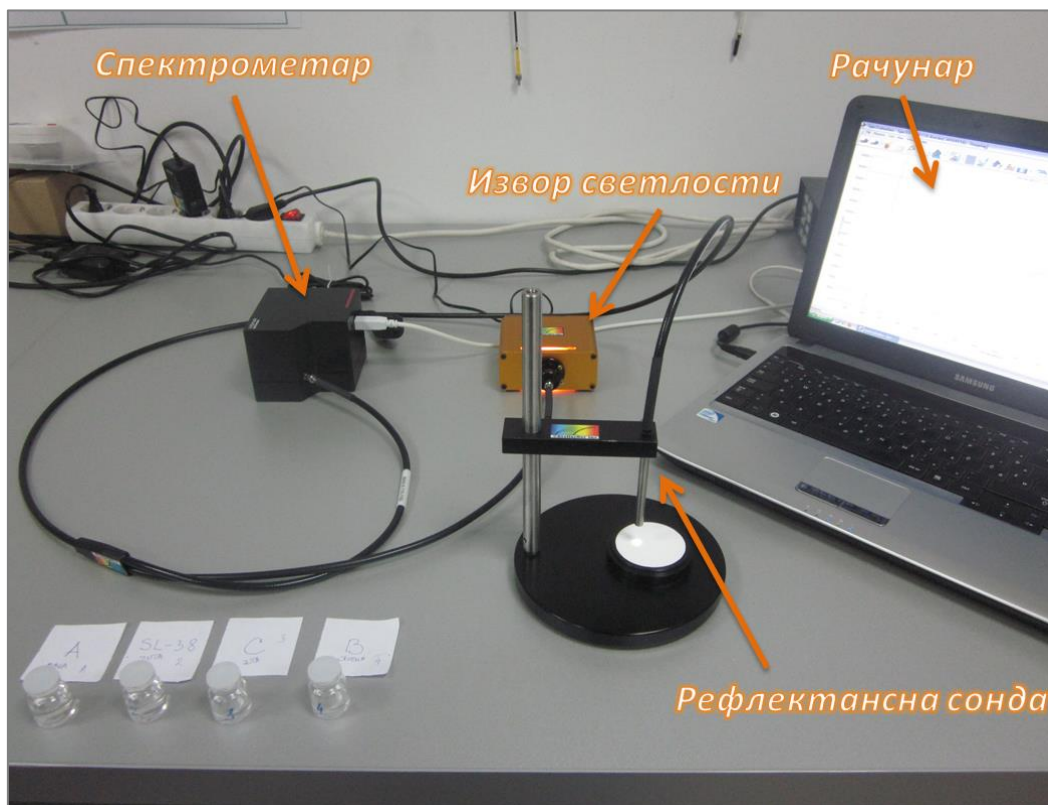
У табели 9, дати су основни подаци о коришћеним мини спектрометрима, а на сликама 60, 61 и 62 су представљене поставке експерименталних инсталација.

Табела 9. Опрема коришћена у истраживањима

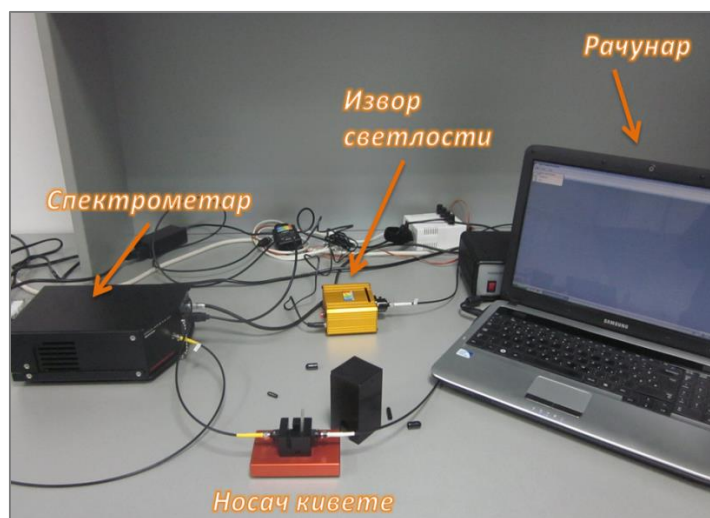
Рб.	Назив мерила и произвођач	Тип спектрометра	Опсег мерења
1.	Minispectrometer Hamamatsu	TM-VIS/NIR C10083CA	320-1000 nm
2.	Minispectrometer Hamamatsu	TG-COOLED NIR-I C9913GC	900-1700 nm



Слика 61. Експериментална поставка за транскусиону мерења, Нанолаб, Машински факултет у Београду



Слика 62. Експериментална поставка за рефлексивну мерења, Нанолаб, Машински факултет у Београду



Слика 63. Експериментална поставка за мерење апсорпције зрачења у блиском инфрацрвеном региону, Нанолаб, Машински факултет у Београду

5.7.1. Инструментација и опрема за снимање хиперспектралних слика

У сарадњи са Токијским Институтом за Технологију, вршена је анализа хиперспектралних слика са циљем примене у одређивању концентрације глукозе у крви коришћењем хиперспектралне слике коже. За потребе студије снимљено коришћене су две хиперспектралне камере, чије су карактеристике дате у Табели 10. Схема експерименталне инсталације је приказана на слици 64.

Табела 10. Карактеристике хиперспектралних сензора

Сензор	VNIR	SWIR
Спектрални опсег	400-1000nm	950-1700nm
Спектрална резолуција	5nm	5nm
Спектрални канали	121	320
Просторни пиксели	484pixel	240pixel



Слика 64. Схема експерименталне инсталације, HSI lab, TiTech, Tokyo

Пре обраде, извршено је препроцесирање у виду нормализације података, тако што је вршено дељење са хиперспектралном сликом стандард белог за рефлектансу, и након тога примењено је осредњавање спектра коришћењем медиан филтера ради уклањања шума. Рефлектанса по сваком пикселу добијене слике тако износи:

$$R_{\lambda} = \text{median}\left(\frac{R_{\lambda}}{R_{\text{white}}}\right).$$

5.7.2. Инструментација и опрема за FTIR спектроскопију

У раду је коришћен уређај Perkin Elmer FTIR Spotlight 400 (слика 65), микроскоп са спектрометром. Као помоћни уређаји, коришћен је ATR додатак и оптичка влакна. ATR додатак је коришћен за сва мерења глукозе у праху, као и водене растворе глукозе, резолуција снимања је 4cm^{-1} , један снимљени спектар добијен је осредњавањем 4 спектара. Оптичка влакна, коришћена су за *in vivo* мерења (резолуција снимања 4cm^{-1} , један снимљени спектар добијен осредњавањем 4 спектара). Приказ *in vivo* снимања дат је на слици 66.



Слика 65. Perkin Elmer FTIR Spotlight 400, Нанолаб, Машински факултет у Београду



Слика 66. Аквизиција спектара приликом *in vivo* истраживања

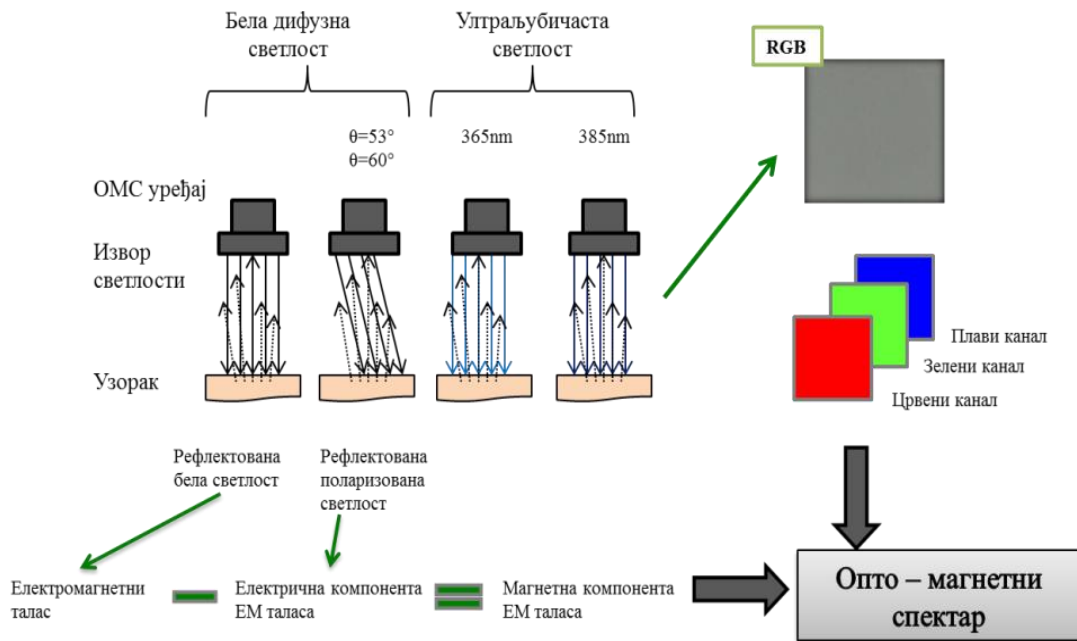
5.7.1. Инструментација и опрема за опто-магнетну имицинг спектроскопију

За потребе опто-магнетних спектроскопских испитивања коришћена су 3 типа уређаја: WP-B53, WP-B60, WP-B53-2UV (приказан на слици 67).

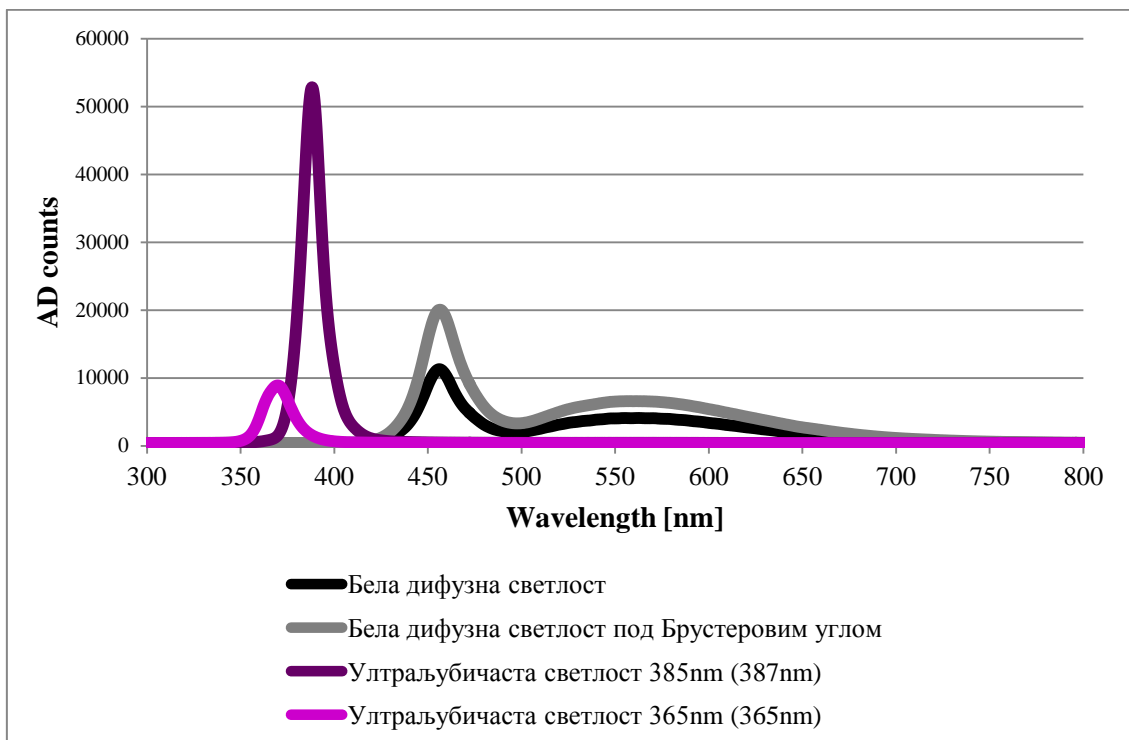


Слика 67. Предња и задња страна уређаја WP-B53-2UV, са назначеним основним деловима. Разлика у кућиштима уређаја WP-B53, WP-B60, и WP-B53-2UV је само у томе што имају дуални прекидач (са две позиције) за измену осветљења са белог дифузног светла у бело дифузно светло под Брустеровим углом, док је код уређаја приказаног на слици прекидач са 4 позиције, који омогућује још промену два осветљења у ултраљубичастој области.

Принципијелна шема рада уређаја приказана је на слици 68. За све уређаје заједничко је коришћење једног типа стандардног дигиталног фотоапарата Canon IXUS 105, Canon Inc. Сваки уређај има посебно израђено кућиште у које се поставља дигитални фотоапарат, а које омогућује различите врсте осветљења узорка. Коришћена су следећа осветљења: бело дифузно светло (ознака W), бело дифузно светло које под одређеним углом осветљава узорак или изабрано место од интереса (ознака P), и ултраљубичасто светло (ознака 2UV, номинално таласних дужина 365nm и 385nm). Спектралне карактеристике сваког од ових осветљења дате су на слици 69.



Слика 68. Принципијелна схема рада уређаја за аквизицију дигиталних фотографија узорака опто-магнетном методом.



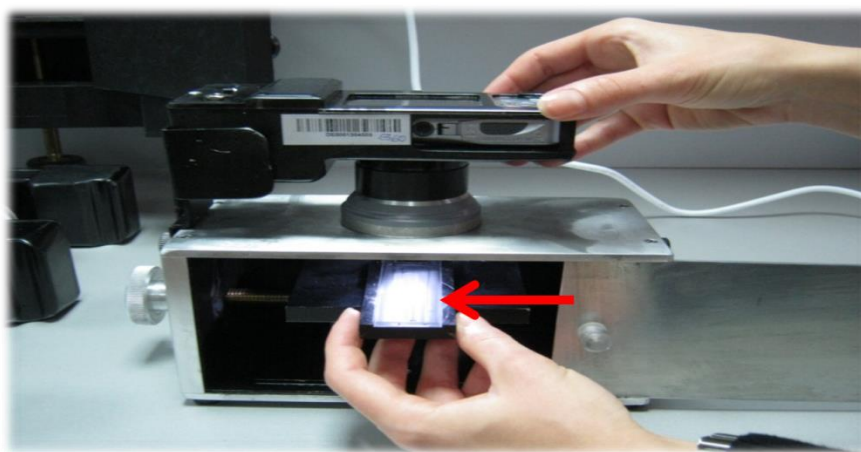
Слика 69. Спектрална карактеристика LED диода које обезбеђују белу дифузну светлост и ултраљубичасту светлост у уређајима за опто-магнетну спектроскопију

Упадно светло које долази под углом θ је дифузно, неполаризовано, а угао θ се бира између 0° и 90° тако да светлост ступа у интеракцију са различитим структурним елементима узорка, с обзиром да угао под којим светлост пада на узорак утиче на дубину пенетрације светлости.

За сврху истраживања ове дисертације изабране су две вредности угла θ , 53° и 60° . Ови углови представљају Брустерове углове за вода-ваздух и глукоза-ваздух граничну површину.

Пречник видног поља за све уређаје је подесив, али у у овом случају је изабран да износи 25mm.

За различите потребе снимања развијена је и додатна опрема, тако да се уређај може позиционирати и бити потпуно стационаран (Слика 70). Опрема за стационирање OMIS уређаја састоји се од црне, потпуно затворене кутије, на чијој горњој страни се преко навојне везе учвршћује кућиште са фотоапаратом, док се узорак на микроскопској плочици или Петријевој шољи поставља на платформу подесиве висине унутар црне кутије. На тај начин узорак је потпуно заштићен од спољних утицаја, и изолован од спољних извора светлости.



Слика 70. Уређај за опто-магнетну спектроскопију – фиксна позиција на црној кутији у коју се поставља узорак, Нанолаб, Машински факултет у Београду

OMIS уређај је првенствено намењен да се користи држањем у руци и прислањањем на место мерења изабрано на телу, у овом случају на доњу страну подлактице, непосредно изнад ручног зглоба (Слика 71).

5.7.2. Процедура аквизиције опто-магнетних фотографија

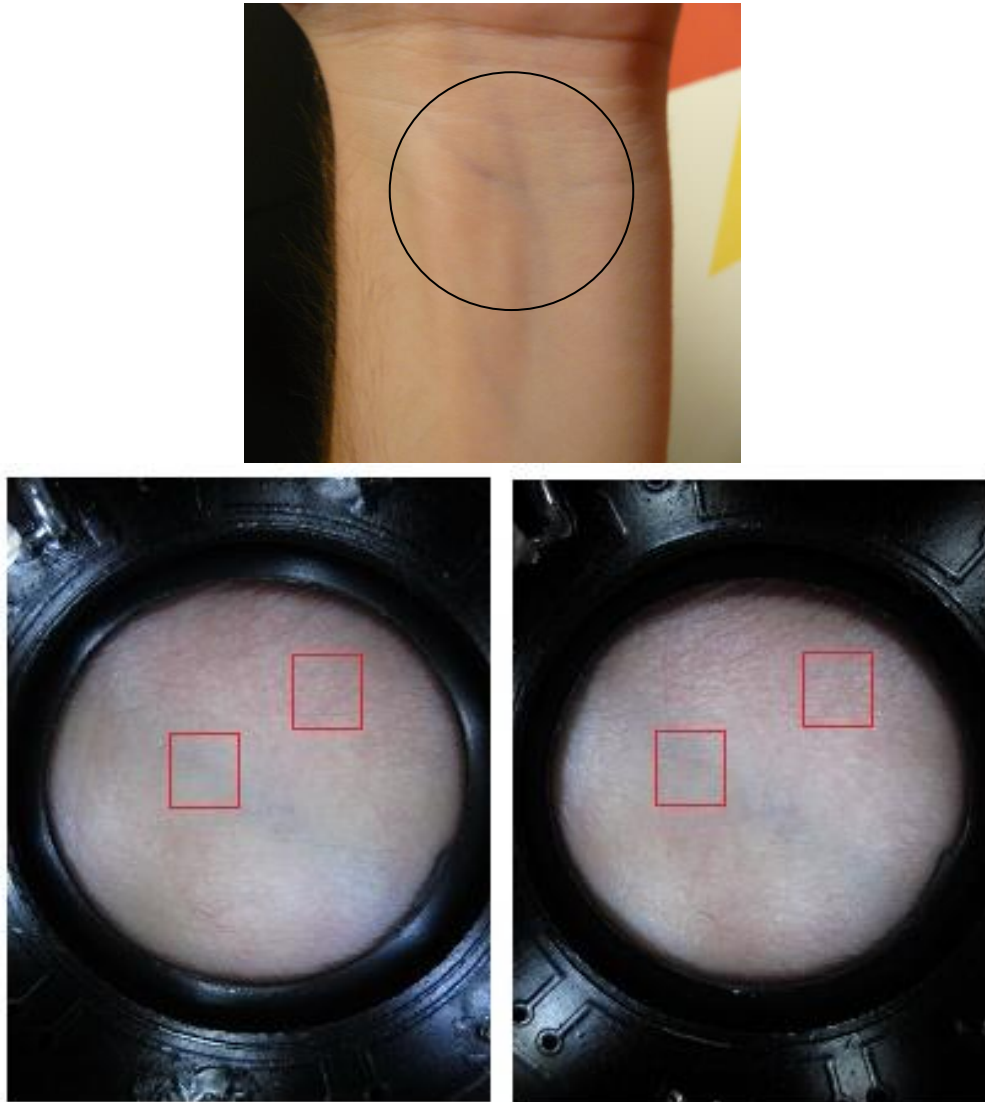
Процедура аквизиције опто-магнетних фотографија започиње одабиром узорка и у зависности од типа узорка (место на људском телу или ексцизирано ткиво) бира се да ли ће се OMIS уређај користити држањем у руци или се позиционирати на затворену црну кутију.

На слици 71, приказано је изабрано место мерења на људском телу – кожа на подлактици изнад ручног зглоба. Визуелним прегледом тражи се место на којем су уочљиви крвни судови и на то место се прислања уређај ради аквизиције дигиталних фотографија. Тип осветљења се мења помоћу прекидача на кућишту (слика 67), и када се подеси осветљење узима се фотографија места мерења. Затим се осветљење мења и поново се прави нова фотографија. У случају апарата WP-B53 и WP-B60, два пута се мења осветљење и после сваке промене осветљења врши се аквизиција фотографије. Код уређаја WP-B53-2UV, осветљење се мења 4 пута и узима дигитална фотографија узорка при сваком осветљењу.

Уређаји WP-B53 и WP-B60 користе се за узимање по две дигиталне фотографије узорка – једне у белој дифузној светлости, друге у белој поларизованој светлости. Ради једноставности слика добијена рефлексijом белог дифузног осветљења назива се „бела“, док се слика добијена рефлексijом белог дифузног осветљења под Брустеровим углом, назива „поларизована“.

За развијање опто – магнетног спектра узорка довољан је један пар ових дигиталних фотографија – 1 беле и 1 поларизоване. Процедура се може поновити жељени број пута. Минимално се узима 5 парова фотографија по једном узорку. Овај пар дигиталних фотографија служи као извор информација о електромагнетним (бела) и електричним

својствима (поларизована) узорка. Последично, одузимањем поларизоване фотографије од беле, могу се добити и магнетна својства узорка.



Слика 71. Изабрано место мерења на руци испитаника obeжено је црним кругом (горе). Дигиталне фотографијекоже испитаника – под белим дифузним светлом и под белим дифузним светлом под Брустеровим углом (доле лево и доле десно, респективно). Црвени квадрати представљају исецане делове фотографије на којима је издвојено место на којем се види крвни суд и на којем се види само кожа. Ови исецани делови дигиталне фотографије коришћени су у даљој обради.

Уређај WP-B53-2UV, поред овог пара фотографија даје још један пар фотографија, које се анализирају посебно – једне у љубичастој светлости на 365 nm, и друге на 385 nm.

Добијене фотографије су у *jpeg* формату и захтевају накнадну обраду. Између снимања различитих узорака, пожељно је направити макро фотографију места снимања или уколико су у питању различити испитаници, направити фотографију испитаника.

Овај поступак служи за лакше раздвајање фотографија које припадају узорцима. Процедура за стационарна снимања је иста, само што се пре фотографисања, узорак (кап крви, ткиво, раствор глукозе исл) поставља на микроскопску плочицу или у Петријеву шољу и поставља унутар црне кутије на коју је позициониран одговарајући апарат.

5.7.3. Обрада дигиталне фотографије и конволуција опто-магнетних спектра

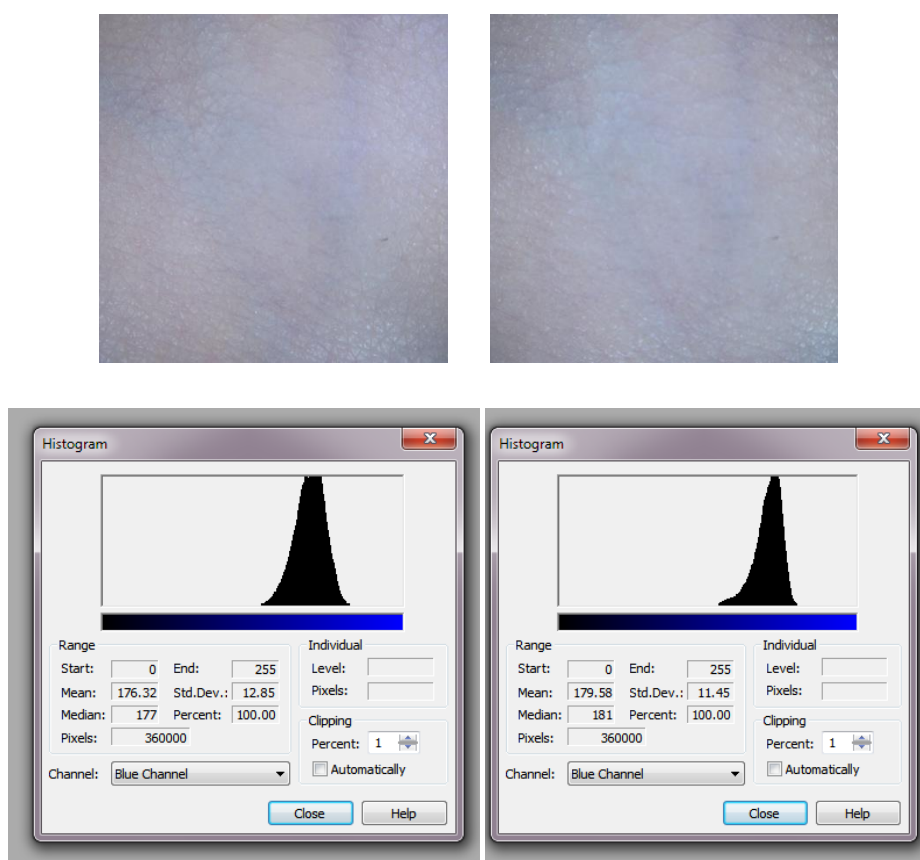
Након извршене аквизиције, дигиталне фотографије се пребацују на рачунар, дигиталне фотографије се распоређују у одговарајуће именоване фолдере и врши се обрада слике.

Прва обрада подразумева подешавање резолуције и величине слика узорка у графичком програму намењеном за обраду дигиталних фотографија - *Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc, California, USA)*. За потребе обраде фотографије у овом раду коришћене су верзије *Adobe Photoshop CS4* и *CS5*.

Резолуција сваке фотографије се мења на 300 пиксела по инчу, и затим се подешава величина фотографије на 1600x1200 пиксела. Затим се у случају да је у питању узорак људска кожа, врши исецање одређених делова фотографије – део који садржи крвни суд, и део на којем се види само кожа. Величина исечених делова фотографије мора бити иста за све узорке који се посматрају заједно, и таква да величина новонастале слике не буде мања од 300 x300 пиксела. На слици 72, може се видети пример исечених делова фотографије са крвним судом за узорак приказан на слици 71. Мора се водити рачуна, да исечени део фотографије буде апсолутно на истој позицији и исте величине за слике у свим осветљењима. Ово се постиже снимањем поступака при обради прве фотографије и понављањем снимљене акције на свим другим фотографијама, што је

аутоматизован процес у самом програму. Исечени делови фотографије снимају се као посебне фотографије у адекватно припремљене и назване нове фолдере.

Овако припремљене фотографије се даље обрађују у програму *MATLAB* (*MathWorks, Inc., Massachusetts, USA*). За поступак обраде фотографије и израде спектра написан је посебан програмски код [105], који је уз одређене измене коришћен и за потребе овог истраживања.



Слика 72. Хистограми за плави канал беле и поларизоване фотографије (Софтвер Corel Photo Paint)

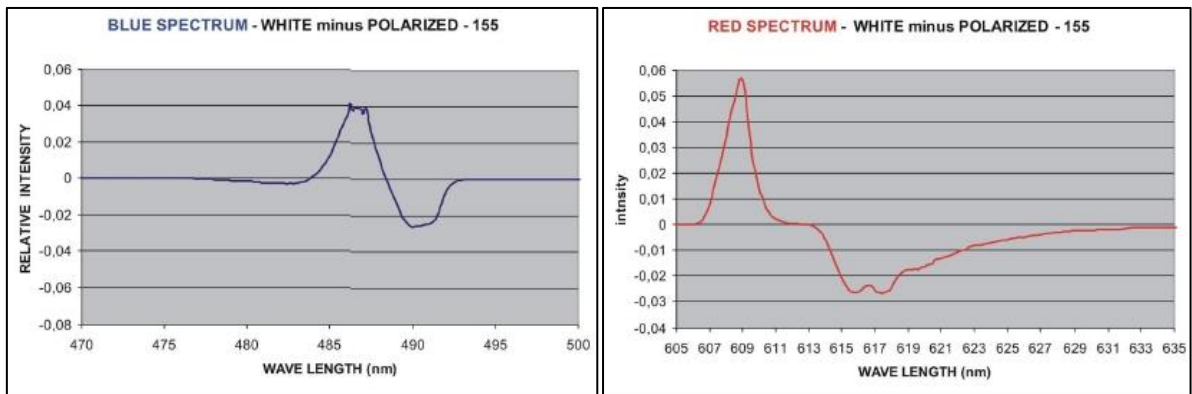
Програм прво дигиталну фотографију претвара у RGB хистограм. RGB дигитална фотографија има три канала боја: црвени, зелени и плави. Сваки од ова три канала може да се издвоји и анализира посебно. За пар фотографија (беле и поларизоване) са слике 72, дати су примери хистограма за плави канал боја.

Програмски код на сличан начин, генерише хистограм за сваки канал. Хистограми су даље корелисани према специфичној скали таласних дужина, тако да сваком каналу боја, односно сваком хистограму одговара један спектар.

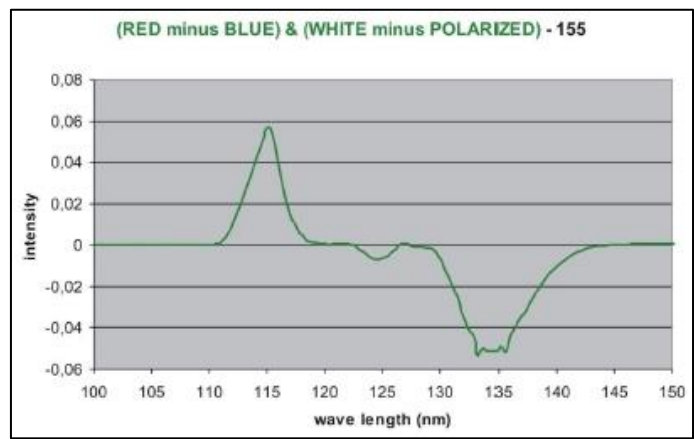
Тако настали спектри се даље математички комбинују зарад добијања информација од интереса. У првом кораку, спектар плавог канала за белу фотографију одузима се од спектра плавог канала за поларизовану фотографију. У наредном кораку, исти поступак се врши за зелени и црвени канал. Потом се врше конволуције, односно математичко комбиновање насталих спектра: одузимање резултујућег плавог спектра за пар беле и поларизоване фотографије од резултујућег композитног спектра црвеног канала, одузимање резултујућег зеленог спектра за пар беле и поларизоване фотографије од резултујућег композитног спектра црвеног канала, и одузимање резултујућег плавог спектра за пар беле и поларизоване фотографије од резултујућег композитног спектра зеленог канала. Овај процес илустрован је на сликама 73 и 74. Треба напоменути да су на сликама приказани скраћени региони, ради бољег визуалног приказа, иначе пун опсег износи за плави канал од 400nm до 500nm, односно на црвени од 600 до 700nm.

Разлог оваквом одузимању спектра лежи у чињеници да светлост различитих таласних дужина има различиту дубину пенетрације у ткиво (слика 75, 76). Тако светлост плаве боје, односно таласних дужина који одговарају региону од 400 nm до 700nm, продире у кожу само до дубине од 1-2 mm . За разлику од плаве, црвена светлост, односно светлост таласних дужина од 650 nm – 1000 nm продире знатно дубље у ткиво, и долази до структура богатих крвних судовима. У зависности од дубине пенетрације светлости, рефлектована светлост ће носити информацију о структурама на различитим дубинама ткива. Црвени канал тако има информацију о дубљим структурама у кожи, док плави канал о плитком површинском слоју.

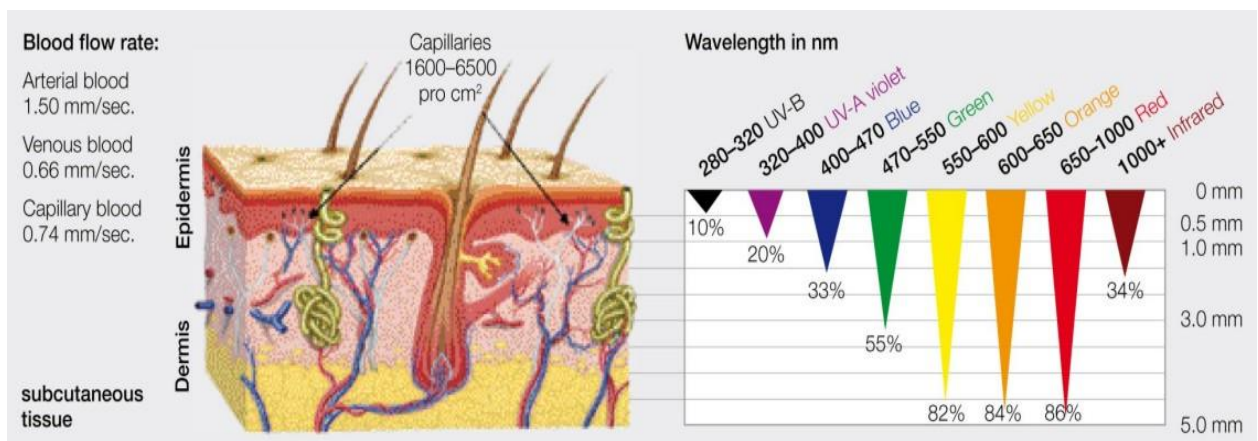
Приликом конволуције спектра, користи се математички систем заснован на апроксимацији Максвелове потковице, и зато је у резултату хоризонтална оса именована као *Разлика таласних дужина* и јединице мере су нанометри.



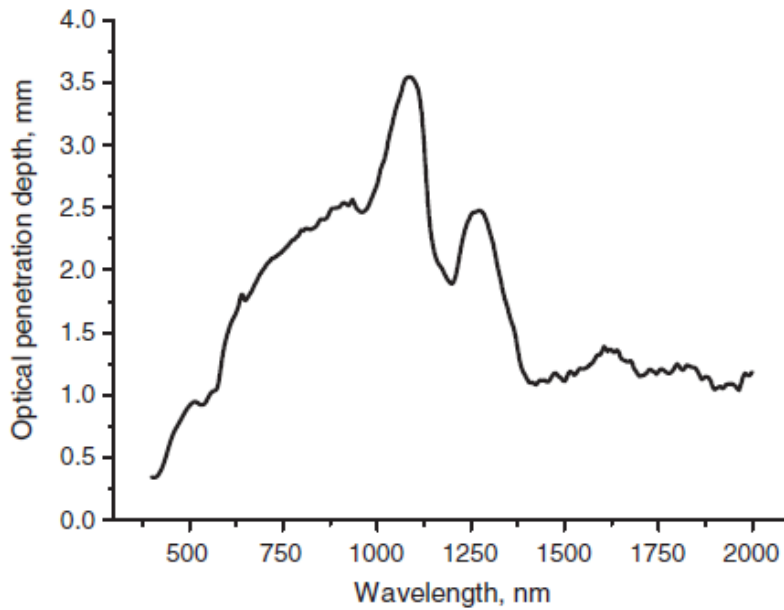
Слика 73. Спектри плавог и црвеног канала за пар дигиталних фотографија коже у белој дифузној и белој поларизованој светлости



Слика 74. Конволутивни спектар црвеног и плавог канала – јединствени „фингерпринт“ узорка



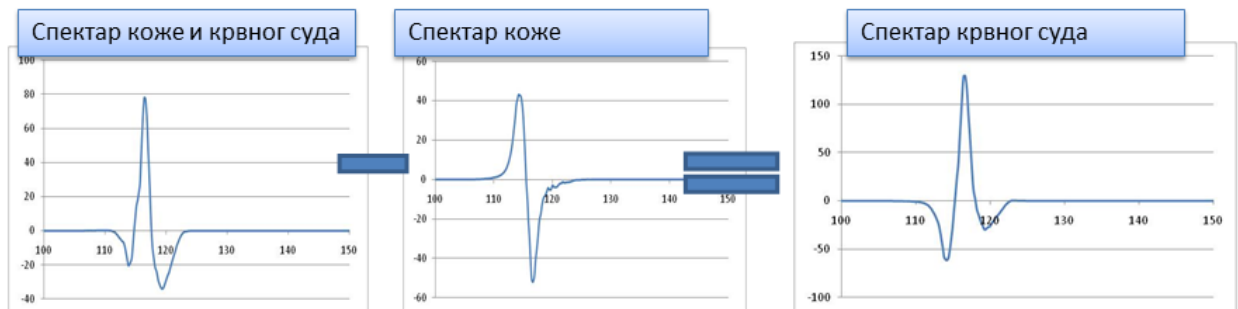
Слика 75. Дубина пенетрације у кожу светлости различитих таласних дужина [145]



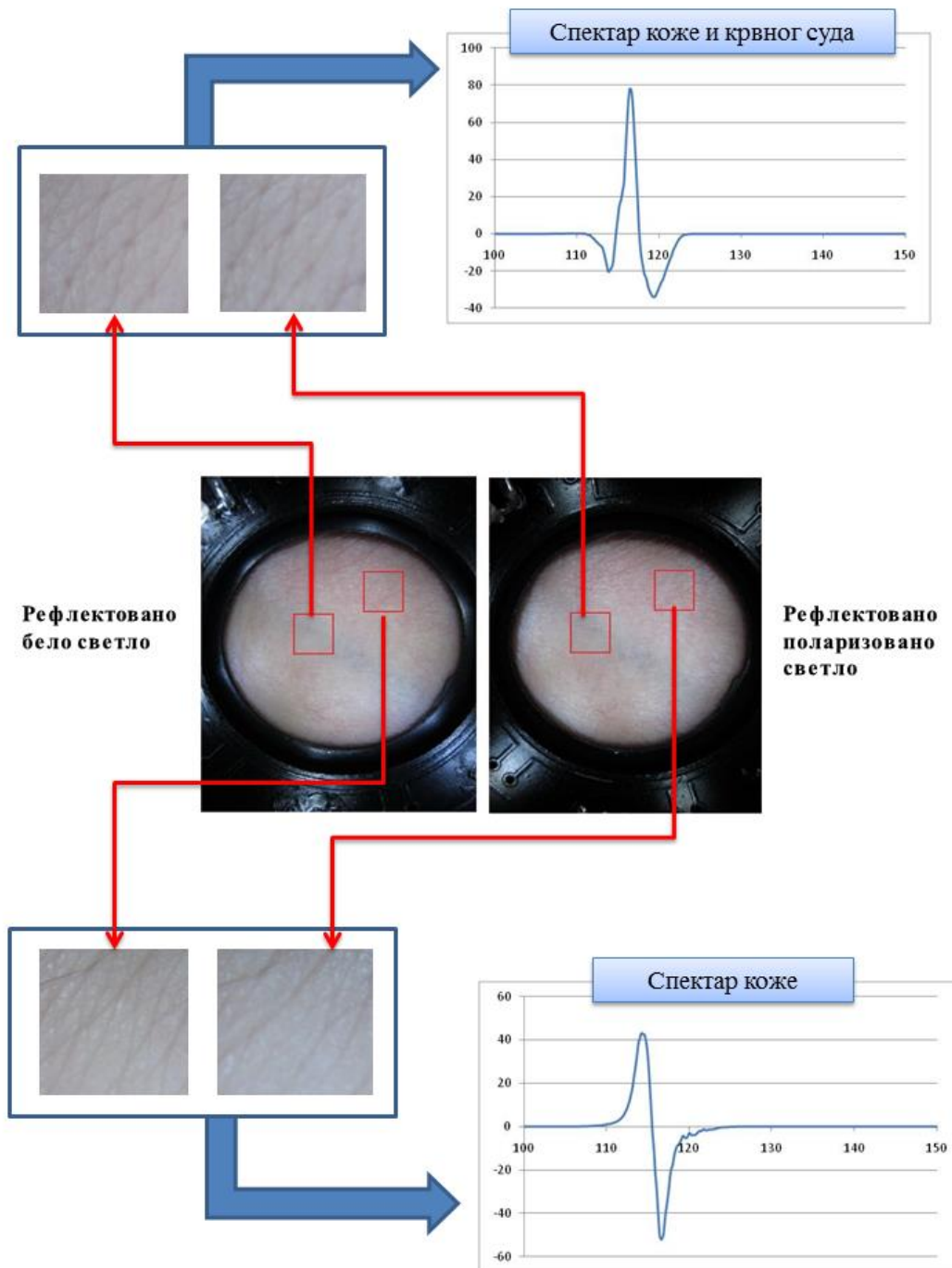
Слика 76. Дубина оптичке пенетрације светлости δ у кожу у опсегу од 400 – 2000nm [146]

Овако добијени спектри даље се обрађују применом метода мултиваријационе анализе.

У циљу уклањања утицаја оптичких карактеристика саме коже испитаника, вршено је одузимање спектра коже од спектра крвног суда и коже (илустровано на сликама 77 и 78). На тај начин се у резултујућем спектру добијају само карактеристике крвног суда.



Слика 77. Уклањање утицаја оптичких карактеристика коже и добијање спектра крвног суда методом опто-магнетне имидинг спектроскопије



Слика 78. Схематски приказ процедуре добијања спектра коже са видљивим крвним судом, затим спектра саме коже и најзад, одузимањем спектра коже од спектра коже са видљивим крвним судом добија се спектар само крвног суда

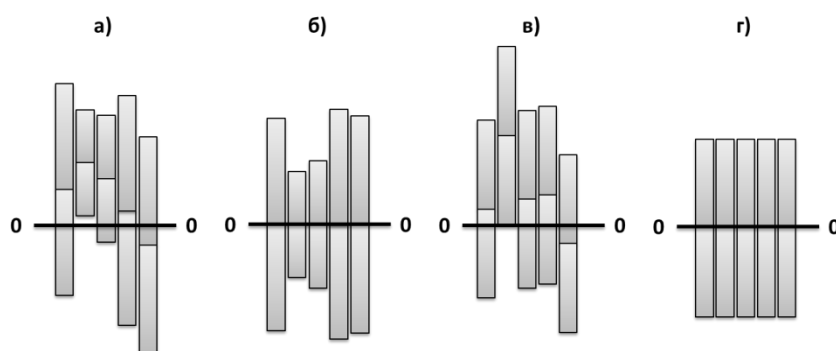
5.8. Обрада спектралних података

5.8.1. Препроцесирање и филтрирање

У обради спектралних података (хеометрији), скоро увек је неопходно и пожељно да се изврши нека врста почетне обраде, односно препроцесирање аквизираних спектра. Првобитно добиени спектри са инструментима називају се сирови спектри (*raw spectra*).

Циљ препроцесирања је побољшање спектралних карактеристика анализата од интереса, а да се ефективно потисну или елиминишу нежељене карактеристике.

Најједноставнија форма препроцесирања је издвајање појединих таласних дужина из спектра или одређених спектралних региона. Најчешће процедуре препроцесирања укључују осредњавање, скалирање варијансом и деривирање. Осредњавање представља одузимање средње вредности скупа спектра од сваког индивидуалног спектра. Скалирање варијансом врши се тако што се најпре одређује стандардна девијација спектра на свакој таласној дужини, и потом се сви спектри поделе псеудоспектром стандардних девијација, тако да варијанса буде заједничка на свим таласним дужинама. Деривација спектра се користи за отклањање случајних флукуација базне линије спектра (први дериватив) и нагиба (други дериватив)[116].



Слика 79. Препроцесирање података. Подаци за сваку променљиву представљени су преко њене средње вредности и варијансе: а) Просечан изглед већине сирових података, б) Резултат након осредњавања, в) Резултата након скалирања варијансом, г) Резултат након осредњавања и скалирања варијансом (на основу [147])

5.8.2. Парцијална регресија методом најмањих квадрата (*PLSR – Partial Least Squares Regression*)

Парцијална регресија методом најмањих квадрата [147, 148] је билинеарна калибрациона метода која проналази линеарни регресиони модел путем пројекције предвиђених варијабли и директно измерених варијабли у нови димензиони простор. Резултујући модел има само неколико димензија (углавном 5 до 15 тежинских вектора) које су довољне да обезбеде квантификацију жељене варијабле на основу спектра.

Основна карактеристика овог приступа је замена сваког спектра сумом псеудоспектра, тј. Такозваних тежинских вектора. Сваки спектар је тако представљен преко јединственог скупа скорова (scores) – односно скупа коефицијената потребних да се оригинални спектар реконструише из тежинских вектора. На тај начин се оригинални спектар који се састоји од стотина и хиљада вредности апсорбансе (или трансмитансе исл.) димензионо редукује на свега 5 до 15 тежинских вектора [116]. Скорови представљају основу за квантификацију тражене променљиве (на пример, концентрације глукозе која се жели наћи на основу снимљених спектра крви, серума, исл.).

Постоје бројни алгоритми за развој *PLSR* параметара, сви они дефинишу концентрацију анализата Y као резултат матрице спектра X помножене са коефицијентима регресионе матрице B , односно:

$$Y = XB + E, \quad (1)$$

где су:

- Y - Матрица концентрација
- X - Матрица спектра
- B - Скуп регресионих коефицијената
- E - Матрица грешака.

Углавном су пре приступања парцијалној линеарној регресији, X и Y на неки начин препроцесирани. Затим се врши декомпозиција сваке варијабле у њен скор и латентне варијабле T и Q , изабране тако да је постоји снажна корелација између њихових скорова [149]:

$$X = T \cdot W^{-1}, \quad (2)$$

Где су:

- X - Матрица спектра
- T - Матрица скорова X
- W - Матрица тежинских вектора X .

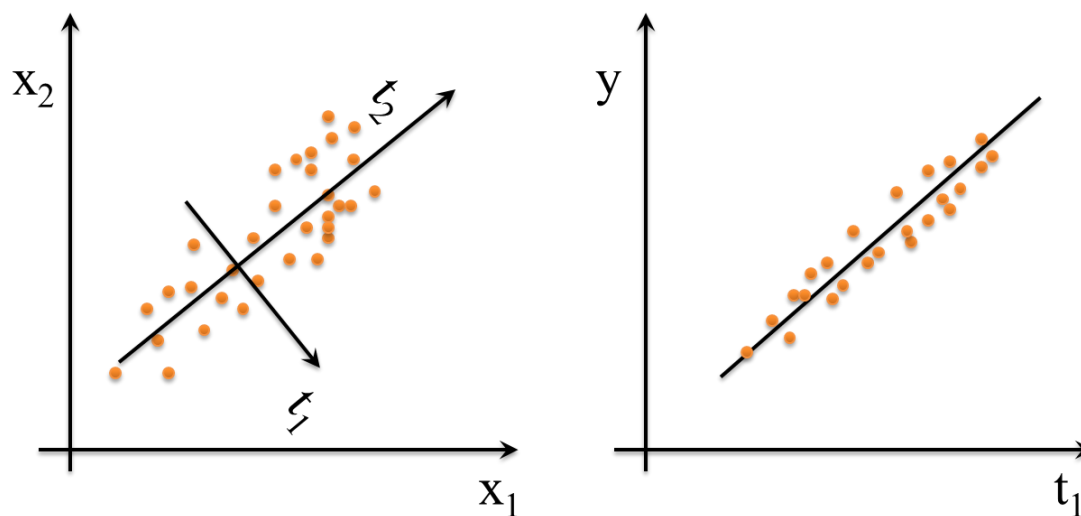
Тада је тражена матрица концентрација:

$$Y = T \cdot Q + E, \quad (3)$$

Где су:

- Y - Матрица концентрација
- T - Матрица скорова X
- Q - Матрица тежинских вектора Y .

На слици 80, дат је пример принципа редукције димензионалности у парцијалној линеарној регресији.



Слика 80. Пример PLSR редукције димензионалности где t_1 замењује x_1 и x_2 с обзиром да се они налазе у снажној корелацији

Скуп променљивих, у којем се могу уочити две снажно корелисане варијабле x_1 и x_2 може бити замењен са два ортогонална фактора (латентна вектора) t_1 и t_2 који су линеарна комбинација оригиналних променљивих x_1 и x_2 . Оваква процедура замењивања лежи у основи редукције димензионалности почетног скупа спектралних података.

Предикција се врши преко скупа коефицијената регресије B , тако да се директно повезују матрица X и Y :

$$B = W \cdot Q, \quad (4)$$

Где су:

- B - Скуп регресионих коефицијената
- W - Матрица тежинских вектора X
- Q - Матрица тежинских вектора Y .

За нови скуп спектра, непознате концентрације X_{test} , концентрација Y_{pred} се предвиђа на основу једначине:

$$Y_{pred} = X_{test} \cdot B, \quad (5)$$

Где су:

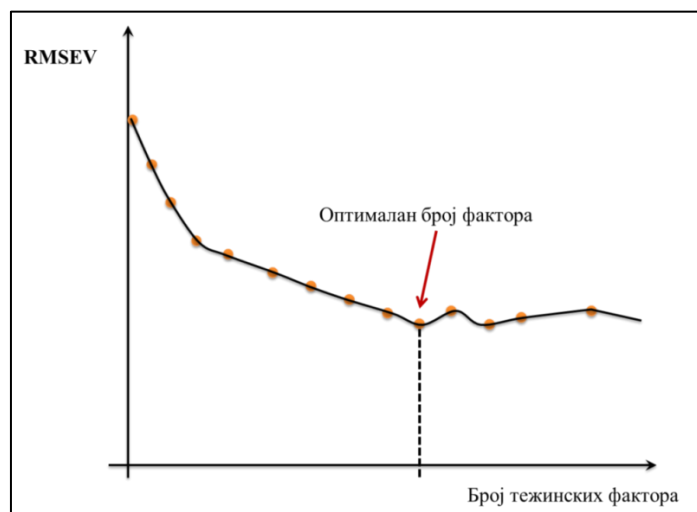
- Y_{pred} - Предвиђена (израчуната концентрација) матрица концентрације
- X_{test} - Матрица нових спектара
- B - Скуп регресионих коефицијената.

Из израза (5) се види да је скуп регресионих коефицијената од пресудног значаја за добијање валидних резултата у будућим предвиђањима. До овог скупа података се долази кроз процес калибрације модела.

Да би се дошло до поузданог модела, пре предикције се врши тренинг или обучавање модела. У овој фази тренирања, користи се велики скуп података (спектара) који покрива што је могуће већи и детаљнији распон концентрације анализата од интереса, и парцијална регресија се врши над овим скупом. У овом процесу се избацују сви они спектри и концентрације које много одступају од скупа. Овакви подаци се називају оутлајери (*outlier*). Појава оутлајера је сасвим нормална, и део стандардне процедуре приликом калибрације је избацивање оваквих вредности које настају услед различитих врста грешака приликом аквизиције спектара и слично. Међутим, требало би увек, пре избацивања оутлајера проучити услед чега је могло доћи до таквог одступања спектра. Валидација предикционих могућности PLSR модела је неопходна да би се утврдила прецизност развијеног модела. За валидацију се користи независни тест скуп чија величина треба да буде једнака бар четвртини тренираног скупа. Једна од најбољих опција за тренирање скупа је коришћење метода унакрсне валидације (*cross - validation*) у којој се за тестирање користе подаци управо из тренинг сета, тако што се кроз процес итерације сваки податак из скупа по једном избацује и користи за тестирање, док се модел прави на преосталим подацима, процес се понавља док сваки податак из скупа није тестиран.

Одређивање оптималног броја тежинских фактора је важан корак у развоју модела. Уколико се узме велики број фактора модел може савршено да одговара подацима, али

ће правити грешке приликом предикције нових података (*model over-fitting*), такође узимањем великог броја фактора у модел се уграђује и шум. С друге стране узимање сувише малог броја фактора може водити системским грешкама.



Слика 81. Одређивање оптималног броја тежинских фактора у регресионом моделу

Као показатељ оптималног броја фактора користи се вредност корена средње квадратне грешке валидације:

$$RMSEV = \sqrt{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (Y_{test} - Y_{pred})^2}, \quad (6)$$

где су:

- RMSEV – корен средње квадратне грешке валидације
- Y_{test} – оригинална матрица вредности концентрације (тачне, референтне вредности)
- Y_{pred} – матрица предикционих (предвиђених) вредности концентрације.

Када ова грешка достигне минимум, сматра се да не треба узимати више тежинских фактора, тј. да је постигнут оптималан број (слика 81).

5.8.3. Софтвер и протокол мултиваријационе анализе

За хемометријску обраду података коришћен је софтвер *Pirouette (ver 4.0; Infometrics, Woodinville, WA, USA)*. Сви спектри су пре мултиваријационе анализе препроцесирани коришћењем различитих техника: заглађивање коришћењем Savitzky-Golay алгоритма, осредњавање, скалирање варијансом, скалирање распоном, као и први и други извод и др. у циљу проналажења оптималног решења за уклањање шума и појачавања сигнала глукозе. Парцијална регресија методом најмањих квадрата је вршена након сваког типа препроцесирања, и оптималан претходни третман је процењиван на основу величине грешке калибрације модела (RMSEC) и коефицијента регресије (r^2).

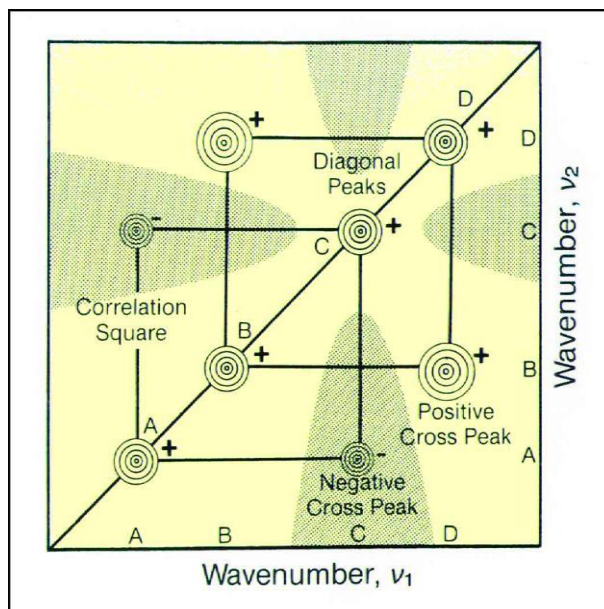
5.8.4. 2Д корелациона спектроскопска анализа

Генерализована 2Д корелациона спектроскопска анализа [150] извршена је уз помоћ развијеног софтвера *2Dshige©Version1.3. (Morita, 2005)*. Овај софтвер врши крос-корелациону анализу применом напредне Фуријеове трансформације на апсорпционе спектре. Излаз софтвера представљају корелационе мапе – асинхрона и синхрона (Слике 82 и 83).

На свакој корелационој мапи негативни пикови су означени као осенчени на контурној мапи, односно плавом бојом на колор мапи. Позитивни пикови су на контурној мапи означени без сенки, док се на колор мапи означавају црвеном бојом. Коришћење контурних или колор мапа је потпуно равноправно, зависи само од жеље корисника.

На синхроној мапи, интензитет сенке односно боје на пику одговара симултаним променама двеју варијација на различитим местима у спектру. Пикови лоцирани на дијагонали (аутопикови) су функција аутокорелације и они су увек позитивни. Уколико је интензитет аутопика јачи то значи да је та апсорпциона трака подложнија променама услед пертурбације примењене на посматрани систем. Пикови који су лоцирани ван дијагонале називају се крос-пикови и они могу бити позитивни и негативни. Позитиван знак значи да се промене на различитим апсорпционим тракама дешавају у истом смеру (на пример, апсорпција расте и на једном и на другом пику), док негативан знак значи

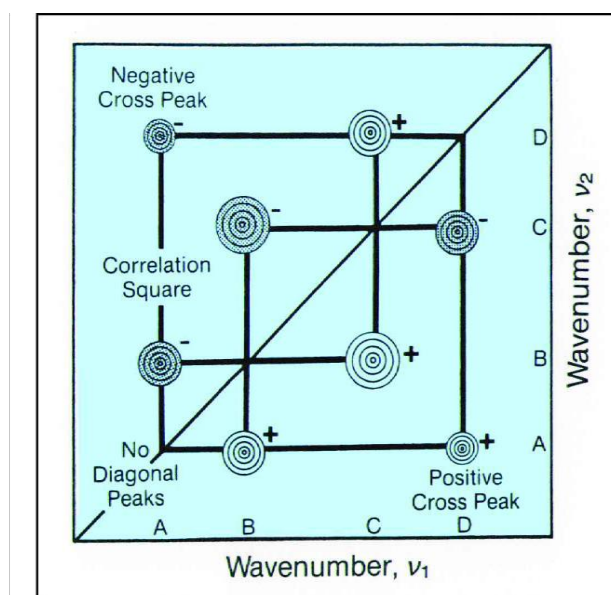
да се промене дешавају у супротном смеру (на једној апсорпционој траци расте, док на другој опада).



Слика 82.Схематска контурна мапа синхроног 2Д корелационог спектра

Пошто је синхрона мапа симетрична у односу на дијагоналу, обичај је да се анализирају само крос-пикови лоцирани на левој страни дијагонале.

На асинхроној мапи, интензитети одговарају секвенцијалним спектралним променама. На асинхронном спектру не постоје аутопикови, само се развијају крос-пикови када се промене у спектру дешавају са померајем у фази. Знак крос-пика одређује секвенцу: позитиван пик значи да се прво одвија догађај (спектрална промена) на x-оси, па онда промена на у-оси. Међутим, знак одговарајућег крос-пика у синхронном спектру се мора такође узети у обзир. Уколико је пик на синхронном спектру негативан, онда је секвенца догађаја обрнута.



Слика 83. Схематска контурна мапа асинхроног 2Д корелационог спектра

Ова правила која се називају Нодина правила су приказана у табели 11. Коришћењем ових правила могуће је утврдити секвенцу хемијских промена на основу знака крос-пикова на синхроним и асинхроним мапама.

Табела 11. Нодина правила [150]

Асинхрони крос-пик	Синхрони крос-пик	Секвенца
Позитиван (γ_1, γ_2)	Позитиван (γ_1, γ_2)	γ_1 варира пре γ_2
Позитиван (γ_1, γ_2)	Негативан (γ_1, γ_2)	γ_1 варира после γ_2
Негативан (γ_1, γ_2)	Позитиван (γ_1, γ_2)	γ_1 варира после γ_2
Негативан (γ_1, γ_2)	Негативан (γ_1, γ_2)	γ_1 варира пре γ_2

6. Протокол истраживања

6.1. Глукоза у чврстом стању

За снимања глукозе коришћена је глукоза у праху (*Sigma, Aldrich*), миниспектрометар TM-VIS/NIR C10083CA, Hamamatsu, Japan. Снимљено је укупно 100 спектра за стандард белог за рефлексiona мерења (*RS50, Stellarnet, USA*, рефлектује >97% 300-1700nm) и 100 спектра глукозе у праху. Резултујући рефлексioni спектар глукозе у праху добија се као однос спектра глукозе и спектра белог који даје тоталну рефлексiju по свим таласним дужинама, и изражава се у процентима.

6.2. Раствори глукозе у праху

Раствори глукозе припремљени су према процедури описаној у Прилогу 1 (Поглавље 2). Припремљени раствори остављени су преко ноћи да стоје на собној температури и заклоњени од светла. Пре аквизиције спектра, концентрације припремљених раствора проверене су коришћењем Accu Chek Active система и измерене концентрације приказане су у табели 12. У току аквизиције спектра, температура амбијента износила је 23,1°C, а влажност ваздуха 67%.

За вис – NIR методу, коришћена је кварцна кивета оптичког пута 1мм, а по сваком узорку снимљено је 10 спектра, што даје укупно 50 спектра.

За OMIS методу, снимано је по 3 пара фотографија (бела и поларизована) уређајима WP – B53 и WP – B60. По сваком узорку добија се по три опто-магнетна спектра, што укупно чини по једном уређају 15 спектра.

Табела 12. Номиналне вредности концентрације водених раствора глукозе у праху и измерене, стварне концентрације добијене помоћу Accu Chek Active система

Ред.бр.	Номинална концентрација раствора [mmol/l]	Измерена концентрација раствора помоћу Accu Chek Active [mmol/l]
1	5	4.2
2	10	9
3	15	12.5
4	20	16.3
5	25	18.9

За FTIR спектроскопију мерења су вршења у ATR моду, где се на ATR поставља врло мала количина воденог раствора глукозе (<10 μ l) и при сваком мерењу одабрана је резолуција од 4cm⁻¹, при чему је за добијање сваког спектра коришћено осредњавање на 16 спектара. Урађена су два експеримента при чему је као референца у првом експерименту коришћен ваздух, а у другом чиста вода, тј. Aqua Purificata. С обзиром да се није располагало адекватним мерним инструментом за концентрације глукозе у овом опсегу, провера реалних вредности концентрације глукозе није вршена.

Табела 13. Опсег вредности концентрације глукозе у воденим растворима за FTIR ATR мерења

Ред.бр.	Номинална концентрација раствора [mmol/l]	Ред.бр.	Номинална концентрација раствора [mmol/l]
1	5	7	25
2	7	8	50
3	10	9	100
4	15	10	250
5	18	11	500
6	20	12	1000

Додатна испитивања водених раствора глукозе коришћењем FTIR спектроскопије у ATR моду, урађена су за 11 различитих вредности концентрације глукозе, у распону од приближно 4- 30 mmol/l. На ATR се постављала врло мала количина воденог раствора глукозе (<10µl) и при сваком мерењу одабрана је резолуција од 4cm⁻¹, при чему је за добијање сваког спектра коришћено осредњавање на 4 спектра. Као референца узет је ваздух. Концентрације глукозе водених раствора проверене су Ассу Chek апаратом и дате су у табели 14.

Табела 14. Концентрације водених раствора глукозе коришћених у експерименту

Ред.број узорка	Концентрација глукозе [mmol/l]
1	4,2
2	5,9
3	9
4	9,7
5	11,5
6	12,4
7	15,6
8	15,7
9	17,5
10	19,6
11	27,8
12	30,6

6.3. Испитивања крви

6.3.1. *In vitro* Опто-магнетна имицинг спектроскопија – уређај В53

Укупно је снимљено 10 узорака крви испитаника. Узорак крви размазан је на стаклену микроскопску плочицу и сниман у затвореној мрачној комори. Од укупног броја испитаника 6 је било мушког пола, а 4 женског. По сваком испитанику узимано је 10 спектра, од којих је у даљој обради коришћена средња вредност.

Узорак крви узиман је у два наврата – непосредно пре и 1 сат након оброка са високим садржајем глукозе, при чему је мерена вредност гликемије стандардном методом.

Табела 15. Протокол испитивања опто-магнетном спектроскопијом на узорцима крви

Р.бр. испитаника	Година рођења	Пол	Концентрација глукозе (mmol/L)	
			Пре оброка	1h после оброка
1	1988	Ж	4.70	4.70
2	1988	М	4.80	5.00
3	1988	Ж	4.50	4.70
4	1988	Ж	4.80	4.70
5	1988	Ж	4.80	4.90
6	1987	М	5.00	4.70
7	1985	М	4.80	4.90
8	1986	М	4.80	4.80
9	1987	М	5.70	
10	1980	М	5.40	5.30

6.3.2. *In vitro* FTIR ATR

Укупно је снимљено 3 испитаника, 2 је било женског пола, а један испитаник мушког. Сваки испитаник је давао по кап капиларне крви из прста пре и после оброка са високим садржајем глукозе. Испитаници су били подрвгнути процедури мерења глукозе у крви, а затим је по кап крви наносена на АТР и вршена је аквизиција спектра. Спектри су снимљени са резолуцијом од 4cm^{-1} , узето је по 4 спектра, а спектар по једном мерењу је добијен осредњавањем 4 спектра.

6.4. *In vivo* испитивања – уређај B53-2UV

Укупно је снимљено 60 испитаника. Од укупног броја испитаника 32 је било мушког пола, 21 женског, а за 7 испитаника тај податак није доступан. Просечна старост испитаника износила је 45 година. По сваком испитанику узимано је 10 спектра, од којих је у даљој обради коришћена средња вредност. За обраду мултиваријационом анализом од опто-магнетних B53 спектра искоришћено је 59, док је за UV1(365nm) и UV2 (385nm) искоришћено 60 спектра.

6.5. *In vivo* испитивања – уређај B60

Укупно је снимљено 213 испитаника. Од укупног броја испитаника 103 је било мушког пола, 110 женског. Просечна старост испитаника износила је 54 године. По сваком испитанику узимано је 10 спектра, од којих је у даљој обради коришћена средња вредност, што даје укупно 213 спектра у анализи.

6.6. *In vivo* испитивања - Хиперспектрални имиџинг

Хиперспектралне слике снимане су у два наврата у региону подлактице изнад шаке на месту видљивих крвних судова (Слика 84). Снимања су вршена на једном испитанику у току два дана, при чему је првог дана коришћена SWIR хиперспектрална камера, а другог VNIR. При сваком снимању за регион је вршена аквизиција бар три

хиперспектралне слике, при чему је пре снимања мерена глукоза у крви испитаника Ассу Сheck Аctive апаратом и вредности су забележене. У табелама 16 и 17 дат је протокол снимања за обе спектралне камере.



Слика 84. Регион ручног зглоба са видљивим крвним судовима који је сликан хиперспектралном камером за потребе експеримента

Табела 16. Протокол снимања SWIR хиперспектралном камером

Ред. број	Датум снимања	Време снимања	Глукоза [mmol/l]	Локација снимања
1	28.02.2013	12:04	Пробно снимање	Обе руке
2	28.02.2013	11:36	5.3	Лева рука
3	28.02.2013	12:58	4.9	Обе руке
4	28.02.2013	14:30	5.7	Обе руке
5	28.02.2013	16:30	6.0	Обе руке
6	28.02.2013	19:30	5.0	Обе руке
7	01.03.2013	16:30	6.5	Лева рука
8	04.03.2013	13:55	5.1	Лева рука
9	04.03.2013	22:10	5.2	Лева рука

Табела 17. Протокол снимања VNIR хиперспектралном камером

Ред број	Датум снимања	Глукоза [mmol/l]	Локација снимања
1	04.03.2013	5.1	Обе руке
2	04.03.2013	8.8	Обе руке
3	04.03.2013	8.6	Обе руке
4	04.03.2013	6.9	Обе руке
5	04.03.2013	5.1	Обе руке
6	04.03.2013	6.9	Обе руке
1	01.03.2013	5.2	Неуспеле слике
2	01.03.2013	6.7	
3	01.03.2013	5.1	

6.7. In vivo испитивања – FTIR спектроскопија са оптичким влакнима

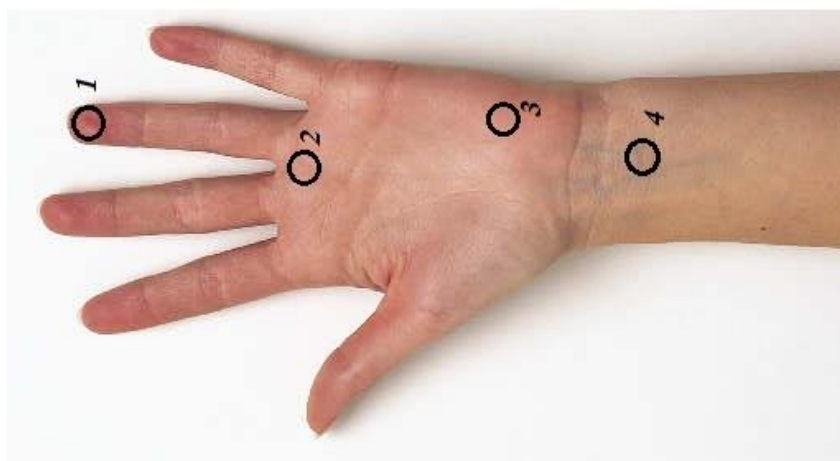
Укупно је снимљено 11 испитаника. Од укупног броја испитаника 5 је било мушког пола, а 6 женског. Пре аквизиције спектра сваком испитанику је мерена концентрација глукозе у крви стандардном методом. По сваком испитанику узиман је по 1 спектар – добијен осредњавањем на 4 спектра, резолуција снимања је била 4cm^{-1} . Аквизиција спектра вршена је на 4 локације на телу у пределу шаке (Слика 85): 1) на јагодици прста из којег је узиман узорак капиларне крви за одређивање концентрације глукозе стандардном методом, 2) на длану у корену средњег прста, 3) на доњој спољној страни длана где је велика прокрвљеност и 4) на руци изнад ручног зглоба у делу где су видљиви крвни судови.

Аквизиција спектра вршена је прислањањем оптичких сонди на изабрану локацију, пре сваког мерења сонда је брисана посебним марамицама за чишћење оптике намоченим у ацетон.

Табела 18. Протокол аквизиције спектра

Ред.бр. испитаника	Глукоза[mmol/l]	Пол	Локација снимања (у складу са ознакама на слици 85)			
1	7.3	Ж	1	2	3	4
2	6.1	Ж				
3	9.3	М				
4	6.7	Ж				
5	8.2	М				
6	5.9	М				
7	6.1	Ж				
8	7.2	ж				
9	6.4	Ж				
10	11.4	М				
11	6.3	Ж				

Испитивања су настављена само за спектре крвног суда узетих са подлактице (локација 4 са слике 85).



Слика 85. Локације на руци са којих је вршена аквизиција спектра помоћу оптичких фајбера – 1) врх прста са којег је узимана кап капиларне крви за мерење концентрације глукозе стандардном методом, 2) корен прста, 3) доњи спољни део длана, 4) регион испод зглоба шаке са видљивим крвним судовима

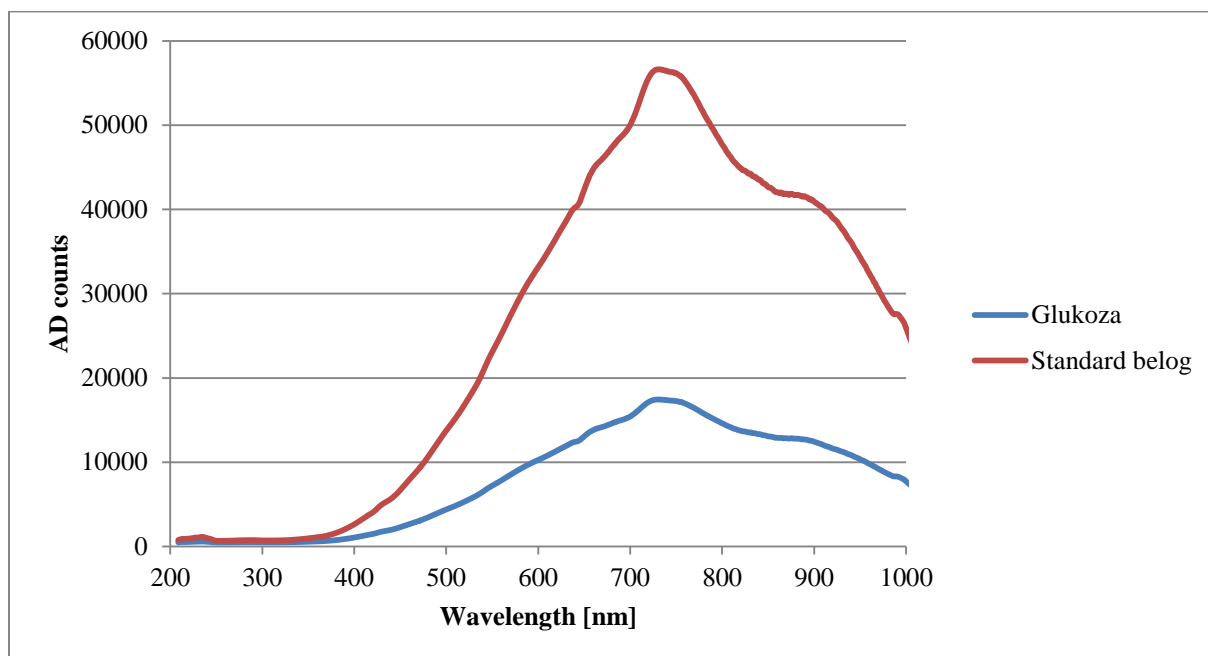
У испитивању је учествовало 8 испитаника, и за сваког од њих је неколико пута вршено узимање крви из прста и одређивање концентрације у крви помоћу стандардне методе, и скоро симултано вршена је аквизиција спектра на видљивом крвном суду на подлактици. Укупно је снимљено 36 спектра којима су одговарале различите концентрације глукозе.

7. Резултати истраживања

7.1. Глукоза у чврстом стању

7.1.1. вис – NIR рефлектанса

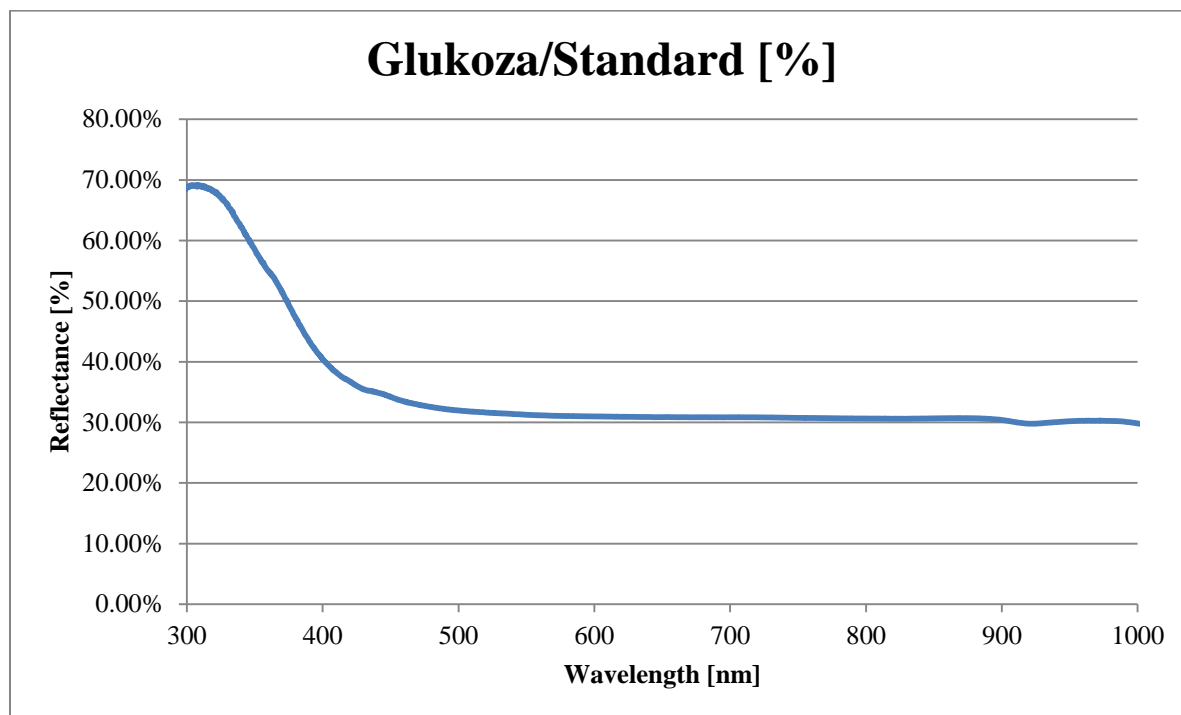
На следећим сликама су приказани изворни спектри у домену вис-НИР од 200nm – 1000nm за чисту глукозу у праху.



Слика 86. Сирови спектри рефлектансе глукозе у праху и стандарда белог

Слика 86 представља изворне спектре одређене за референтни стандард белог, који одбија 100% зрачења. Рефлектанса праха чисте глукозе (слика 87) добија се дељењем спектра за стандард белог, па се у резултујућем спектру добија само део зрачења који рефлектује глукоза.

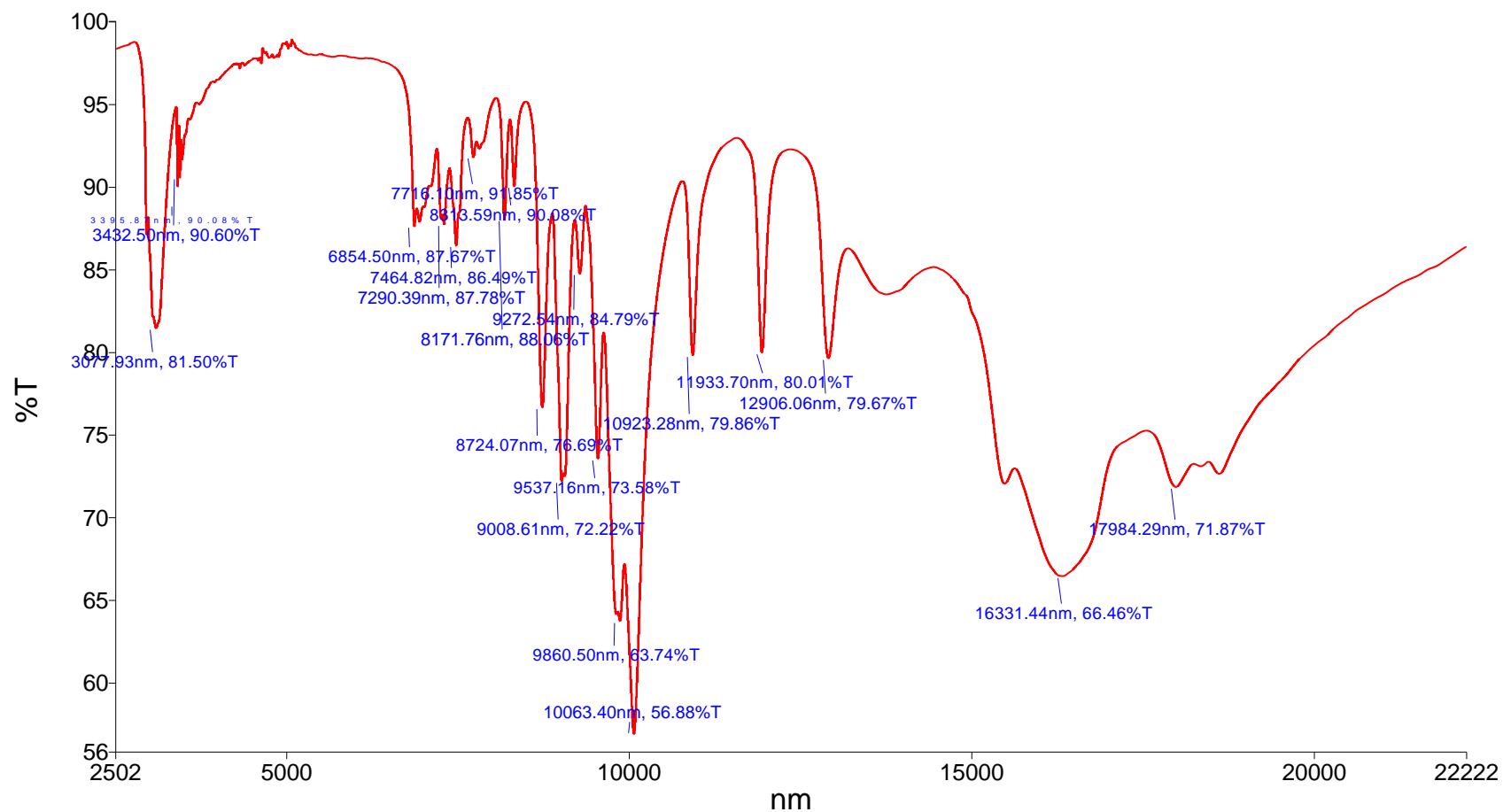
На основу добијеног рефлектансног спектра чисте глукозе уочава се карактеристичан већи пик у области око 300nm, након чега рефлектанса благо опада и у целом домену до 1000nm има вредност око 30%.



Слика 87. Рефлектанса глукозе у праху (изражено у процентима у односу на тоталну рефлектансу добијену за стандард белог)

7.1.2. FTIR ATR трансмитанса/апсорбанса

Трансмисиони спектар глукозе у праху снимљен ATR FTIR методом, приказан је на слици 88. Спектар је добијен са резолуцијом од 4cm⁻¹, и представља осредњен спектар за 16 снимљених спектара. Спектар са слике 88 може се посматрати и као да је апсорпциони, само што у том случају вертикална оса се гледа одозго на доле. На спектру су означени карактеристични пикови за глукозу, од којих се фундаментални вибрациони мод глукозе налази на око 10063nm.

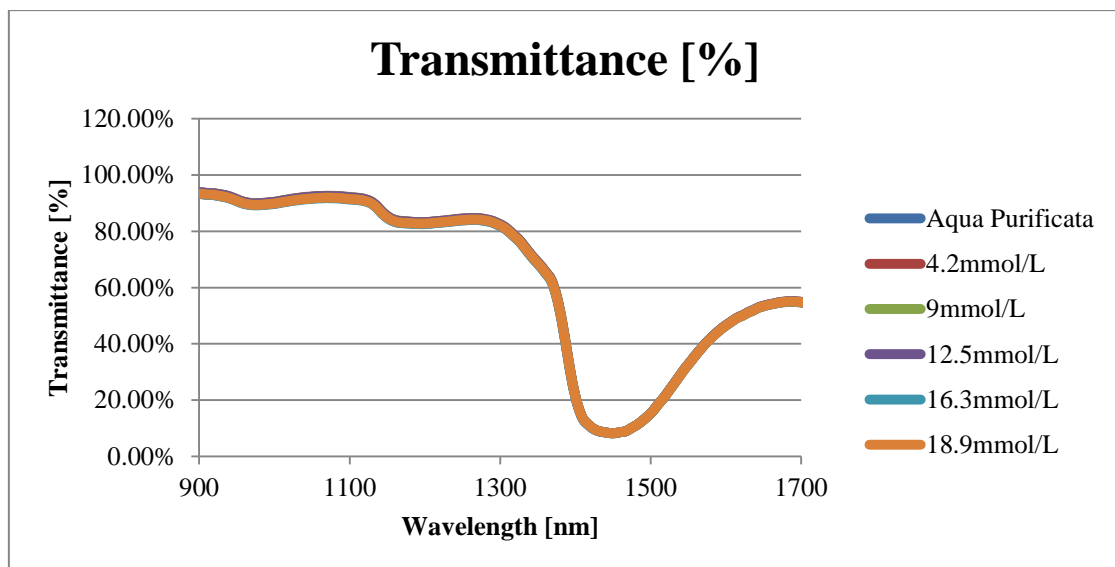


Слика 88. ATR FTIR спектар чисте глукозе у праху

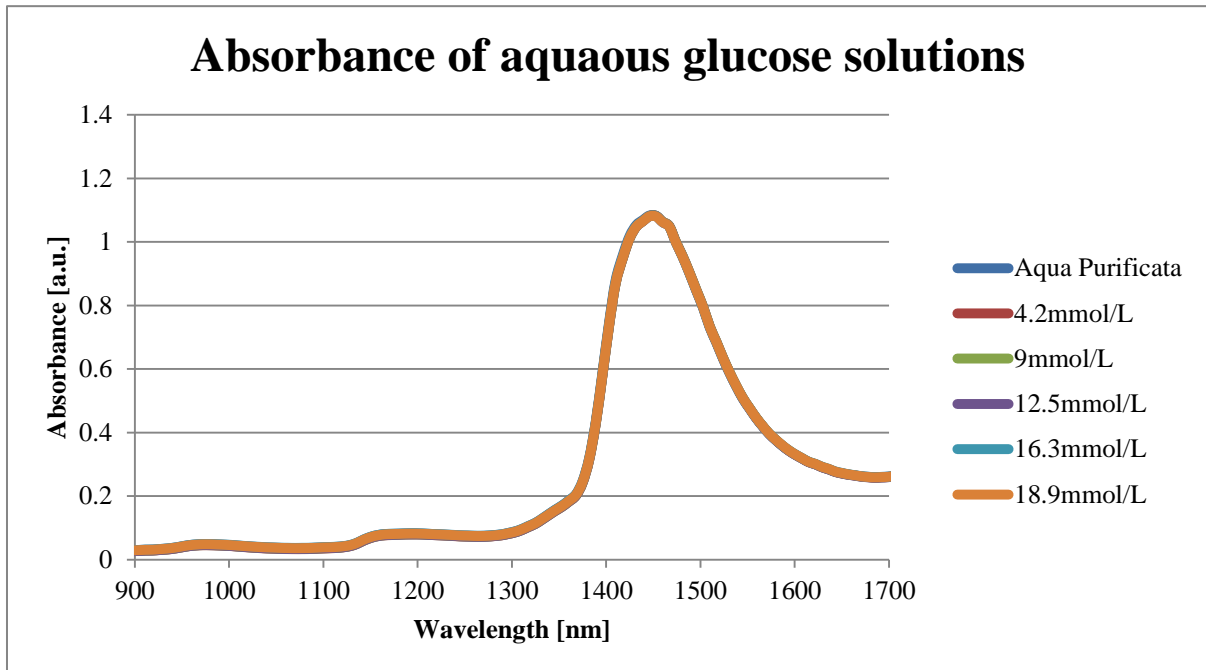
7.2. Раствори глукозе у праху

7.2.1. NIR спектроскопија у опсегу 900-1700nm

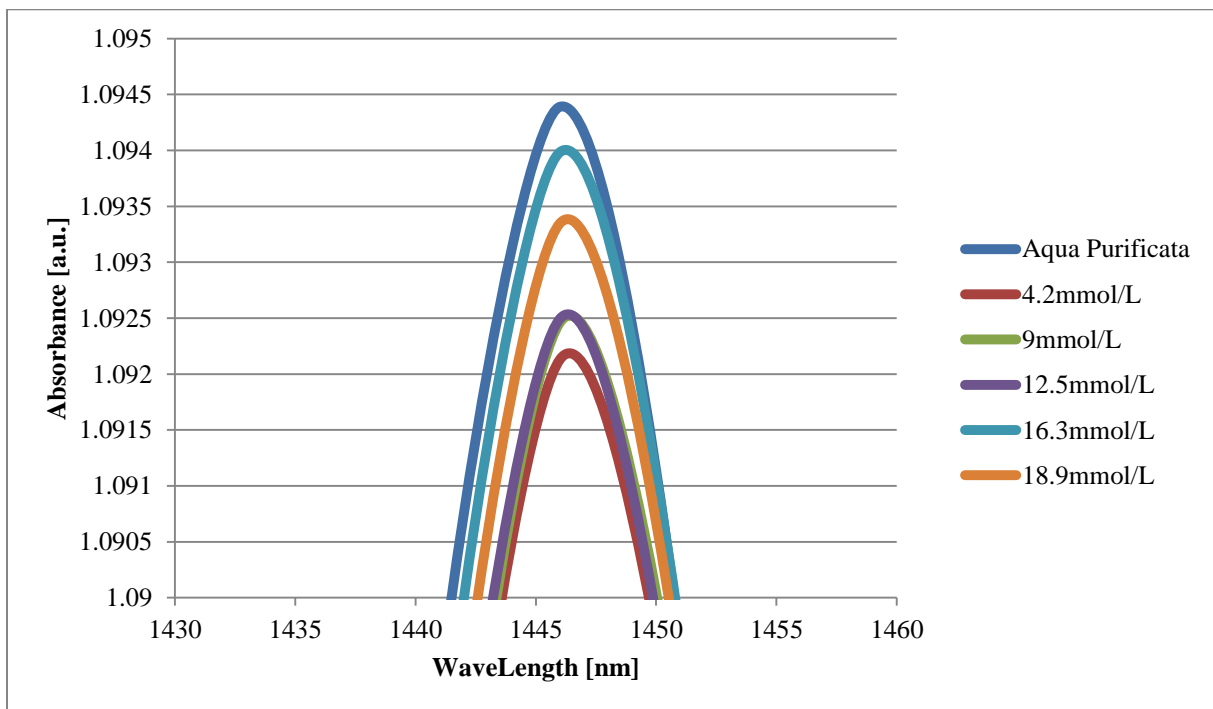
За сликама 89 и 90 приказани су сирови тј. оригинални спектри раствора глукозе у води. Као што се може приметити, визуелно нису уочљиве разлике, али уколико се погледа слика 91, може се приметити да разлике постоје и да је неопходно пронаћи адекватан data mining метод за издвајање релевантних информација о глукози на основу NIR спектра.



Слика 89. Трансмитања чисте воде и водених раствора глукозе у праху различитих концентрација



Слика 90. Абсорбанса чисте воде и водених раствора глукозе у праху различитих концентрација

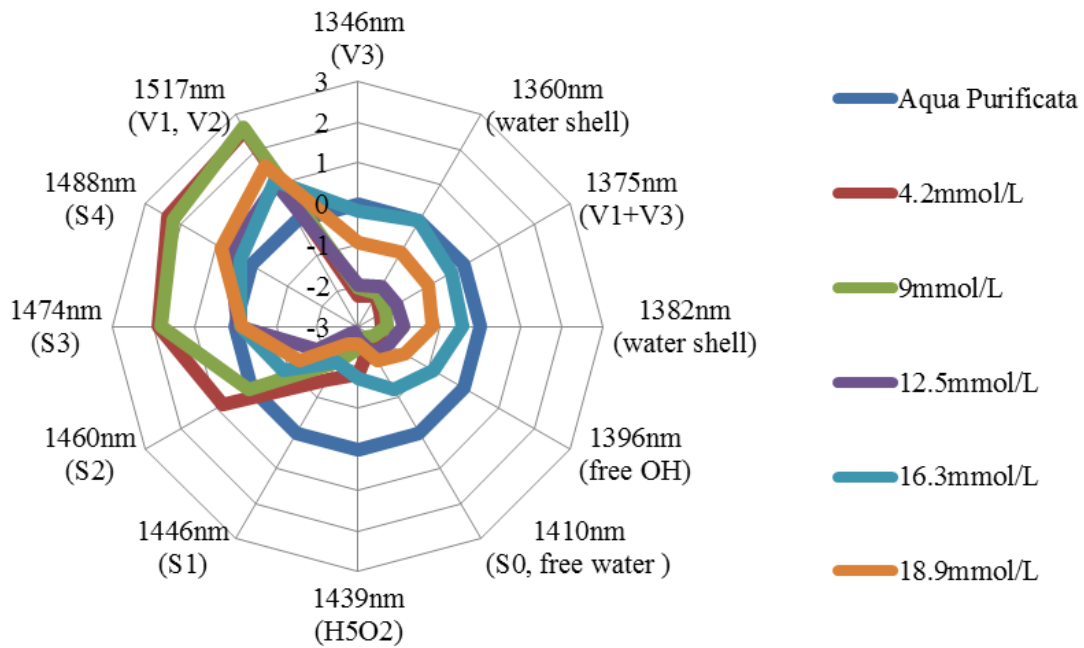


Слика 91. Абсорбанса чисте воде и водених раствора глукозе у праху различитих концентрација – увећан део у региону око 1450nm

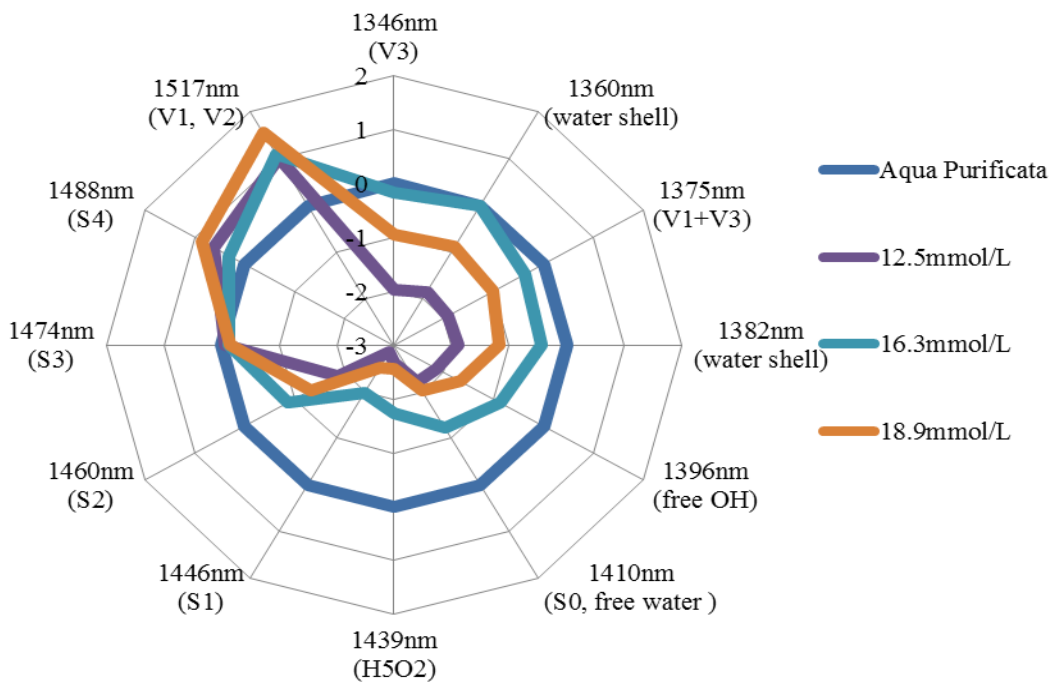
7.2.2. Аквафотомика

Као један од приступа за анализу спектра глукозе примењена је Аквафотомика као врло једноставна и брза метода која посматра само регион првог овертона ОН везе воде, за који је утврђено постојање карактеристичних водених апсорпционих трака. Резултати Аквафотомике приказани су на следећим акваграмима (Слика 92 и 93), где друга слика заправо представља само увећани приказ линија акваграма за веће концентрације глукозе у воденим растворима. што је учињено ради веће прегледности дијаграма.

Са обеју акваграма је уочљиво да присуство глукозе у води утиче на формирање јачих водоничних веза између молекула воде. За мање концентрације глукозе од 4,2 и 9,0 mmol/l карактеристичне водене формације обухватају снажно везану воду (1517nm), као и кластере воде – водене пентамере (1488nm), водене тетрамере (1474nm) и водене тримере (1642nm), при чему је број тримера воде мањи у односу на претходно наведене формације. Са порастом концентрације глукозе, опада број молекула воде који граде везе међу собом (тримери, тетрамери, пентамери и снажно везана вода), при чему се благо повећава број водених молекула у хидратационим љускама (1360nm, 1382nm) што сугерише да повећање концентрације глукозе доводи до раскидања водоничних веза између молекула воде и ангажовање тако насталих слободних молекула воде у стварање веза са глюкозом, односно стимулише хидрирање глукозе, будући да расте број молекула воде у хидрираним љускама.



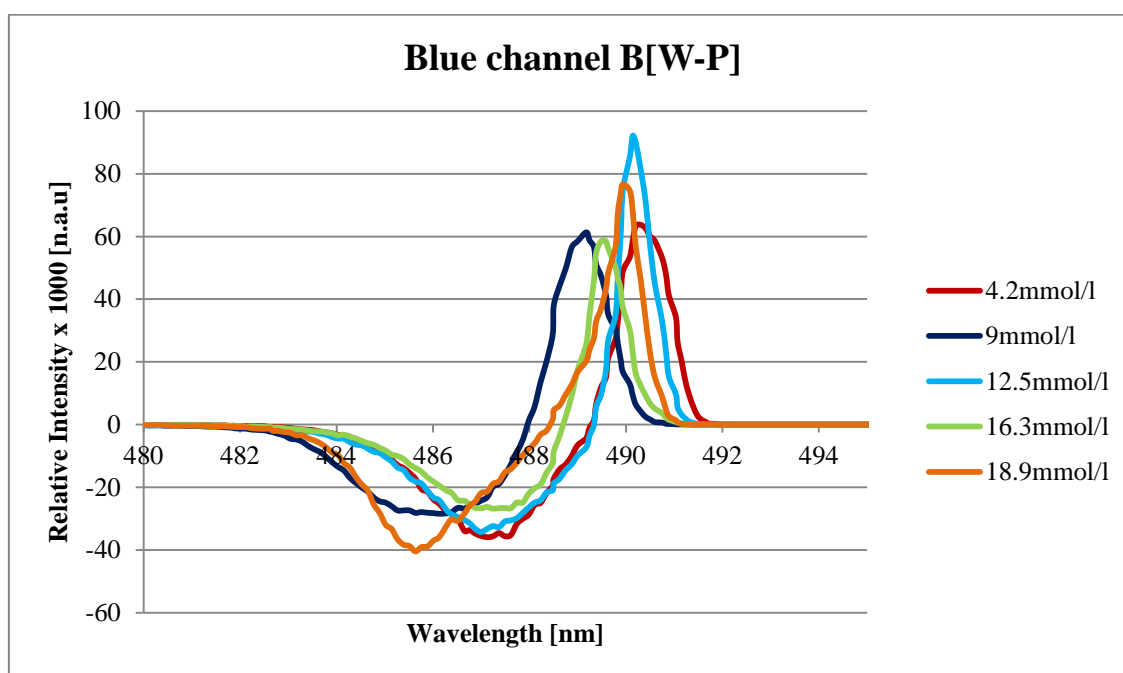
Слика 92. Акваграм чисте воде и водених раствора глукозе различите концентрације



Слика 93. Акваграм чисте воде и водених раствора глукозе већих концентрација

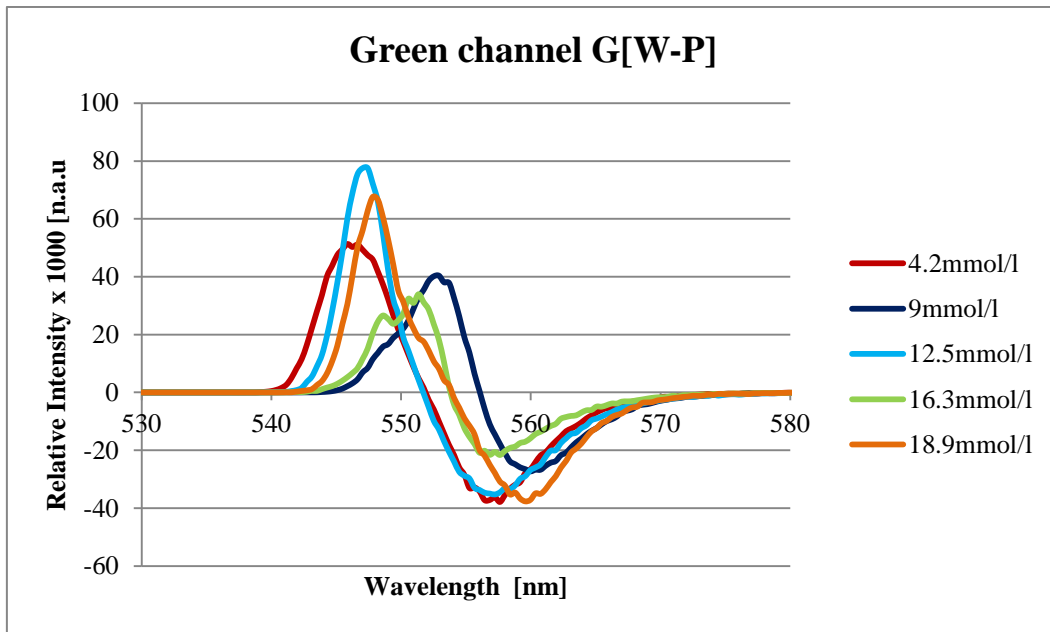
7.2.3. Опто – магнетна имицинг спектроскопија: Брустеров угао 53°

На следећим сликама (94-97) дат је приказ конволутивних спектара добијених на основу дигиталних фотографија водених раствора глукозе, чије концентрације одговарају вредностима у физиолошком опсегу. На сликама су приказане осредњене вредности на основу 10 спектара по раствору одређене концентрације.

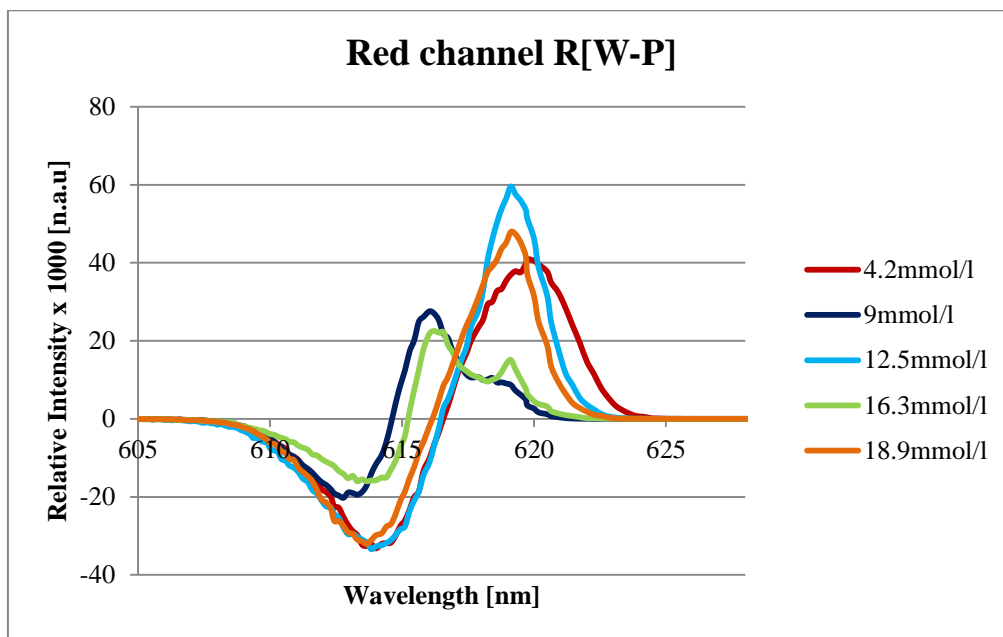


Слика 94. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри само за плави канал РГБ дигиталне слике воденог раствора глукозе добијени одузимањем поларизоване слике од беле слике

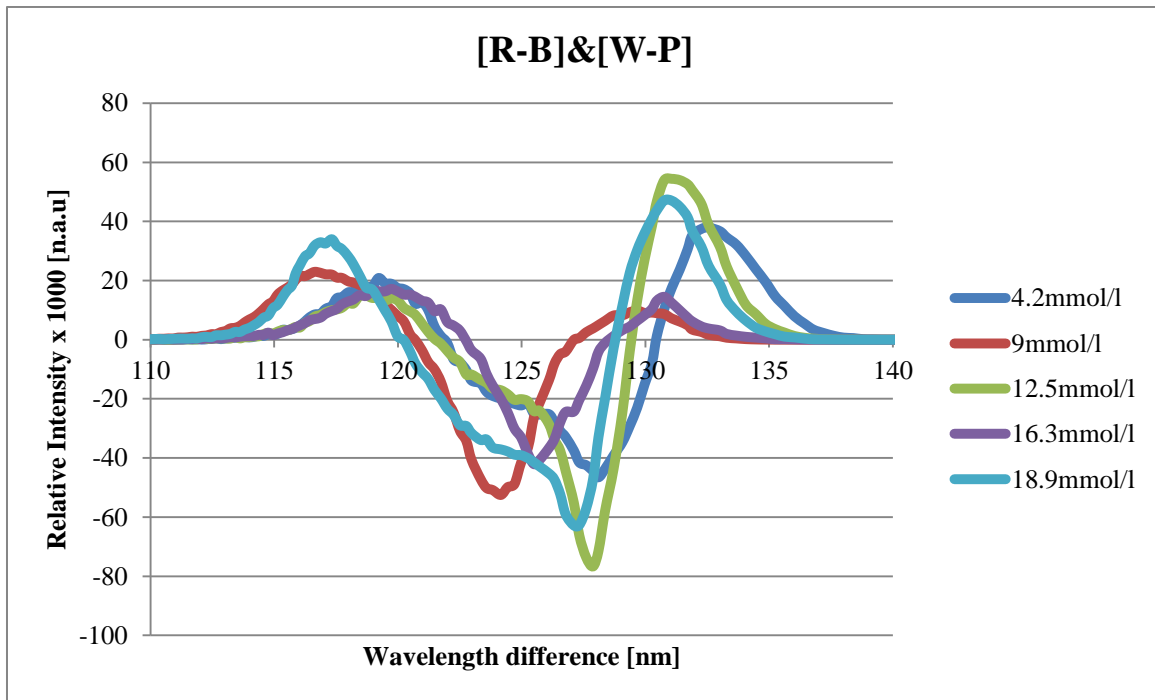
За сваки пар беле и поларизоване слике могу се издвојити спектри за сваки канал – плави црвени и зелени, као и њихове конволуције. Визуелним прегледом није могуће утврдити да ли било који од ових канала садржи информацију о концентрацији глукозе и зато је примењена линеарна регресија методом најмањим квадрата на конволутивне спектре добијене одузимањем плавог од црвеног канала за парове беле и поларизоване слике (слика 97).



Слика 95. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри само за зелени канал РГБ дигиталне слике воденог раствора глукозе добијени одузимањем поларизоване слике од беле слике



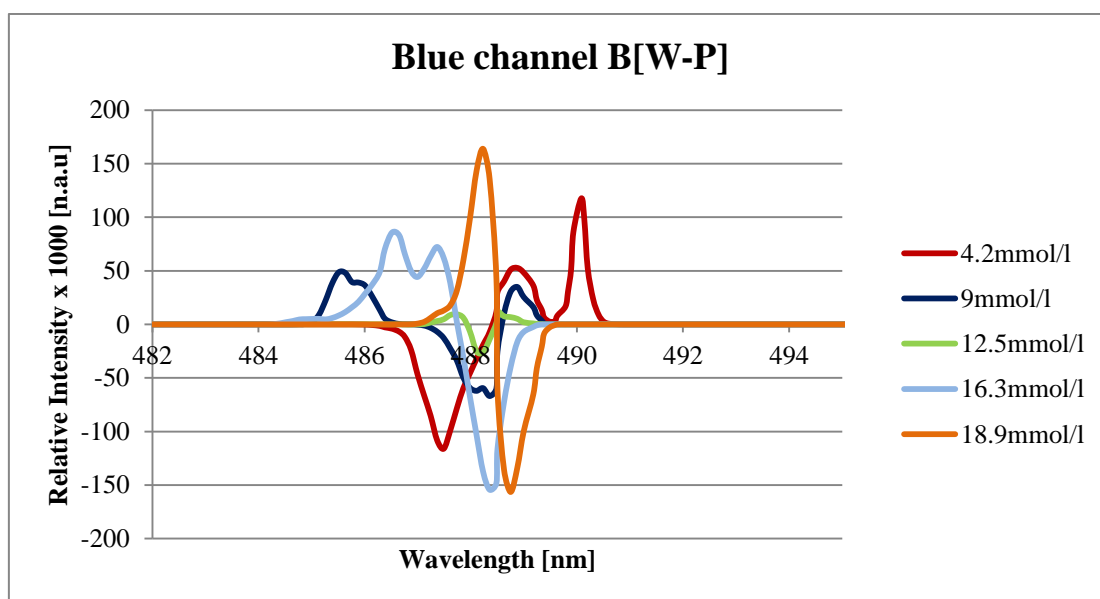
Слика 96. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри само за црвени канал РГБ дигиталне слике воденог раствора глукозе добијени одузимањем поларизоване слике од беле слике



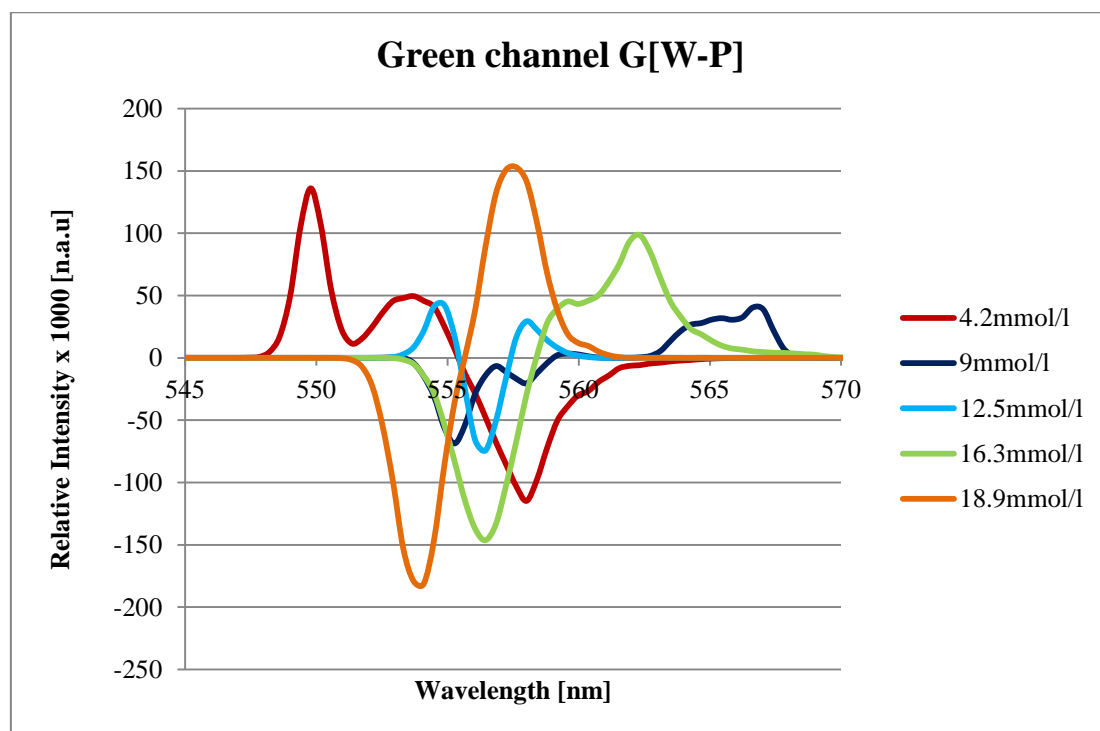
Слика 97. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри при чему је одузиман плави канал од црвеног канала РГБ беле и поларизоване дигиталне слике

7.2.4. Опто – магнетна спектроскопија: Брустеров угао 60°

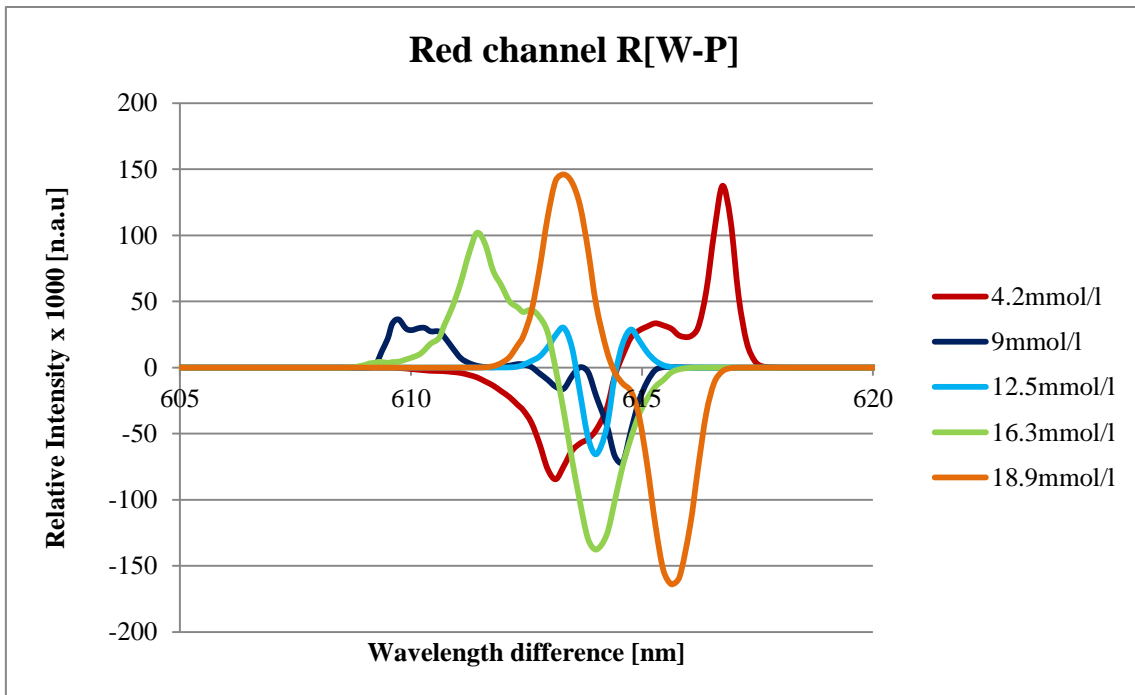
На следећим сликама (97-100) дат је приказ конволутивних спектра добијених на основу дигиталних фотографија водених раствора глукозе, чије концентрације одговарају вредностима у физиолошком опсегу. На сликама су приказане осредњене вредности на основу 10 спектра по раствору одређене концентрације.



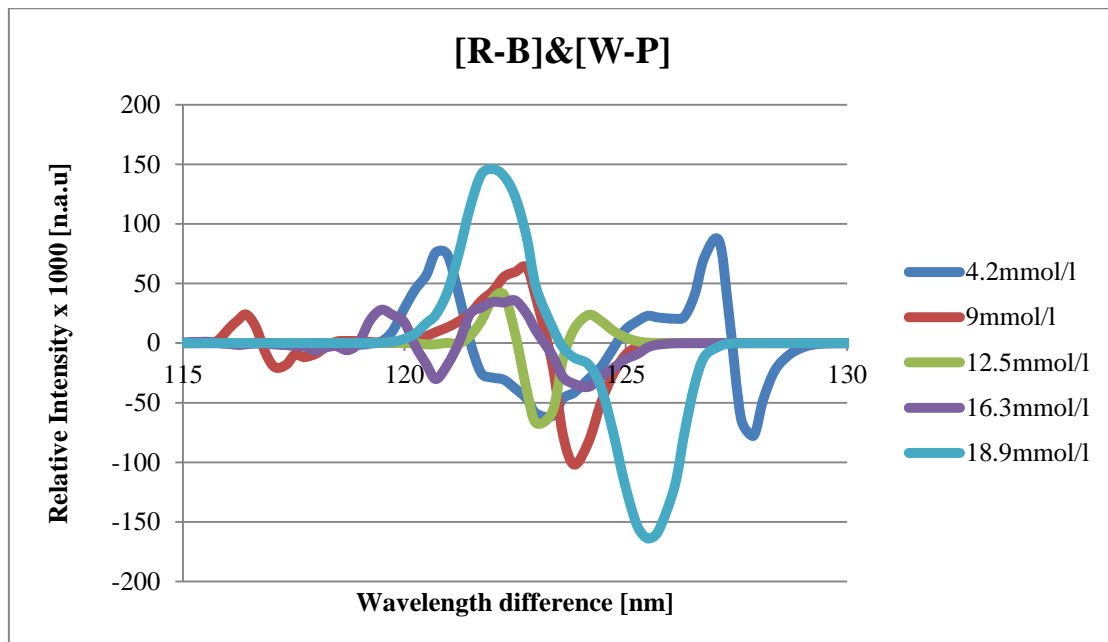
Слика 98. Опти магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри само за плави канал РГБ дигиталне слике воденог раствора глукозе добијени одузимањем поларизоване слике од беле слике



Слика 99. Опти магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри само за зелени канал РГБ дигиталне слике воденог раствора глукозе добијени одузимањем поларизоване слике од беле слике



Слика 100.. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри само за црвени канал РГБ дигиталне слике воденог раствора глукозе добијени одузимањем поларизоване слике од беле слике

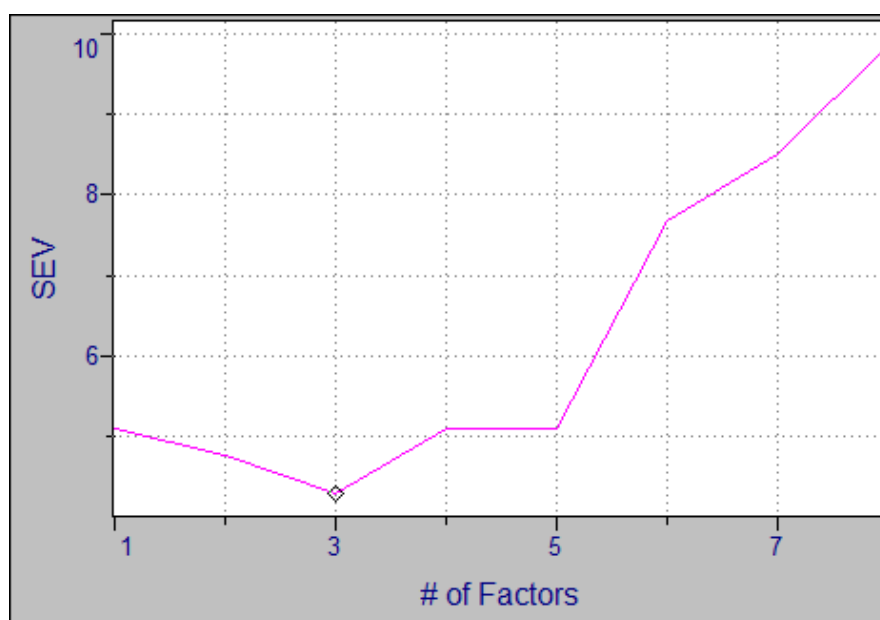


Слика 101. Опто магнетни спектри водених раствора глукозе различите концентрације – приказани су конволуциони спектри при чему је одузиман плави канал од црвеног канала РГБ беле и поларизоване дигиталне слике

7.3. Линеарна регресија методом најмањих квадрата примењена на опто-магнетне имицинг спектре водених раствора глукозе у праху

7.3.1. Брустеров угао - B60

За обраду је коришћен само део спектра који нема вредности једнаке нули. Препроцесирање је било осредњавање спектра, и нису вршене никакве додатне трансформације.



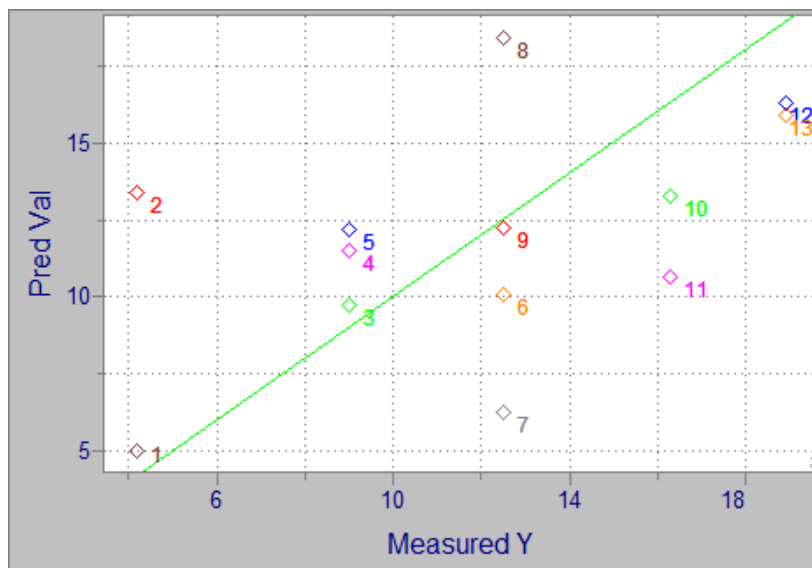
Слика 102. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 3

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем једног узорка.

За добијени PLSR модел одређено је на основу вредности грешке валидације (слика 102) да је оптималан број фактора у моделу 3.

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,49$, а стандардна грешка валидације $RMSEV=4,28\text{mmol/l}$.

Резултати упоређивања одређене концентрације глукозе по развијеном моделу и стварних измерених вредности концентрације глукозе дати су на слици 103, и табеларно су дате разлике између измерених и предвиђених вредности глукозе за све вредности концентрација испитиваних раствора (Табела 19).



Слика 103. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре водених раствора глукозе сниманих под Брустеровим углом Б60

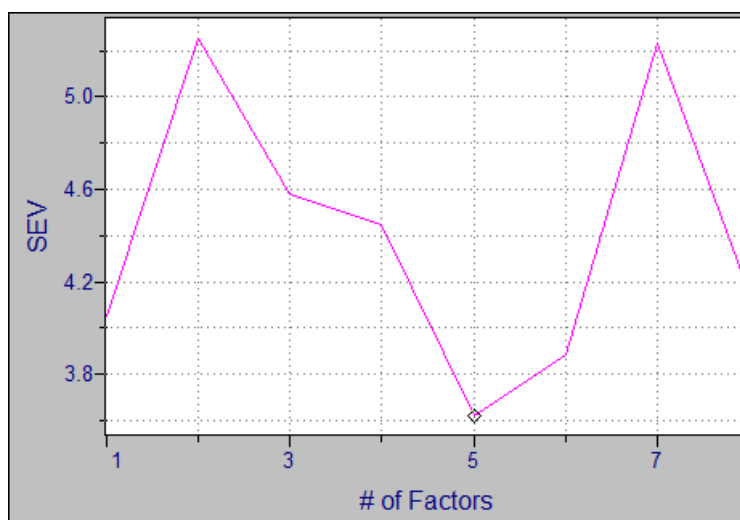
Табела 19. Разлике између референтних вредности глукозе и предвиђених вредности по моделу за опто-магнетне спектре водених раствора глукозе сниманих под Брустеровим углом Б60

Ред.број спектра	Измерено [mmol/l]	Предвиђено [mmol/l]	Грешка [mmol/l]
1	4.2	4.982464	-0.78247
2	4.2	13.40854	-9.20854
3	9	9.753571	-0.75357
4	9	11.53337	-2.53337
5	9	12.17648	-3.17648
6	12.5	10.06635	2.433655
7	12.5	6.270115	6.229885

8	12.5	18.42783	-5.92783
9	12.5	12.23052	0.269482
10	16.3	13.30279	2.997213
11	16.3	10.6504	5.649595
12	18.9	16.30406	2.595942
13	18.9	15.92036	2.979641

7.3.2. Брустеров угао B53

За обраду је коришћен само део спектра који нема вредности једнаке нули. Препроцесирање је било осредњавање спектра, и нису вршене никакве додатне трансформације.

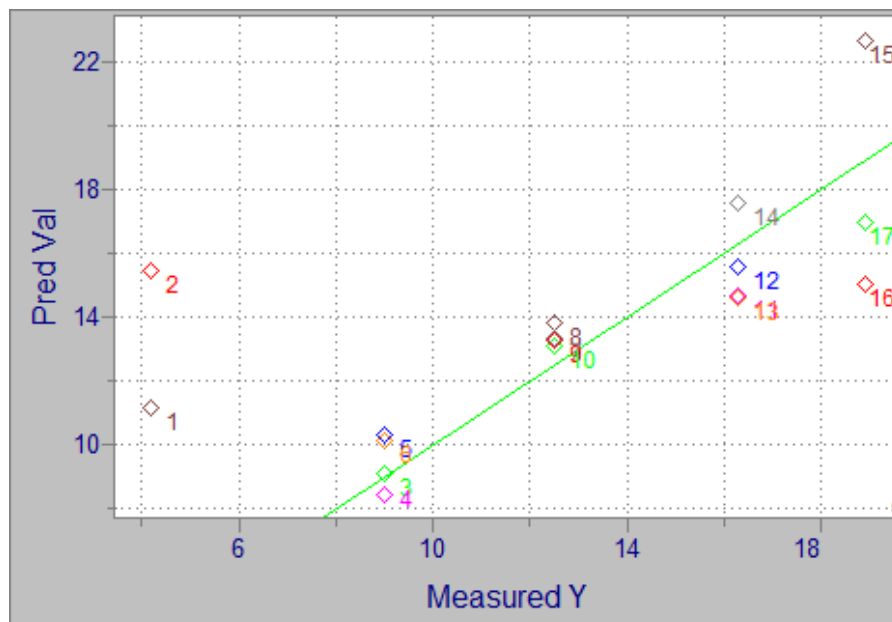


Слика 104. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 5

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем једног узорка.

За добијени PLSR модел одређено је на основу вредности грешке валидације (слика 104) да је оптималан број фактора у моделу 5.

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,67$, а стандардна грешка валидације $SEV=3,62\text{mmol/l}$.



Слика 105. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре водених раствора глукозе сниманих под Брустеровим углом Б53

Табеларно су дате разлике између измерених и предвиђених вредности глукозе за све вредности концентрација испитиваних раствора (Табела 20).

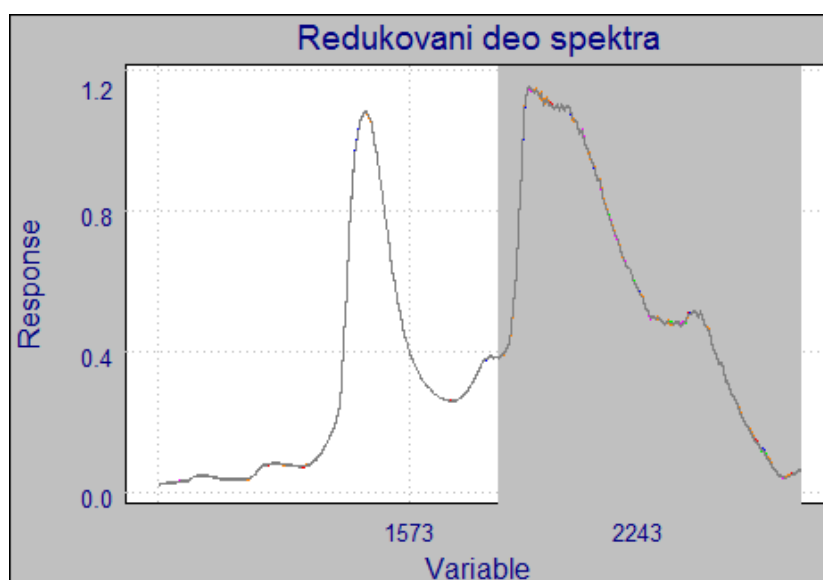
Табела 20. Разлике између референтних вредности глукозе и предвиђених вредности по моделу

Ред.број спектра	Измерено [mmol/l]	Предвиђено [mmol/l]	Грешка [mmol/l]
1	4.2	11.16436	-6.96436
2	4.2	15.46442	-11.2644
3	9	9.131929	-0.13193
4	9	8.438147	0.561853
5	9	10.33849	-1.33849
6	9	10.16903	-1.16903
7	12.5	13.33626	-0.83626

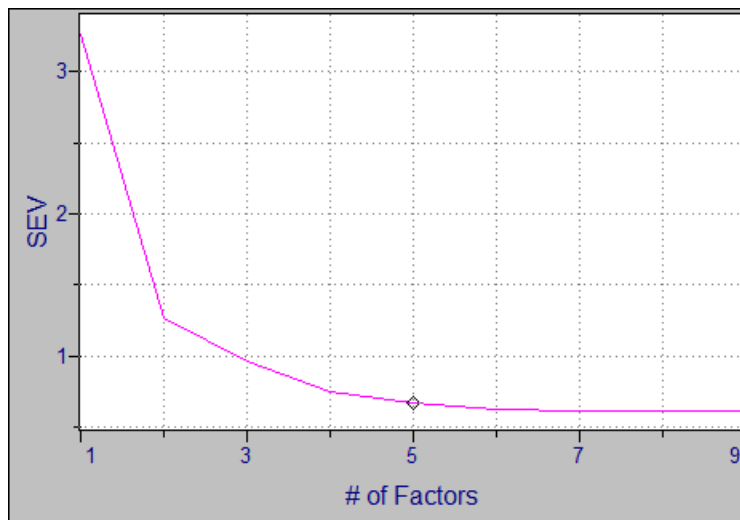
8	12.5	13.82859	-1.32859
9	12.5	13.28999	-0.78999
10	12.5	13.13159	-0.63159
11	16.3	14.65703	1.64297
12	16.3	15.61256	0.687435
13	16.3	14.62137	1.678628
14	16.3	17.56837	-1.26837
15	18.9	22.68231	-3.78231
16	18.9	15.05725	3.842749
17	18.9	16.96933	1.930674

7.3.3. Обрада NIR спектра водених раствора глукозе

За обраду је коришћен само део спектра таласне дужине мање од 1800nm, због великог шума у даљем делу спектра тј. у комбинационој траци воде (слика 106). Препроцесирање је било осредњавање спектра, и нису вршене никакве додатне трансформације.



Слика 106. Редуковани део спектра водених раствора глукозе који је коришћен у анализи



Слика 107. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 5

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем једног узорка.

За добијени PLSR модел одређено је на основу вредности грешке валидације (слика 107) да је оптималан број фактора у моделу 5.



Слика 108. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за NIR спектре водених раствора глукозе

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,99$. Стандардна грешка валидације износила је $RMSEV=0,67$ mmol/l. Резултати су високо корелисани и линеарни модел је добро изабран модел.

Табеларно су дате разлике између измерених и предвиђених вредности глукозе за све вредности концентрација испитиваних раствора (Табела 21).

Табела 21. Разлике између референтних вредности глукозе и предвиђених вредности по моделу за NIR спектре водених раствора глукозе

Ред.број спектра	Измерено [mmol/l]	Предвиђено [mmol/l]	Грешка [mmol/l]
G5-1	4.2	4.178542	0.021458
G5-2	4.2	4.259569	-0.05957
G5-3	4.2	4.847711	-0.64771
G5-4	4.2	3.735514	0.464486
G5-5	4.2	3.830545	0.369454
G5-6	4.2	4.937068	-0.73707
G5-7	4.2	3.595634	0.604366
G5-8	4.2	4.397884	-0.19789
G5-9	4.2	4.784817	-0.58482
G5-10	4.2	4.687702	-0.4877
G10-1	9	8.931404	0.068596
G10-2	9	8.640574	0.359426
G10-3	9	9.784052	-0.78405
G10-4	9	9.213095	-0.2131
G10-5	9	10.2429	-1.2429
G10-6	9	10.04096	-1.04096
G10-7	9	9.695639	-0.69564
G10-8	9	9.995293	-0.99529
G10-9	9	8.394437	0.605563
G10-10	9	7.983439	1.016561

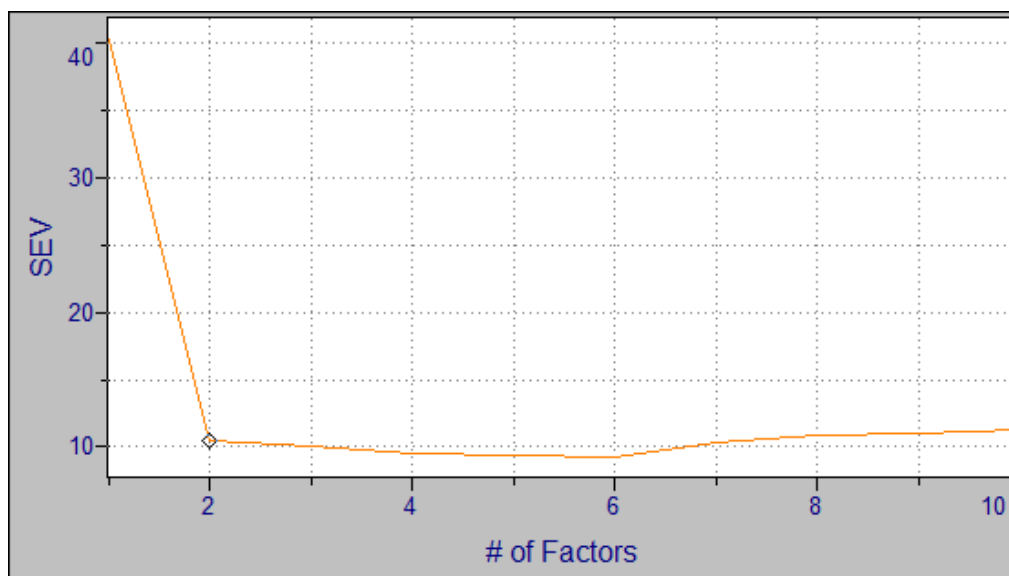
G15-1	12.5	11.65169	0.848312
G15-2	12.5	12.17735	0.322652
G15-3	12.5	13.02033	-0.52033
G15-4	12.5	12.12717	0.372826
G15-5	12.5	11.62911	0.870895
G15-6	12.5	11.65637	0.843626
G15-7	12.5	11.91498	0.585022
G15-8	12.5	12.86313	-0.36313
G15-9	12.5	11.93951	0.560489
G15-10	12.5	11.61642	0.883579
G20-1	16.3	16.75421	-0.45421
G20-2	16.3	16.78966	-0.48966
G20-3	16.3	16.55159	-0.25159
G20-4	16.3	15.41191	0.888094
G20-5	16.3	16.05376	0.246244
G20-6	16.3	16.92636	-0.62636
G20-7	16.3	17.46548	-1.16548
G20-8	16.3	17.47755	-1.17755
G20-9	16.3	17.02285	-0.72285
G20-10	16.3	16.0171	0.282904
G25-1	18.9	18.16845	0.73155
G25-2	18.9	18.34776	0.552244
G25-3	18.9	19.05471	-0.15472
G25-4	18.9	19.49437	-0.59437
G25-5	18.9	19.04748	-0.14748
G25-6	18.9	18.29215	0.607853
G25-7	18.9	17.82369	1.076315
G25-8	18.9	18.91849	-0.01849
G25-9	18.9	17.88279	1.01721

G25-10	18.9	18.21349	0.686514
--------	------	----------	----------

7.3.4. Обрада NIR резултата за веће варирање концентрације глукозе

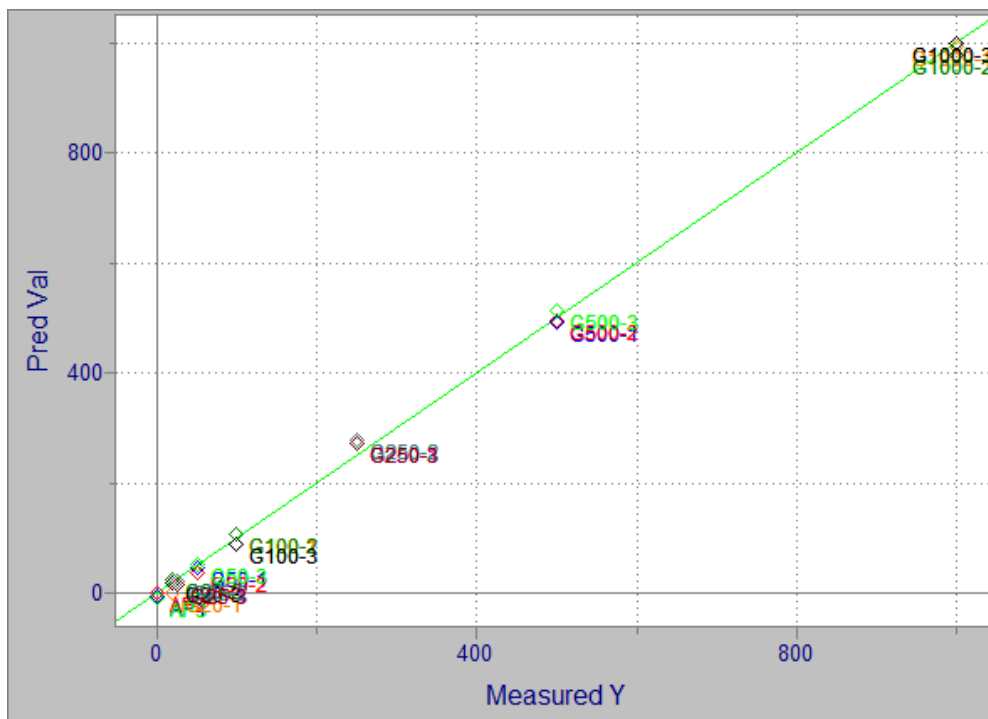
У овом експерименту концентрација глукозе водених раствора варира је у опсегу од 20-1000mmol/l. Добијени спектри су препроцесирани коришћењем осредњавања, урађено је заглађивање спектра по Савицки-Голеј алгоритму у 13 тачака, и примењена је мултипликативна корекција расејања. За овакав поступак препроцесирања добијени су оптимални резултати.

Након тога урађена је линеарна регресија. Оптималан број фактора у моделу усвојено је да је 2, јер је коефицијент регресије за два фактора износио $r^2=0,993$, па иако стандардна грешка валидације RMSEV опада и даље за узимање већег броја фактора, коефицијент регресије варира тек на трећој децимали, тако да се вероватно у модел при броју фактора већег од два узима и нежељени шум. За усвојени број оптималних фактора грешка је износила RMSEV=10mmol/l.



Слика 109. Одређивање оптималног броја фактора у моделу на основу стандардне грешке валидације. Процењено је да је оптималан број фактора у моделу 2.

За овако направљен линеаран модел, вршено је израчунавање вредности концентрације глукозе и резултати поређења израчунатих вредности и номиналних вредности приказани су на слици 110. Види се да модел показује веома високу тачност и да је добро процењена линеарна зависност апсорбансе глукозе и њене концентрације у воденом раствору.



Слика 110. Резултати фитовања израчунатих концентрација глукозе у воденим растворима и номиналних вредности..

Модел показује висок степен тачности.

Међутим анализом грешака (Табела 2, Прилог 1), може се уочити да и поред привидне добре корелације на основу визуелног поређења и регресионог коефицијента, грешка су прилично велике, али се смањују за веће вредности концентрације глукозе. Разлог томе је највероватније коришћење номиналних вредности уместо реалних, измерених вредности концентрације глукозе као што је то рађено у претходним наведеним експериментима, где су и поред задатих номиналних вредности концентрације глукозе настајали другачији измерени резултати концентрације глукозе у направљеним растворима. Томе у прилог говори и чињеница да је у претходном поглављу за мањи опсег концентрација глукозе који одговара физиолошким вредностима постигнут јако

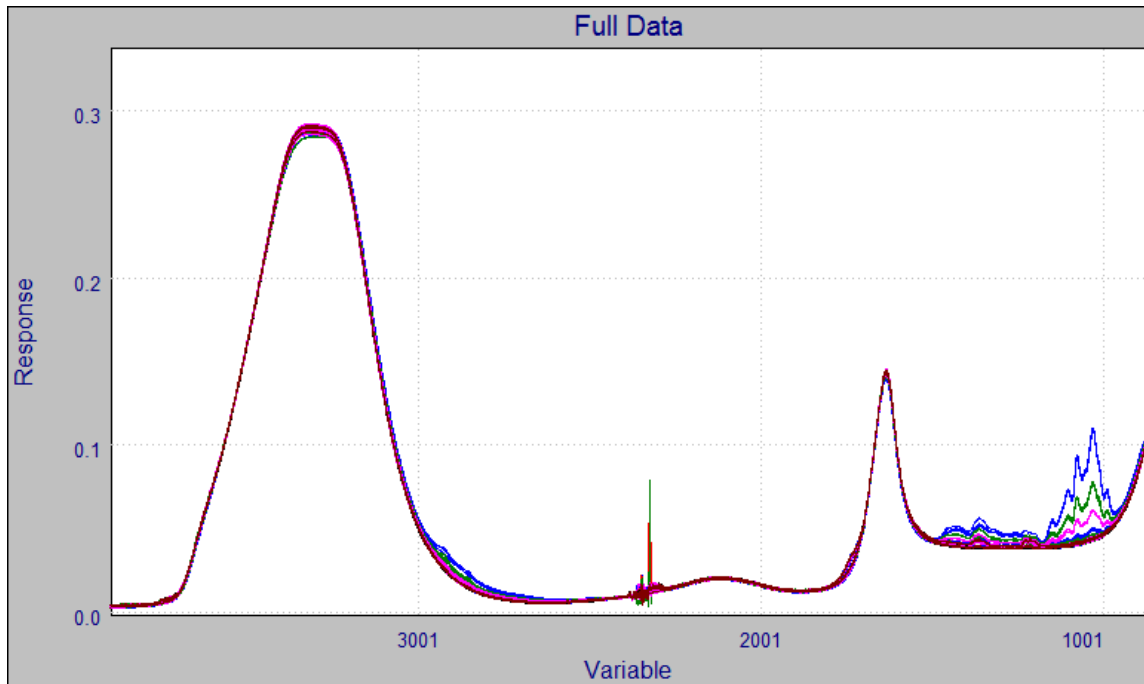
добар линеарни модел са коефицијентом регресије 0.99 и максималном грешком од -1,24 mmol/l. С обзиром да су у овом случају коришћене номиналне уместо измерених вредности, грешка највероватнија наступа услед калибрације са недовољно тачним вредностима. Може се закључити да је апсолутно неопходно при калибрацији користити се тачно измереним вредностима неком референтном методом која представља златни стандард. У овом случају будући да опсег Ассу Чек апарата не може да мери концентрације глукозе веће од 25mmol/l таква мерења није било могуће спровести, и препоручљиво је понављање овог експеримента са тачно измереним вредностим глукозе за сваки раствор.

7.3.5. Обрада FTIR ATR резултата водених раствора глукозе

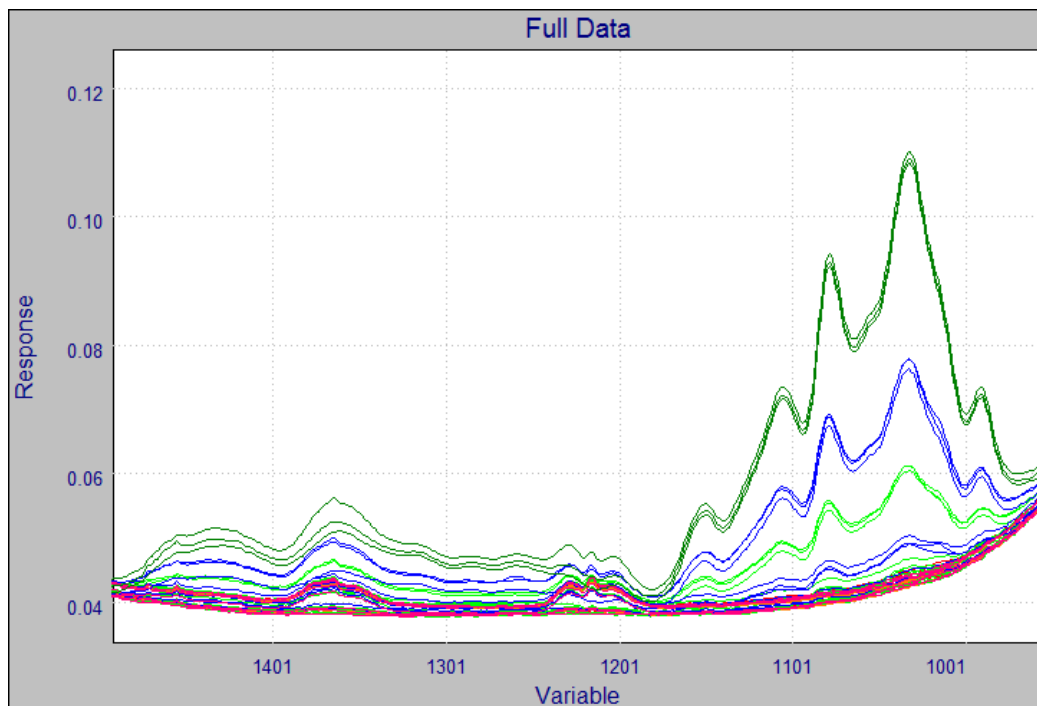
7.3.5.1. Референца - ваздух

На слици 111 представљени су спектри водених раствора глукозе различите концентрације када је као референца узиман ваздух. На спектрима су уочљива три различита региона – регион од 2800-3200cm⁻¹, који одговара вибрацијама истезања ОН везе воде, регион око 1600 cm⁻¹ који одговара деформационим вибрацијама ОН везе воде и регион око 1000 cm⁻¹ који представља фундаментални апсорпциони пик глукозе.

Ако се овај регион фундаменталних вибрација глукозе увелича (слика 112), виде се компонентни пикови на 1152 cm⁻¹, 1107 cm⁻¹, 1080cm⁻¹, 1034 cm⁻¹, 992 cm⁻¹ што је у сагласности са литературним подацима [151]. Међутим за мање вредности концентрација глукозе у раствору у овом региону од 1152-992 cm⁻¹, губе се ови карактеристични пикови који потичу од фундаменталних вибрација глукозе што се може уочити са слике 113. Када се регион од 1500-1100 cm⁻¹, увелича интересантно је да постоје стабилни пикови за све концентрације глукозе водених раствора који су видљиви и изражени чак и за мале концентрације од 5 и 7 mmol/l (слика 113).

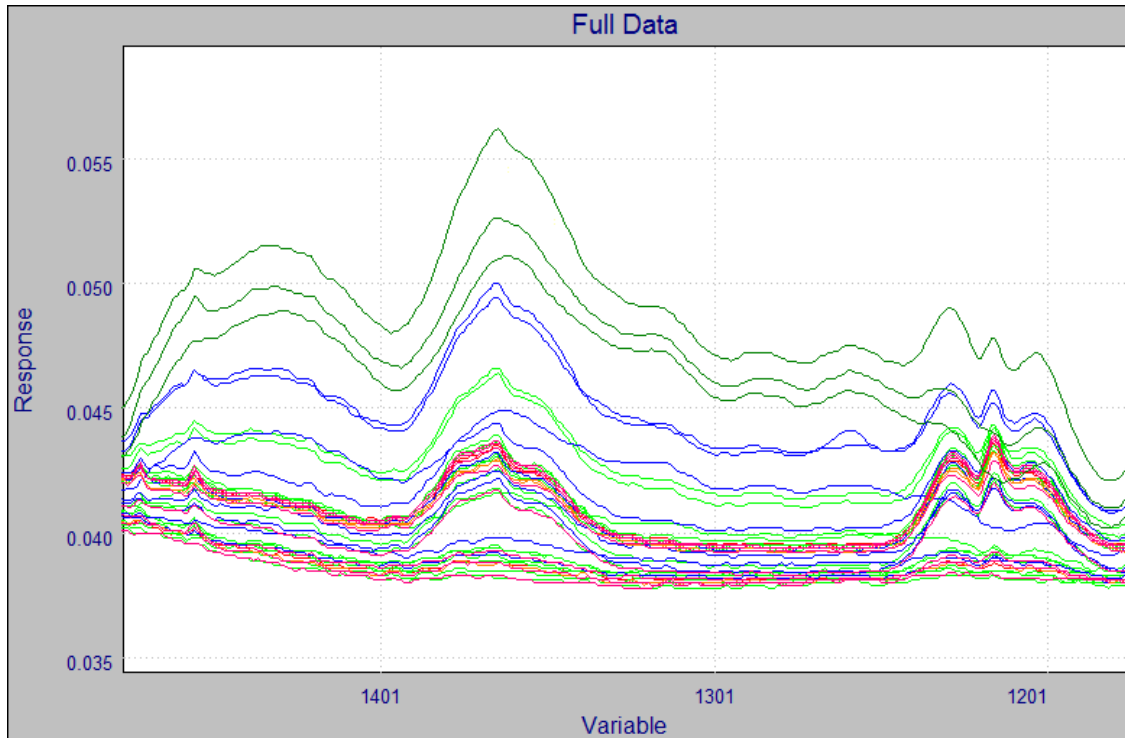


Слика 111. FTIR ATR спектри водених раствора глукозе при чему је као референца узиман ваздух



Слика 112. Увеличани регион фундаменталних вибрација глукозе

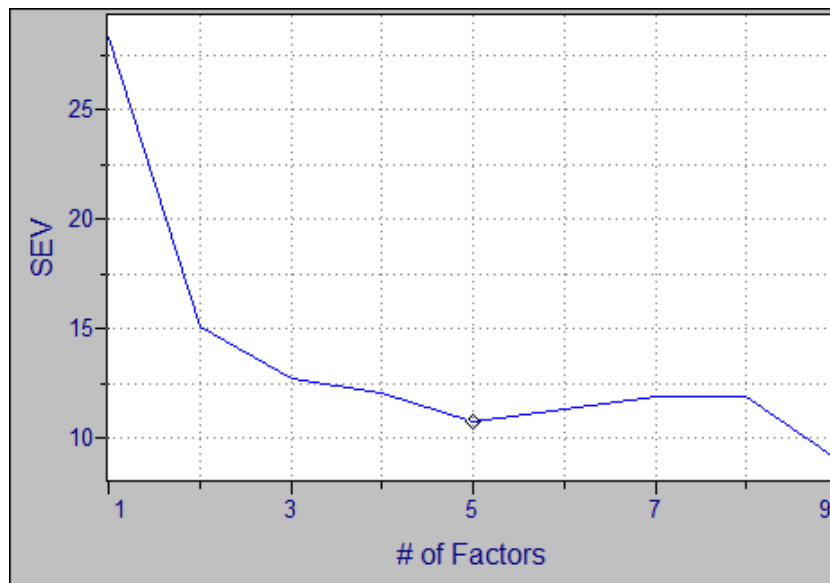
У овом делу спектра уочени су карактеристични пикови (слика 113, слева на десно): $1456,5\text{cm}^{-1}$, $1434,4\text{cm}^{-1}$, 1366cm^{-1} , 1230cm^{-1} , $1217,6\text{cm}^{-1}$, 1025cm^{-1} .



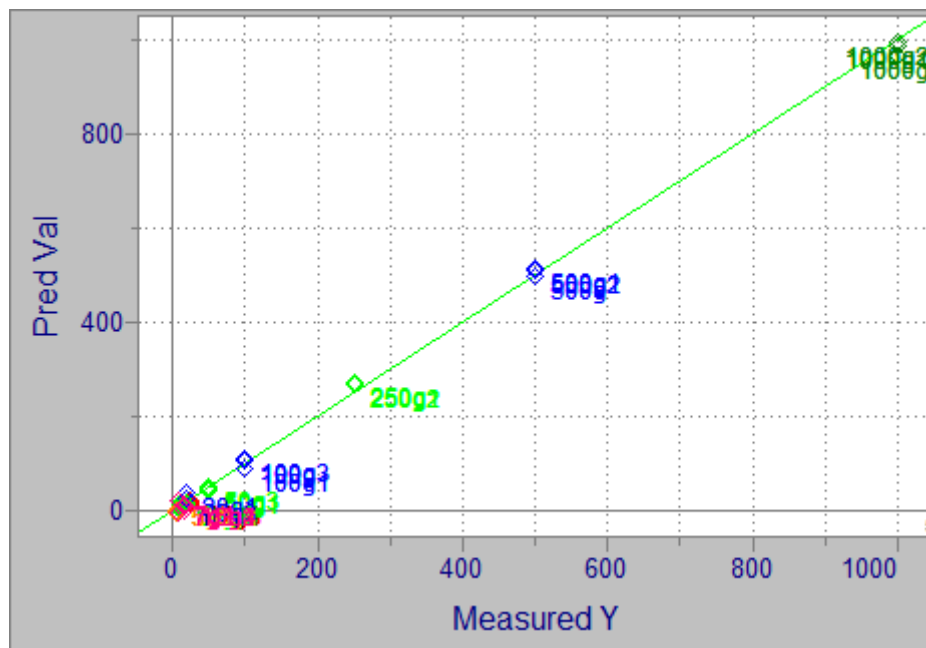
Слика 113. Увеличани регион спектра водених раствора глукозе различите концентрације (опсег од 5-1000mmol/l)

Над добијеним спектрима нису вршене никакве трансформације, већ је одмах извршена линеарна регресија методом најмањих квадрата.

На основу стандардне грешке валидације, која је најмања за 5 урачунатих фактора, пронађено је да је оптималан број фактора у моделу 5, при чему је регресиони коефицијент $r^2=0.999$, а стандардна грешка валидације $RMSEV=10,76\text{mmol/l}$.



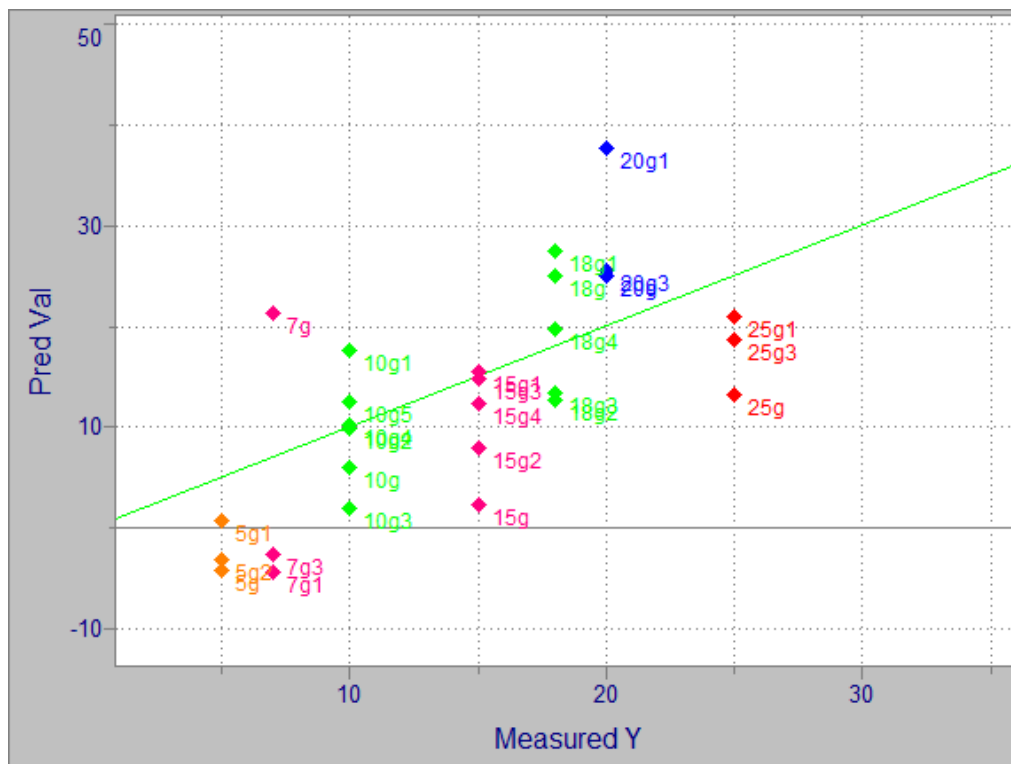
Слика 114. График стандардне грешке валидације. Најмања вредност грешке је за 5 оптималних фактора.



Слика 115. Резултати фитовања модела за номиналне и предвиђене вредности концентрације глукозе водених раствора за ИР спектре

Као што се може видети из Табеле 3 (Прилог 1), иако линеарна зависност постоји и очигледна је на слици 115, прегледом грешака прорачуна, може се видети да већа грешка настаје за мање вредности концентрације глукозе, а уколико се увелича део

линеарне функције са слике 115 уочљиво је да се за мање концентрације губи линеарна зависност и прави много већа грешка (слика 116).

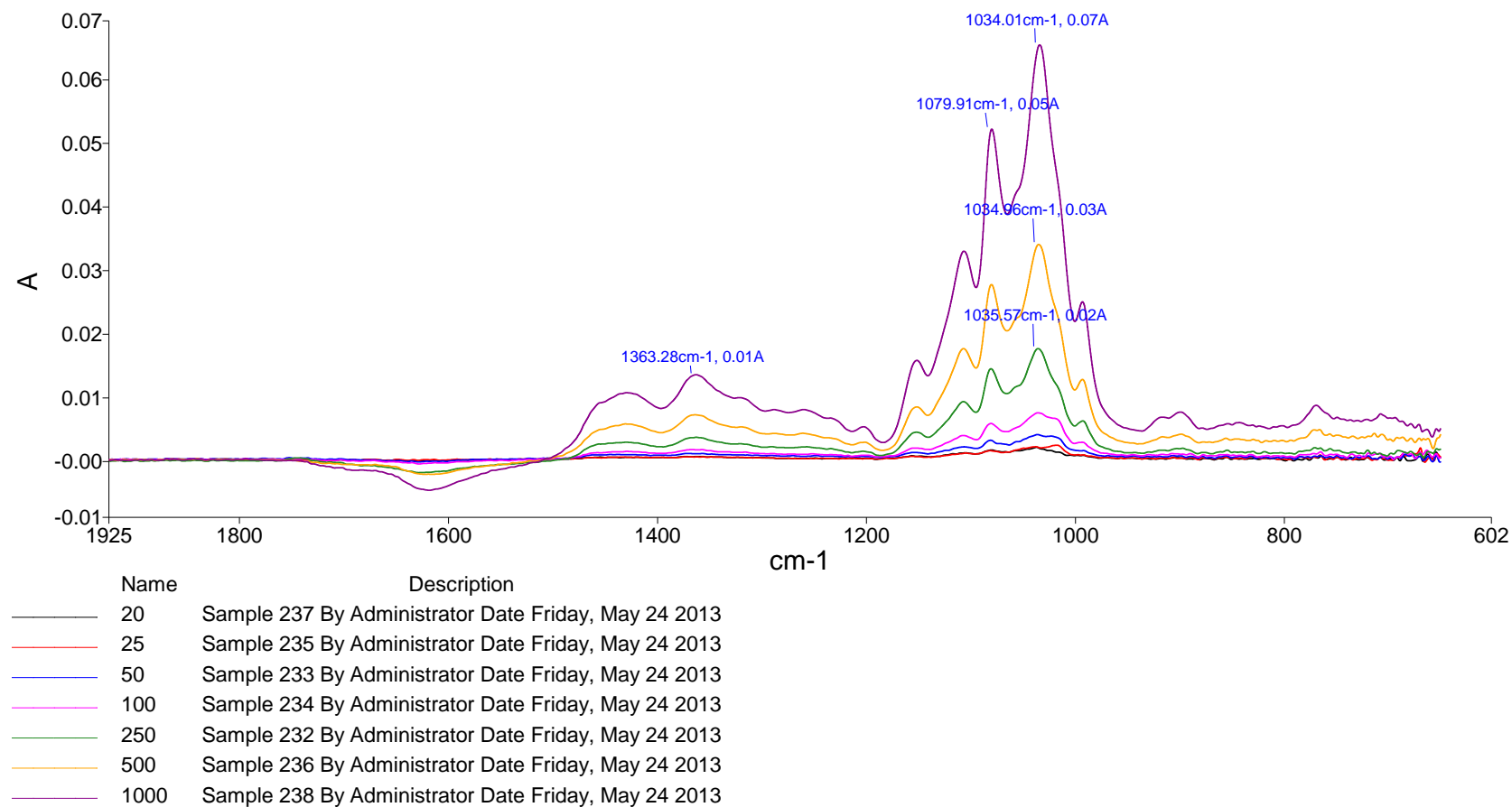


Слика 116. За мање концентрације глукозе у воденим растворима губи се линеарна законитост

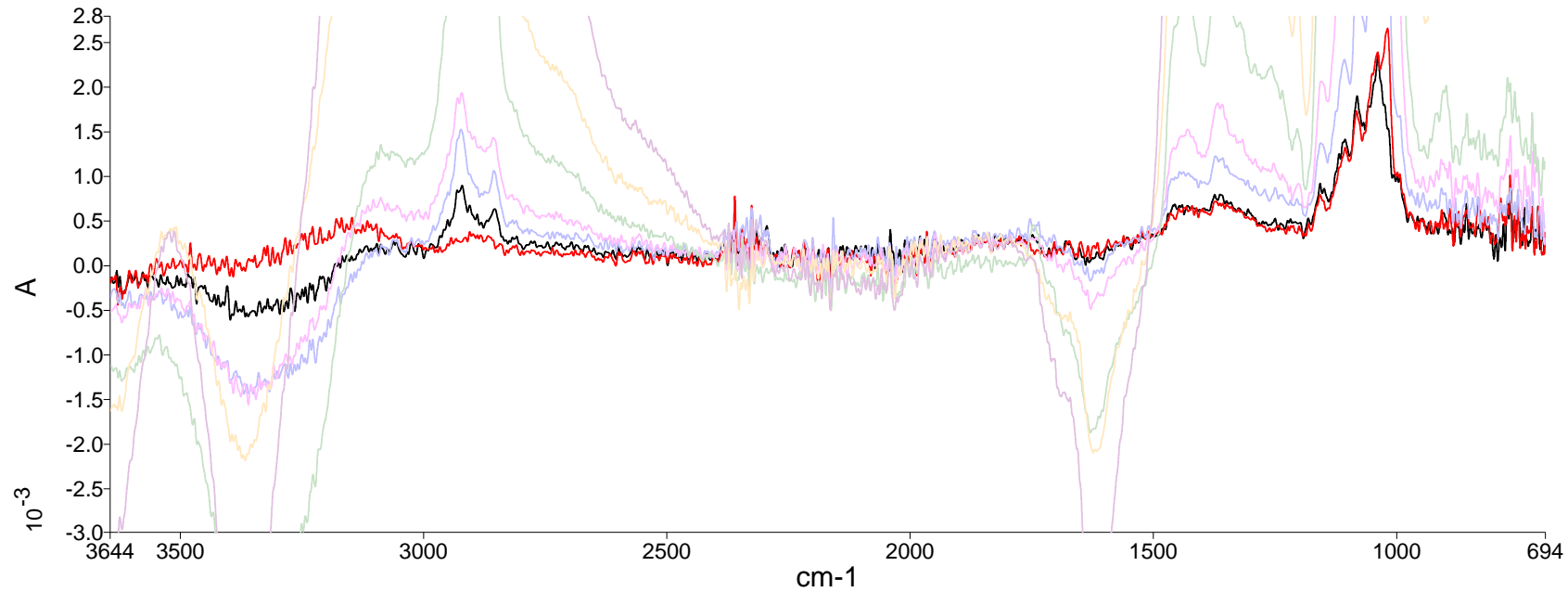
7.3.5.2. Референца вода (Aqua Purificata)

У циљу елиминације воде као потенцијално нежељеног утицаја, спектри водених раствора глукозе снимани су и са чистом водом као референцом. Изглед тако добијених спектра дат је на слици 117. Пикови који одговарају фундаменталној вибрацији глукозе су видљивији, али за мале концентрације глукозе у воденом раствору нису лако уочљиви чак ни при већем увећању (слика 118) и удео шума у сигналу је значајан.

Интересантно је да се у делу који би иначе одговарао истезању ОН весе воде јавља нека врста одзива која се не би могла очекивати (слика 119).

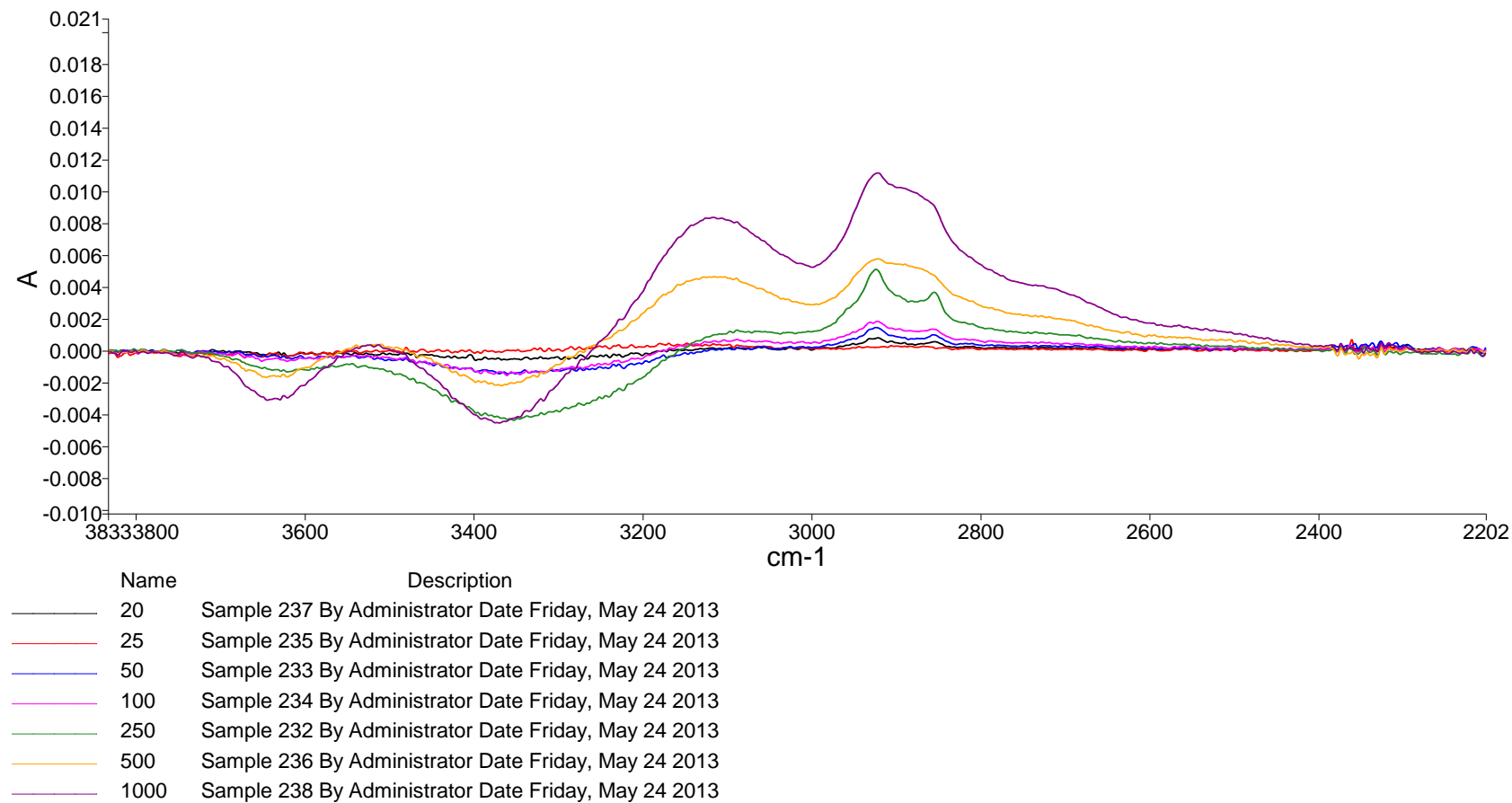


Слика 117. Спектри водених раствора глукозе када је референца чиста вода



Name	Description
— 20	Sample 237 By Administrator Date Friday, May 24 2013
— 25	Sample 235 By Administrator Date Friday, May 24 2013
— 50	Sample 233 By Administrator Date Friday, May 24 2013
— 100	Sample 234 By Administrator Date Friday, May 24 2013
— 250	Sample 232 By Administrator Date Friday, May 24 2013
— 500	Sample 236 By Administrator Date Friday, May 24 2013
— 1000	Sample 238 By Administrator Date Friday, May 24 2013

Слика 118. Увеличани део спектра водених раствора концентрације 20 и 25mmol/l



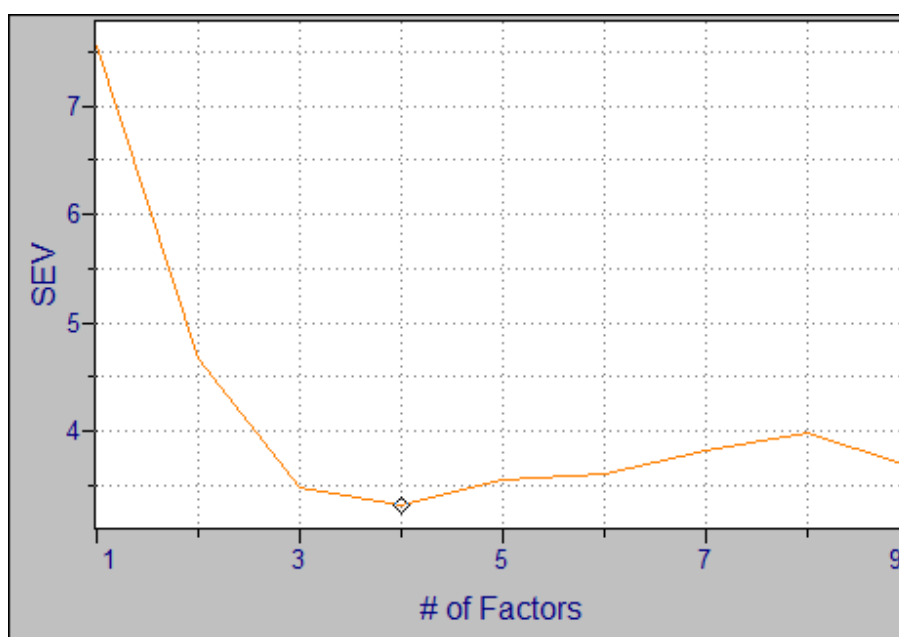
Слика 119. Спектри водених раствора глукозе када је референца чиста вода

7.3.5.3. FTIR спектроскопија: раствори глукозе – референца вода, концентрације од 4-30mmol/l

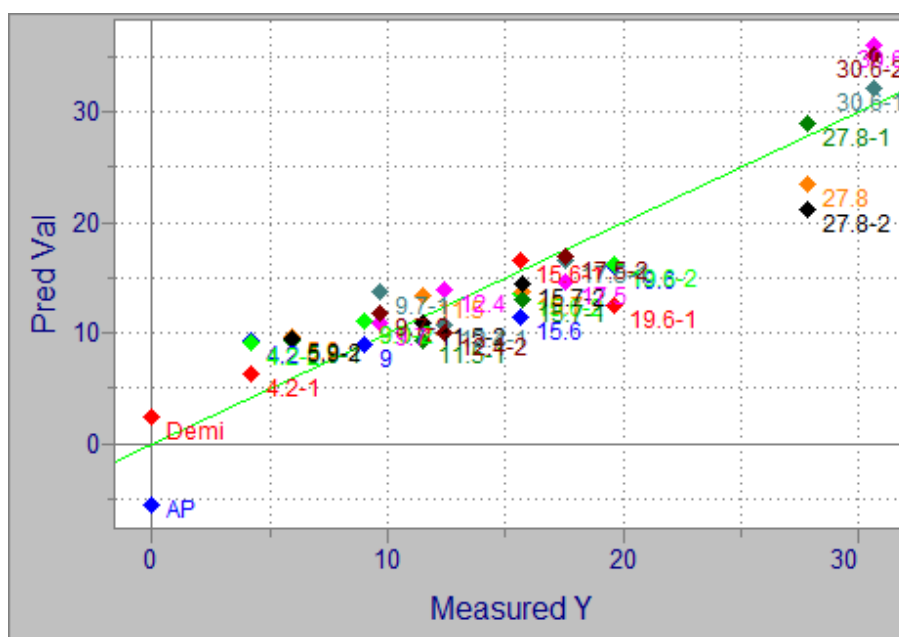
С обзиром на грешке добијене када је парцијална линеарна регресија рађена у односу на номиналне вредности глукозе, експеримент је поновљен са концентрацијама глукозе које могу да се измере апаратом Accu Chek Active.

Над добијеним спектрима водених раствора извршено је осредњавање, нису вршене никакве трансформације, и одмах је извршена линеарна регресија методом најмањих квадрата.

На основу стандардне грешке валидације, која је најмања за 4 урачунатих фактора, пронађено је да је оптималан број фактора у моделу 4, при чему је регресиони коефицијент $r^2=0.91$, а стандардна грешка валидације $RMSEV=3,31\text{mmol/l}$.



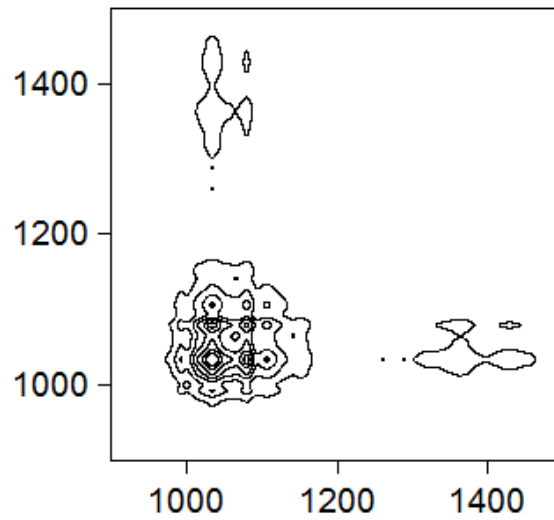
Слика 120. Оптимала број фактора у моделу процењен је да је 4



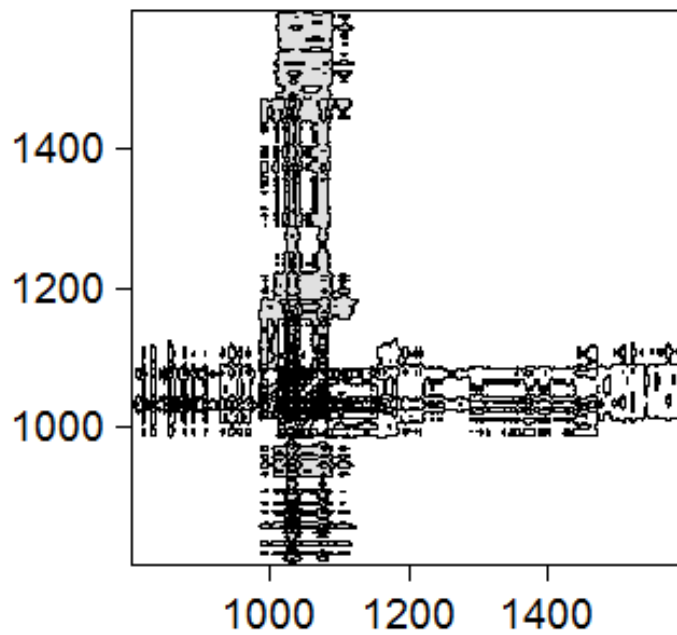
Слика 121. Резултати фитовања модела за номиналне и предвиђене вредности концентрације глукозе водених раствора за ИР спектре

7.4. 2Д корелациона спектроскопија водених раствора глукозе

На сликама 122 и 123 дате су контурне корелационе мапе, синхрона и асинхрона за спектре водених раствора глукозе добијених FTIR спектроскопијом, урађених у софтверу 2DShige.



Слика 122. Синхронни корелациони спектар водених раствора глукозе за средњи ИР регион (softver 2DShige)



Слика 123. Асинхронни корелациони спектар водених раствора глукозе за средњи ИР регион (softver 2DShige)

На синхроној мапи, корелациони спектри су зумирани само на део од $650\text{-}1600\text{cm}^{-1}$, јер је само у том домену откривено постојање корелације.

На синхронном спектру уочавају се снажни аутопикови на 1036 cm^{-1} (најснажнији аутопик са највише флукурација), затим на 994 cm^{-1} , 1082 cm^{-1} , 1109 cm^{-1} и 1156 cm^{-1} .

Снажнији интензитет аутопика указује на већу подложност промени на том таласном броју услед спољашње пертурбације, која је у овом случају изазвана променом концентрације глукозе-

Пикови који се налазе ван дијагонале представљају крос-пикове и могу бити позитивни и негативни. Позитиван знак значи да се пикови на тим таласним бројевима мењају у истом смеру, нпр. заједно расту или заједно опадају приликом неке спољне пертурбације. Негативан знак значи да се пикови мењају у супротном смеру, нпр. један расте док други опада и обрнуто.

На синхроној мапи постоје само позитивни крос пикови између свих појединачних променљивих на којима постоје аутопикови. То значи да се њихове вредности мењају симултано и у истом смеру у зависности од промене концентрације глукозе. Може се закључити да порекло варијација на свих уочених 5 таласних бројева заједничко и потиче од промене концентрације глукозе.

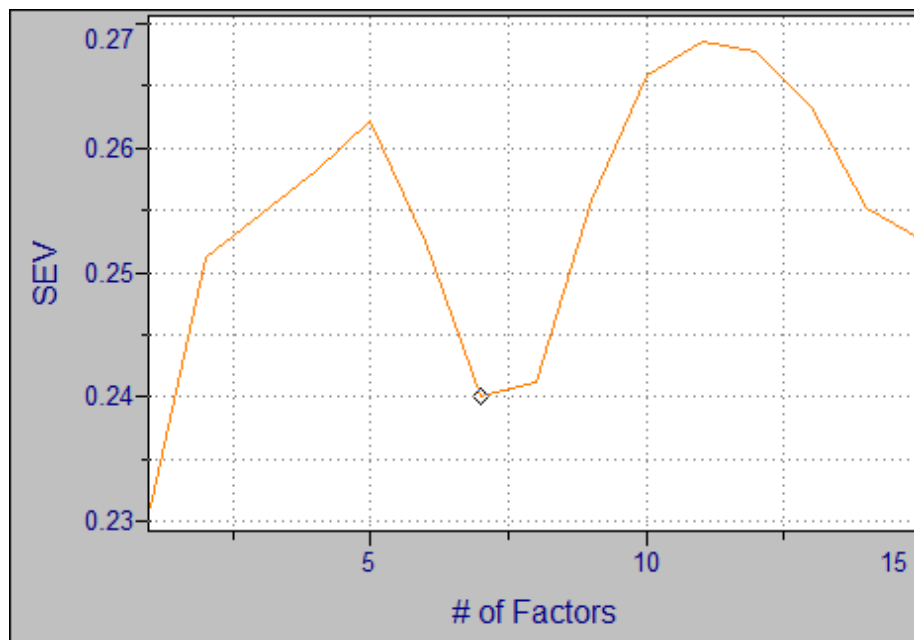
7.5. In vitro испитивања крви

7.5.1. Оптичко-магнетна спектроскопија - Брустеров угао 53°

У овом експерименту концентрација глукозе у крви варира је у опсегу од 4,7-5,7mmol/l. Укупно је на располагању за анализу било 19 спектара. Добијени спектри су препроцесирани коришћењем осредњавања и урађено је заглађивање спектара по Савицки-Голеј алгоритму у 15 тачака. Будући да је мала популација узорака, изабрана је интерна валидација – унакрсна валидација са избацивањем једног спектра при свакој итерацији приликом прављења модела.

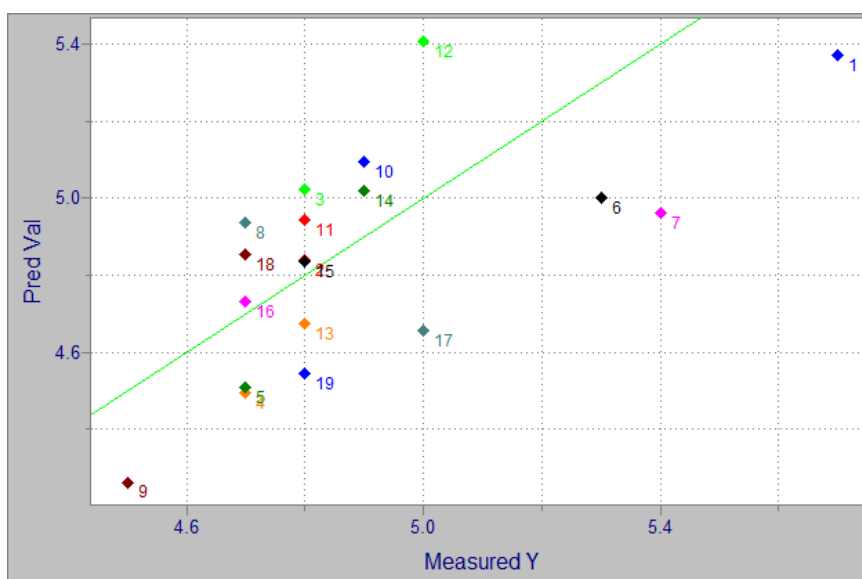
Након тога урађена је линеарна регресија. Оптималан број фактора у моделу усвојено је да је 7 што је одређено на основу минимума грешке валидације (слика 124). За овај

број фактора у моделу коефицијент регресије је износио $r^2=0,65$, а грешка $RMSEV=0,24\text{mmol/l}$.



Слика 124. График стандардне грешке валидације. Најмања вредност грешке је за 7 оптималних фактора.

На слици 125 приказан је резултат фитовања регресионог модела, при чему је уочљиво велико расипање резултата. Међутим, с обзиром да су у питању вредности концентрације глукозе у распону од само 1 mmol/l , то грешке приликом фитовања модела су реално мале, што се може закључити и на основу Табеле 6 (Прилог 1), одакле се може видети да максимална грешка износи $0,4\text{ mmol/l}$. Ипак будући да је коефицијент линеарне регресије 0.6 постоји могућност да зависност између спектралног одзива и концентрације глукозе није линеарна, и да би требало истражити неки други вид регресије на већем броју узорака.



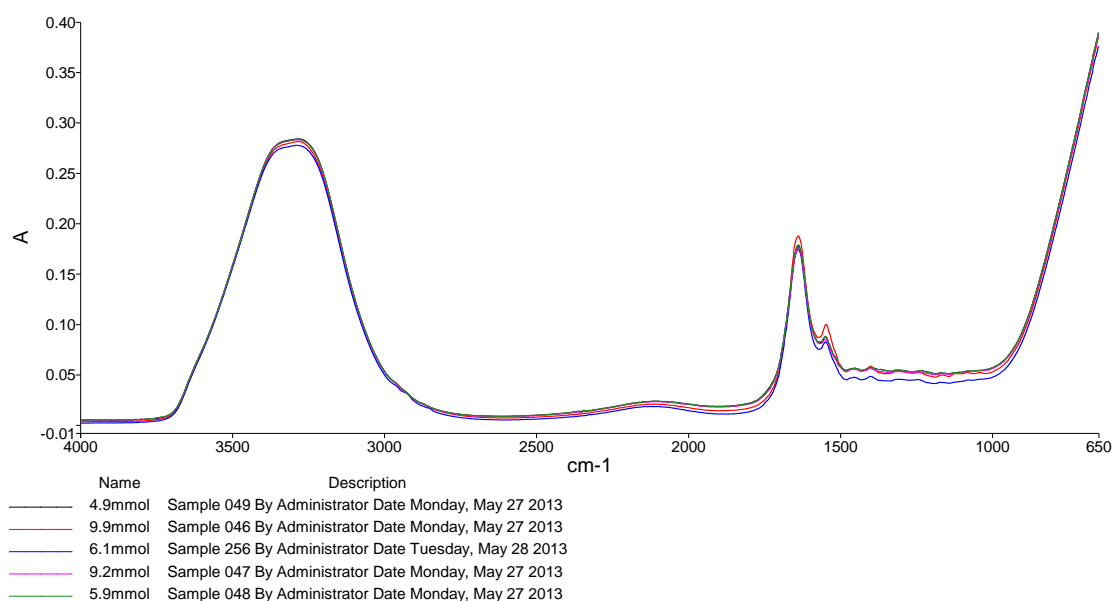
Слика 125. Резултати фитовања модела за измерене и предвиђене вредности концентрације глукозе водених раствора

7.5.2. FTIR ATR спектроскопија крви

На слици 126 приказани су апсорпциони спектри добијени у средњем инфрацрвеном региону за узорке крви различите концентрације глукозе. Са спектра се може видети доминантан утицај воде у крви, са два пика која одговарају валенционим вибрацијама истезања (симетричног и антисиметричног) у региону од $2800-3200\text{cm}^{-1}$ и деформационих вибрација ОН везе на око 1600cm^{-1} . Пик који одговара деформационим вибрацијама ОН везе показује одређене промене које вероватно потичу од хемоглобина. У области око 1000cm^{-1} , где би се могао очекивати пик који одговара фундаменталним вибрацијама глукозе не могу се уочити никакве промене при првом визуелном прегледу, али је очигледно одсуство карактеристичног пика за глукозу што је последица врло мале концентрације глукозе у крви и јаке доминације апсорпције која потиче од воде у крви.

Број узорака за било какву врсту статистичке обраде је недовољан, али је извршена прелиминарна процена могућности да се успостави линеарна веза између концентрације глукозе у крви и одговарајућег одзива у апсорпционом спектру.

Резултати прелиминарне примене линеарне регресије резултирали су добијањем негативног коефицијента регресије што указује на непостојање икакве корелације између концентрације глукозе и било које варијабле у спектру. Међутим, будући да је број узорака од 5, минималан могући, овакви резултати нису изненађујући и постоји могућност да корелација постоји, али је неопходан већи број узорака.

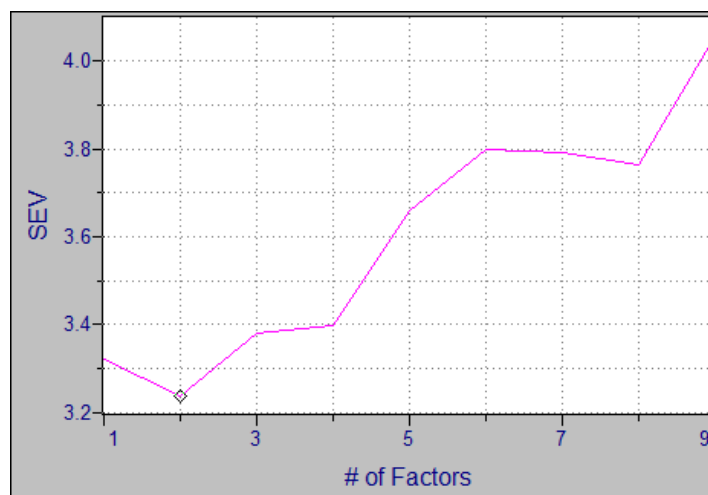


Слика 126. Апсорпциони спектри у средњем инфрацрвеном региону за 5 узорака крви различите концентрације

7.6. *In vivo* испитивања – апарат B53-2UV

7.6.1. Резултати за крвни суд – Брустеров угао 53°

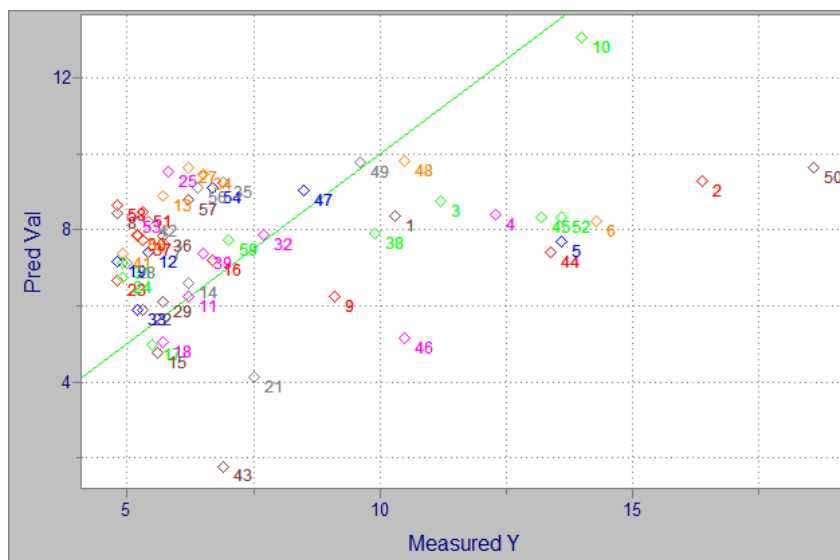
Анализа спектра је вршена за укупно 59 испитаника, и то за спектре добијене само за крвни суд (одузимање спектра коже од спектра крвног суда), како би се умањио утицај оптичких карактеристика коже на исход резултата. За обраду је коришћен само део спектра који нема вредности једнаке нули. Препроцесирање је било осредњавање спектра, и нису вршене никакве додатне трансформације.



Слика 127. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 2

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем једног узорка.

За добијени PLSR модел одређено је на основу вредности грешке валидације (слика 127) да је оптималан број фактора у моделу 2. За овако усвојени број оптималних фактора стандардна грешка валидације износила је $RMSEV=3,237\text{mmol/l}$.



Слика 128. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val)

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,341$, што значи да не постоји добра корелација између вредности измерене референтном методом и вредности прорачунате на основу модела.

Табеларно (Табела 7, Прилог 1) су дате разлике између измерених и предвиђених вредности глукозе за све испитанике.

За референтне и предвиђене вредности концентрације глукозе извршена је Кларкова мрежна анализа грешака и резултат је графички приказан на слици 129.



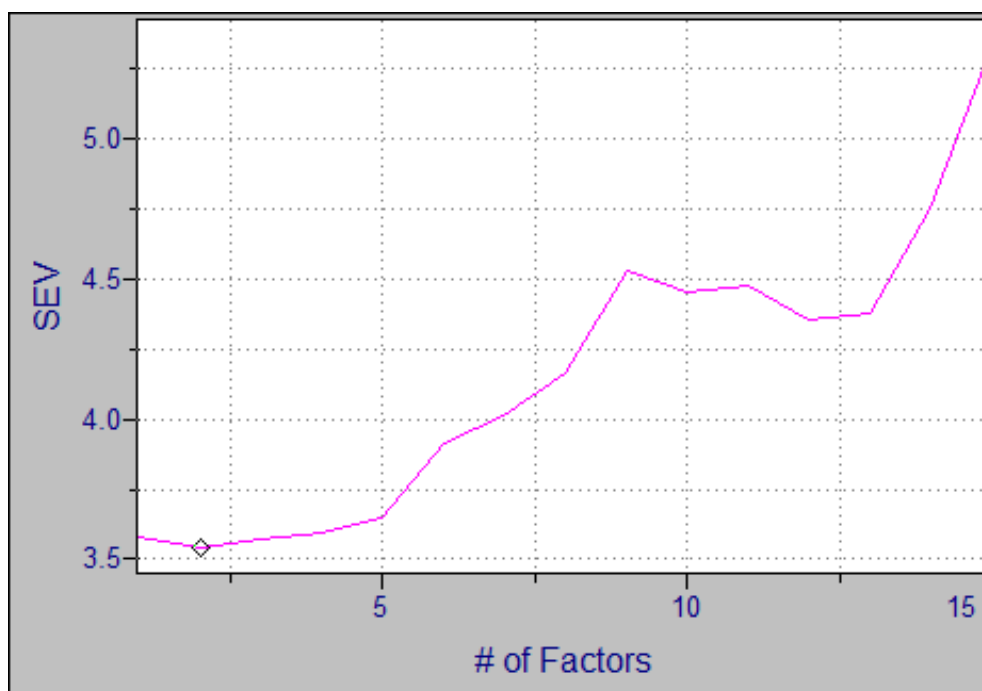
Слика 129. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда

Са графика се може уочити следећа припадност резултата по зонама: Зона А: 32,143%

Зона В: 57.143%, Зона С:0, Зона D:10.714 и Зона Е :0. Вредности у зонама А и В се сматрају клинички прихватљивим, међутим 10.714% предвиђених концентрација налазе се у зони D која представља зону опасних грешака тј. то значи да су стварне вредности глукозе у овој зони ван регије за коју се претпоставља да је потребна терапија, али би испитаник применио погрешну терапију.

7.6.2. Резултати за крвни суд и кожу – UV 1

За обраду је коришћен само део спектра који нема вредности једнаке нули. Препроцесирање је било осредњавање спектра, и нису вршене никакве додатне трансформације.

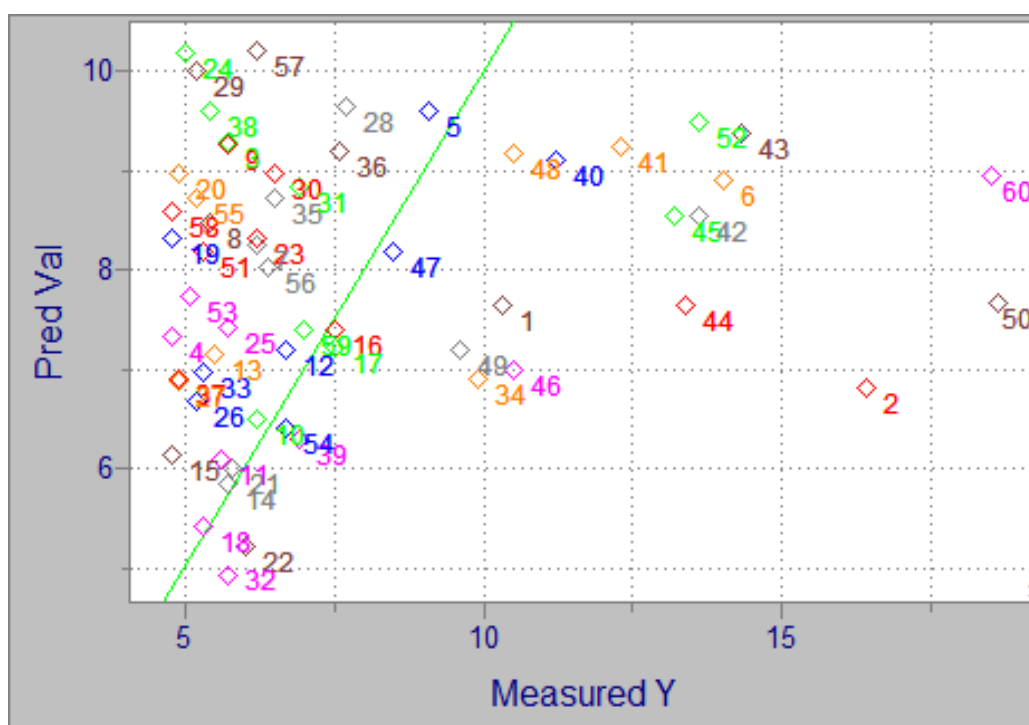


Слика 130. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 2

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем једног узорка.

За добијени PLSR модел одређено је на основу вредности грешке валидације (слика 130) да је оптималан број фактора у моделу 2. За овако одређен број оптималних фактора стандардна грешка валидације износила је $RMSEV = 3,54 \text{ mmol/l}$.

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2 = 0,2$, што значи да не постоји добра корелација између вредности измерене референтном методом и вредности прорачунате на основу модела.



Слика 131. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре коже и крвног суда снимане под УВ1 осветљењем

Табеларно (Прилог 1, Табела 8) су дате разлике између измерених и предвиђених вредности глукозе за све испитанике.

За референтне и предвиђене вредности концентрације глукозе извршена је Кларкова мрежна анализа грешака и резултат је графички приказан на слици 132.



Слика 132. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда

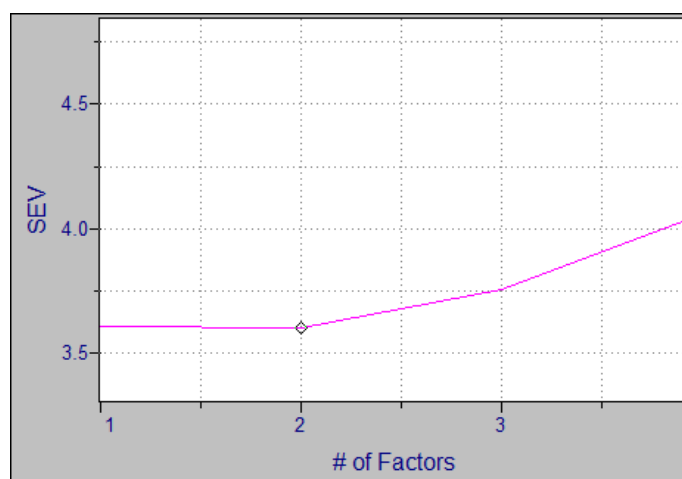
Са графика се може уочити следећа припадност резултата по зонама: Зона А: 26.6667%, Зона В: 61.6667%, Зона С:0, Зона Д: 11.667 и Зона Е :0. Вредности у зонама А и В се сматрају клинички прихватљивим, међутим 11.667% предвиђених концентрација налазе се у зони Д која представља зону опасних грешака.

7.6.3. Резултати за крвни суд и кожу – UV2

За обраду је коришћен само део спектра који нема вредности једнаке нули. Препроцесирање је било осредњавање спектра, и нису вршене никакве додатне трансформације.

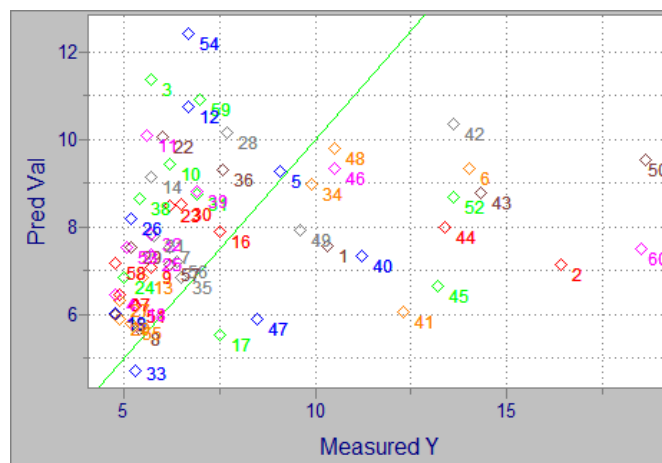
Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем једног узорка.

За добијени PLSR модел одређено је на основу вредности грешке валидације (слика 133) да је оптималан број фактора у моделу 2. За овако одређен број оптималних фактора стандардна грешка валидације износила је $RMSEV = 3,604 \text{ mmol/l}$.



Слика 133. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 2

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,2$, што значи да не постоји добра корелација између вредности измерене референтном методом и вредности прорачунате на основу модела.



Слика 134. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре коже и крвног суда снимане под УВ2 осветљењем

Табеларно (Табела 9, Прилог 1) су дате разлике између измерених и предвиђених вредности глукозе за све испитанике.

За референтне и предвиђене вредности концентрације глукозе извршена је Кларкова мрежна анализа грешака и резултат је графички приказан на слици 135.



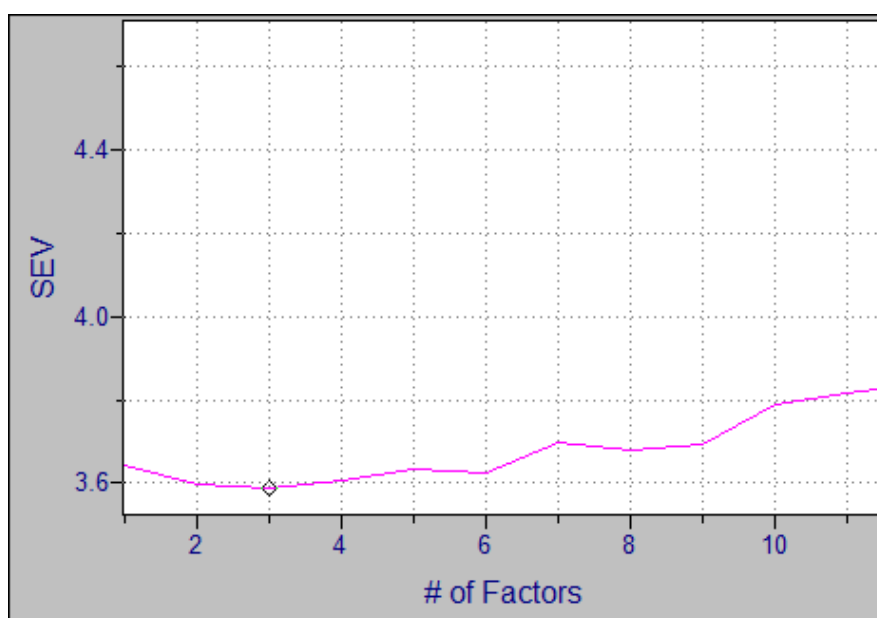
Слика 135. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда

Са графика се може уочити следећа припадност резултата по зонама: Зона А: 23.333%, Зона В: 65.000%, Зона С:0, Зона D: 11.6667 и Зона Е :0. Вредности у зонама А и В се сматрају клинички прихватљивим, међутим 11.6667% предвиђених концентрација налазе се у зони D која представља зону опасних грешака.

7.7. In vivo испитивања опто-магнетном имицинг спектроскопијом апарат WP – B60

7.7.1. Резултати обраде за слике коже

За обраду је коришћен само део спектра који нема вредности једнаке нули. Препроцесирање је било осредњавање спектра, и нису вршене никакве додатне трансформације. Након извршене PCA анализе уклањани су оутлајери и спроведена је регресиона анализа над спектрима коже укупно 213 испитаника.

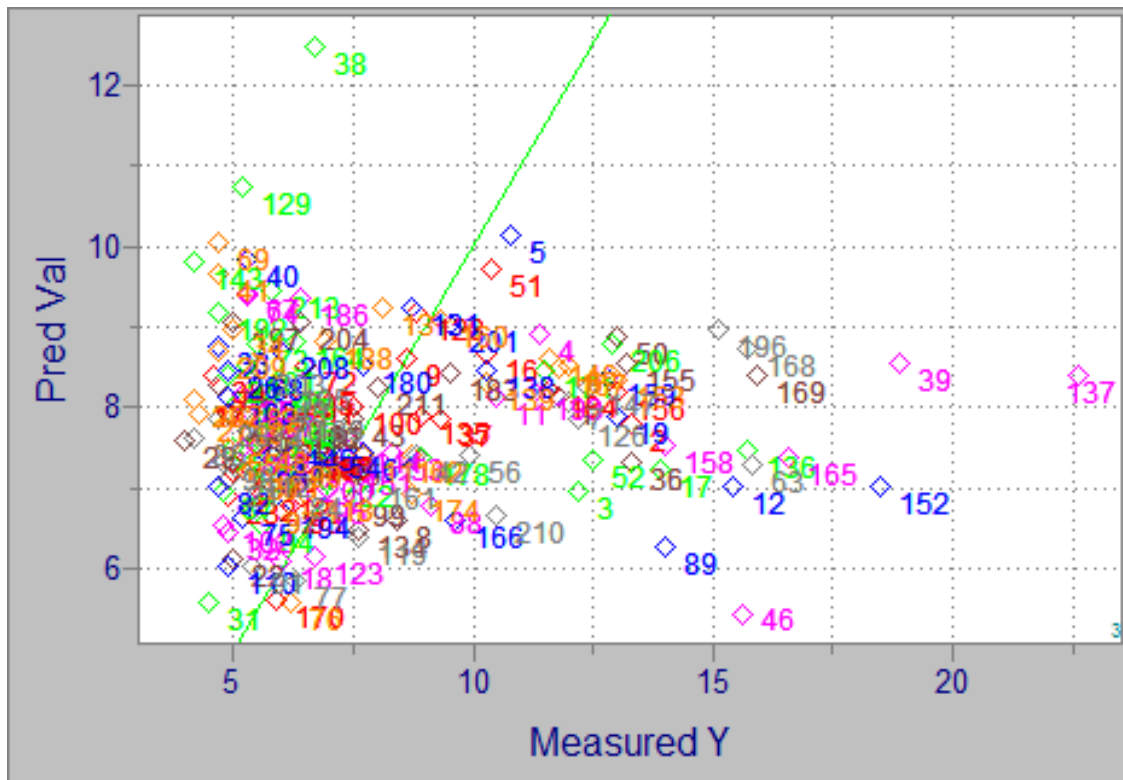


Слика 136. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 3

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем једног узорка.

За добијени PLSR модел одређено је на основу вредности грешке валидације (слика 136) да је оптималан број фактора у моделу 3. За овако одређен број оптималних фактора стандардна грешка валидације износила је $RMSEV = 3,588 \text{ mmol/l}$.

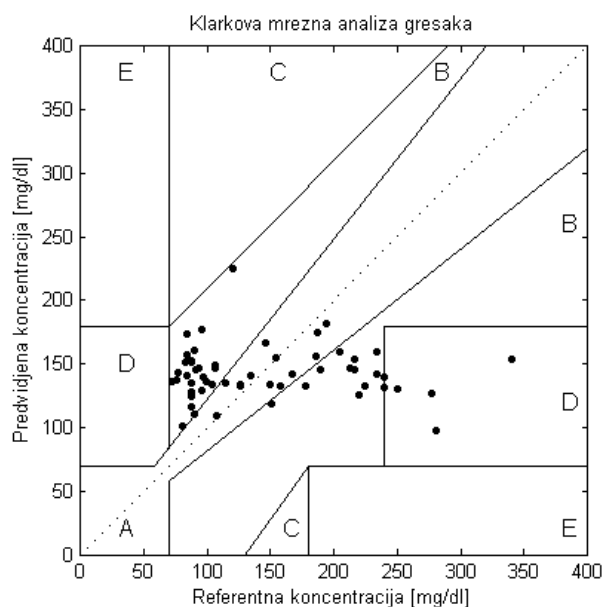
Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,05$, што значи да линеарна регресија није добар модел јер не постоји корелација између вредности измерене референтном методом и вредности прорачунате на основу модела и да је вероватно да веза уколико постоји није линеарног типа.



Слика 137. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре коже снимане под Брустеровим углом од 60°

Табеларно (Табела 10, Прилог 1) су дате разлике између измерених и предвиђених вредности глукозе за све испитанике.

За референтне и предвиђене вредности концентрације глукозе извршена је Кларкова мрежна анализа грешака и резултат је графички приказан на слици 138.



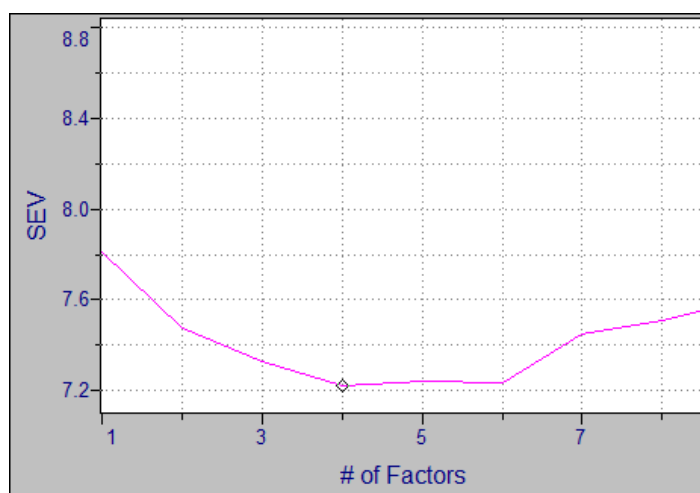
Слика 138. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда

Са графика се може уочити следећа припадност резултата по зонама: Зона А: 7.0652%, Зона В: 90.761%, Зона С:0, Зона Д: 2.174 и Зона Е :0. Вредности у зонама А и В се сматрају клинички прихватљивим, једино 2.1739% предвиђених концентрација у зони Д која представља зону опасних грешака.

7.7.2. Резултати обраде за слике коже и крвног суда

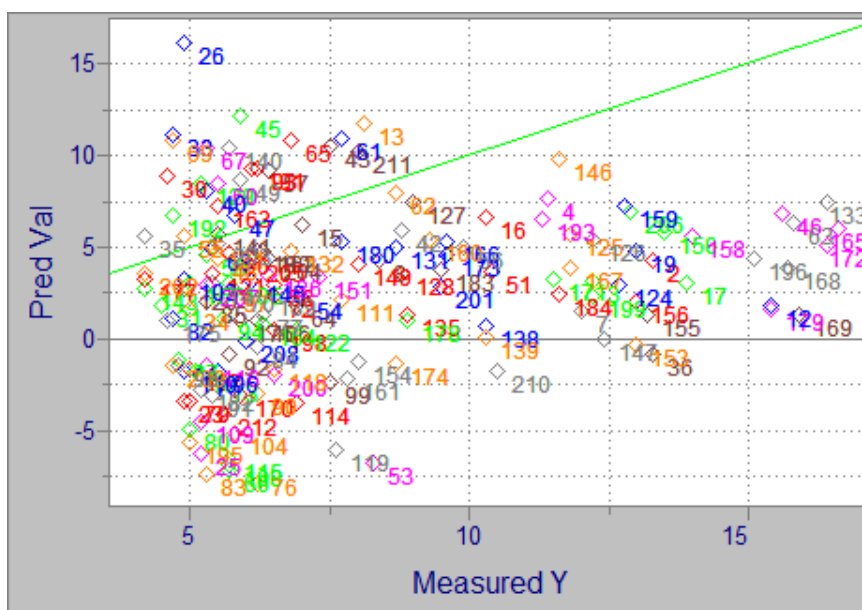
За обраду је коришћен само део спектара који нема вредности једнаке нули. Препроцесирање је било осредњавање спектара, и нису вршене никакве додатне трансформације. Након извршене PCA анализе уклањани су оутлајери и спроведена је регресиона анализа.

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем једног узорка. За добијени PLSR модел одређено је на основу вредности грешке валидације (слика 139) да је оптималан број фактора у моделу 4. За овако одређен број оптималних фактора стандардна грешка валидације износила је $RMSEV = 7,213 \text{ mmol/l}$.



Слика 139. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,2$ што значи да нејвероватније линеарна регресија није добар модел. Није установљена корелација између вредности измерене референтном методом и вредности прорачунате на основу модела.



Слика 140. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре коже и крвног суда сниманих под Брустеровим углом од 60°

Табеларно су дате разлике између измерених и предвиђених вредности глукозе за све испитанике (Прилог 1, Табела 11).

За референтне и предвиђене вредности концентрације глукозе извршена је Кларкова мрежна анализа грешака и резултат је графички приказан на слици 141.



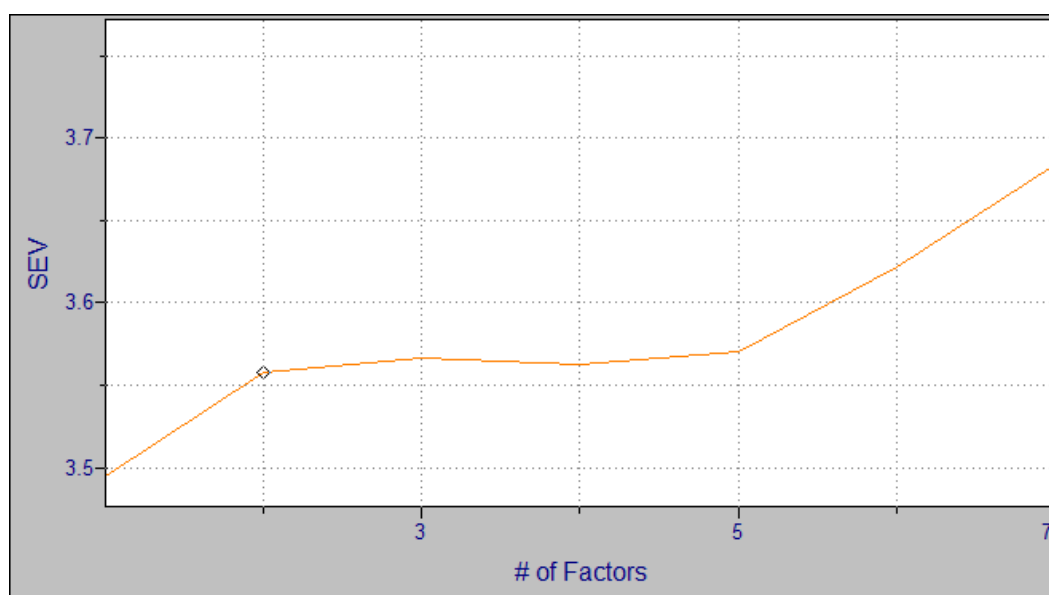
Слика 141. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда

Са графика се може уочити следећа припадност резултата по зонама: Зона А: 10.744 %, Зона В: 61.9835%, Зона С: 5.785, Зона D: 6.612% и Зона Е : 14.8760. Вредности у зонама А и В су клинички прихватљиве. Резултати у зонама С, D и Е су потенцијално опасне и могу водити последицама опасним по живот пацијента.

7.7.3. Резултати обраде за крвни суд

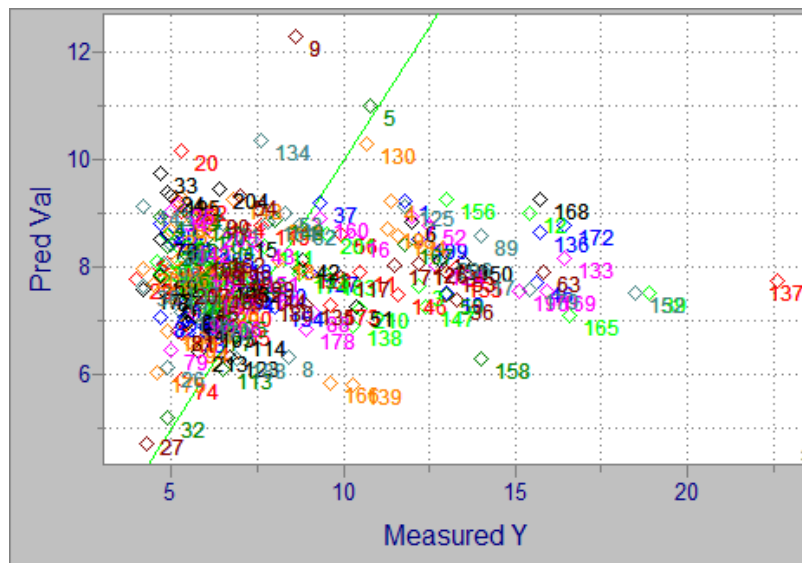
За обраду је коришћен само део спектра који нема вредности једнаке нули. Препроцесирање је било осредњавање спектра, и нису вршене никакве додатне трансформације. Након извршене PCA анализе уклањани су оутлајери и спроведена је регресиона анализа.

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем једног узорка. За добијени PLSR модел није се могао одредити оптималан број фактора у моделу на основу грешке валидације (слика 142) јер она показује тренд сталног пораста, али је усвојено на основу максимално постигнутог коефицијента регресије да је оптималан број фактора у моделу 4. За овако одређен број оптималних фактора стандардна грешка валидације износила је $RMSEV = 3,562 \text{ mmol/l}$.



Слика 142. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,102$ што значи да нејвероватније линеарна регресија није добар модел. Није установљена корелација између вредности измерене референтном методом и вредности прорачунате на основу модела.



Слика 143. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за опто-магнетне спектре коже и крвног суда сниманих под Брустеровим углом од 60°

Табеларно су дате разлике између измерених и предвиђених вредности глукозе за све испитанике (Прилог 1, Табела 12).



Слика 144. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда

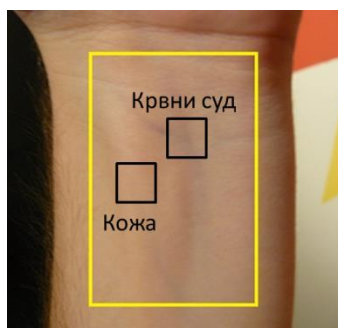
За референтне и предвиђене вредности концентрације глукозе извршена је Кларкова мрежна анализа грешака и резултат је графички приказан на слици 144.

Са графика се може уочити следећа припадност резултата по зонама: Зона А: 26,067 %, Зона В: 65,877%, Зона С: 0, Зона D: 8,057% и Зона Е : 0. Вредности у зонама А и В су клинички прихватљиве. Резултати у зони С су потенцијално опасни.

7.8. In vivo испитивања – хиперспектрални имиџинг

Будући да хиперспектрална слика даје огромну количину информација, са хиперспектралних слика добијених за оба региона – SWIR (950-1700nm) и VNIR (450-1000nm) су издвајани само одређени делови слике – за сваку слику по један регион са јасно видљивим крвним судом и по један просторно врло близак регион на којем је видљива само кожа.

Тако добијени региони коже и крвног суда за сваку хиперспектралну слику којој одговара одређена измерена вредност концентрације глукозе у крви испитаника – представљају сами по себи умањене хиперспектралне слике коже и крвног суда. Свака од овако добијених хиперспектралних слика је развијена тако да сваком пикселу слике одговара један добијени спектар. Свака од ових слика била је површине 40*40 пиксела, што даје 1600 спектра по једном региону коже односно једном региону коже са видљивим крвним судом (слика 145).



Слика 145. Издвајени региони са хиперспектралне слике са којих су издвајени спектри крвног суда, односно коже

Процесирање овако добијених спектра вршено је на три начина. Калибрација у односу на измерене вредности глукозе вршена је само за регионе коже, затим само за регионе крвног суда и најзад за одузимање коже од крвног суда, како би се умањио утицај хромофора карактеристичних само за кожу и добиле спектралне информације само за крвни суд. У наставку су дати резултати парцијалне регресије методом најмањих квадрата за сваки спектрални регион SWIR (950-1700nm) и VNIR (450-1000nm) и сва три начина обраде.

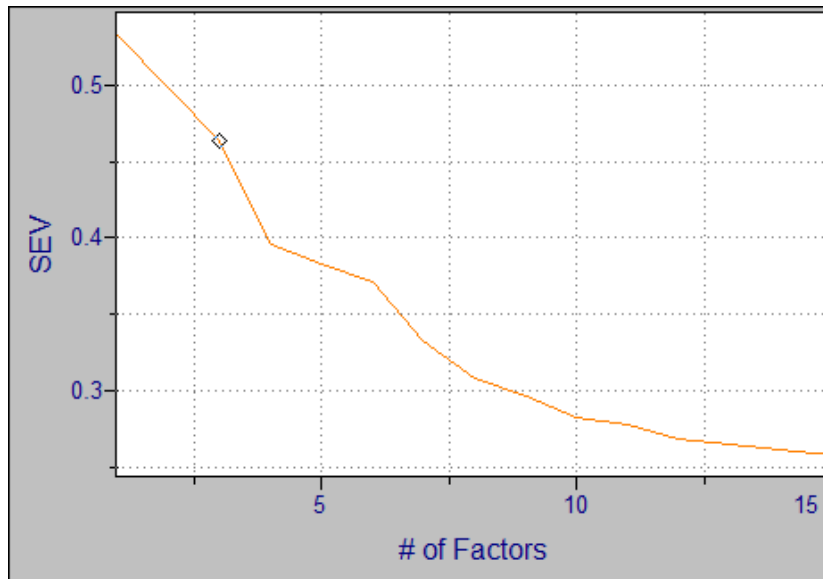
7.8.1. SWIR регион – кожа

Обрада спектра рефлектансе започета је препроцесирањем односно осредњавањем спектра, и вршено је заглађивање спектра по алгоритму Савицки – Голај (21 тачка). Након извршене PCA анализе уклањани су оутлајери и спроведена је регресиона анализа.

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем 10 спектра.

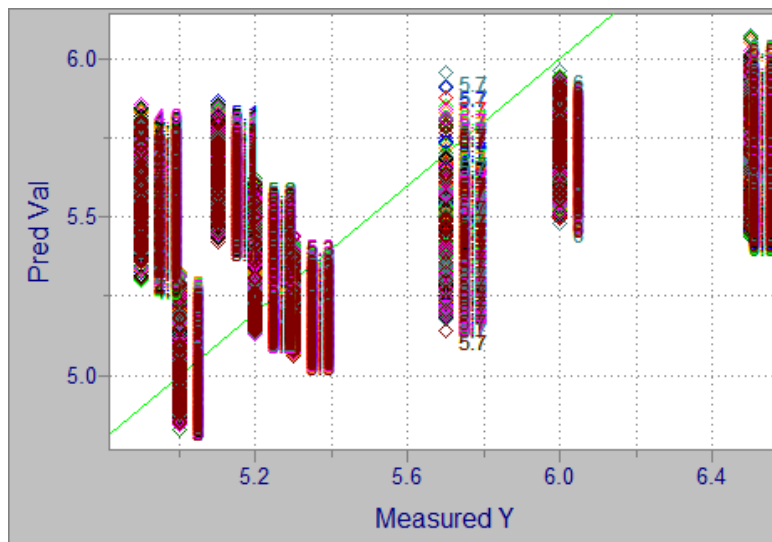
На основу вредности грешке валидације (слика 146) као и процента објашњених варијација у моделу (99%) одређено је да је оптималан број фактора у моделу 3.

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,515$ при чему је стандардна грешка валидације била $RMSEV=0.46\text{mmol/l}$. Иако коефицијент регресије није велик, овако мала грешка валидације, будући да је добијена за јако велик број спектра може бити показатељ добре регресије.



Слика 146. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 3

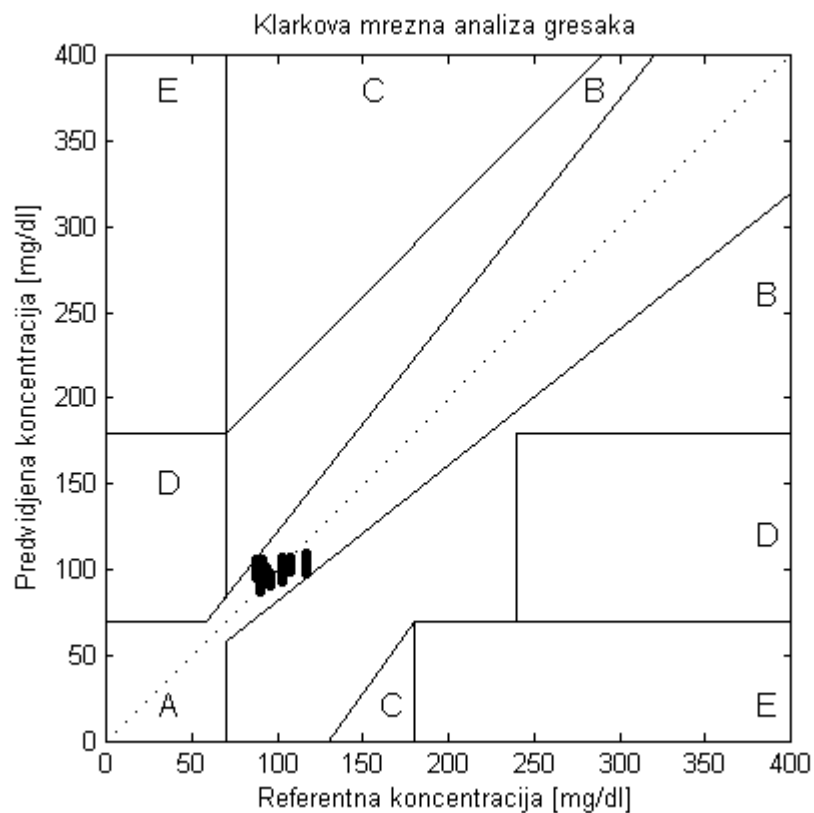
На слици 147 приказан је резултат фитовања регресионог модела, при чему је уочљиво велико расипање резултата. Међутим, с обзиром да су у питању вредности концентрације глукозе у распону од само 1 mmol/l, то грешке приликом фитовања модела су реално мале.



Слика 147. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за хиперспектралне слике коже у SWIR региону

За референтне и предвиђене вредности концентрације глукозе извршена је Кларкова мрежна анализа грешака и резултат је графички приказан на слици 148.

Са графика се може уочити да сви резултати припадају зони А: 100%, што значи да све предвиђене вредности концентрације глукозе одступају од референтне за највише 20% и сматрају се апсолутно клинички прихватљивим.



Слика 148. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда

7.8.2. SWIR регион – кожа и крвни суд

Обрада спектра рефлектансе започета је препроцесирањем односно осредњавањем спектра, и урађено је заглађивање спектра по Савицки Голеј алгоритму

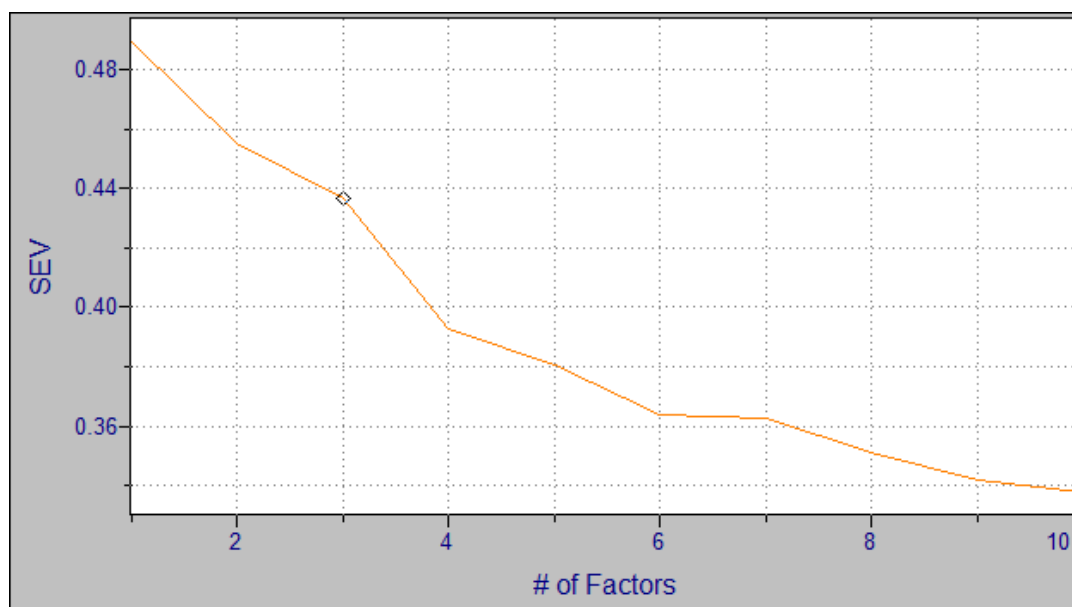
полиномијалним фитовањем у 21 тачки. Након извршене РСА анализе уклањани су оутлајери и спроведена је регресиона анализа.

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем 10 спектра у једној итерацији.

На основу вредности грешке валидације (слика 149) као и процента објашњених варијација у моделу (99.2%) одређено је да је оптималан број фактора у моделу 3.

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,6$ при чему је стандардна грешка валидације била $RMSEV=0.43\text{mmol/l}$. Коефицијент регресије је нешто већи у односу на регресиони модел рађен само за спектре коже, а и мања је стандардна грешка валидације.

На слици 150 приказан је резултат фитовања регресионог модела, при чему је уочљиво велико расипање резултата. Међутим, с обзиром да су у питању вредности концентрације глукозе у распону од само 1mmol/l , то грешке приликом фитовања модела су реално мале.



Слика 149. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 3

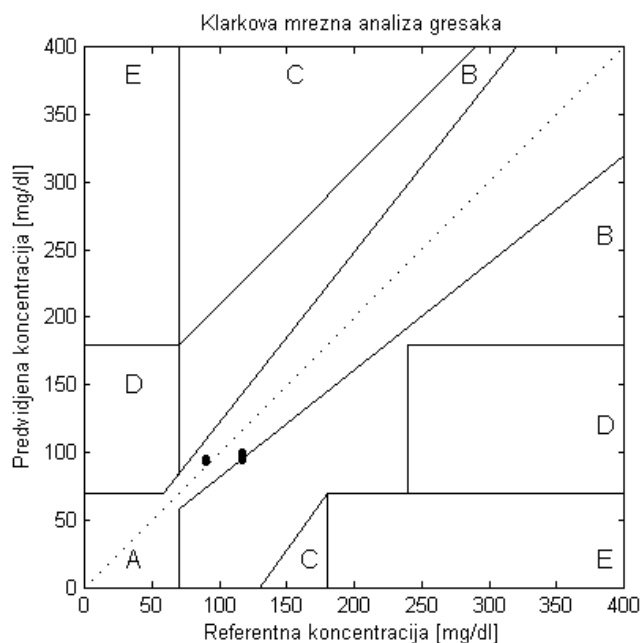
Као и у претходном случају, може се уочити да веће расипање предвиђених вредности наступа у случају измерених мањих концентрација глукозе у крви.

За референтне и предвиђене вредности концентрације глукозе извршена је Кларкова мрежна анализа грешака и резултат је графички приказан на слици 151.

Са графика се може уочити следећа припадност резултата по зонама: Зона А: 1.744 %, Зона В: 98.835, док у зонама С, D и Зона Е по 0%. Вредности у зонама А и В су клинички прихватљиве. Одступања у зони В су већа од 20% али је ово одступање бенигног карактера или не захтева корективну терапију.



Слика 150. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за хиперспектралне слике коже и крвног судау SWIR региону



Слика 151. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда

7.8.3. SWIR регион крвни суд– спектри коже одузети од спектра крвног суда

Обрада спектра рефлектансе започета је препроцесирањем односно осредњавањем спектра, и вршено је заглађивање спектра по алгоритму Савицки – Голај (21 тачка). Након извршене PCA анализе уклањани су оутлајери и спроведена је регресиона анализа.

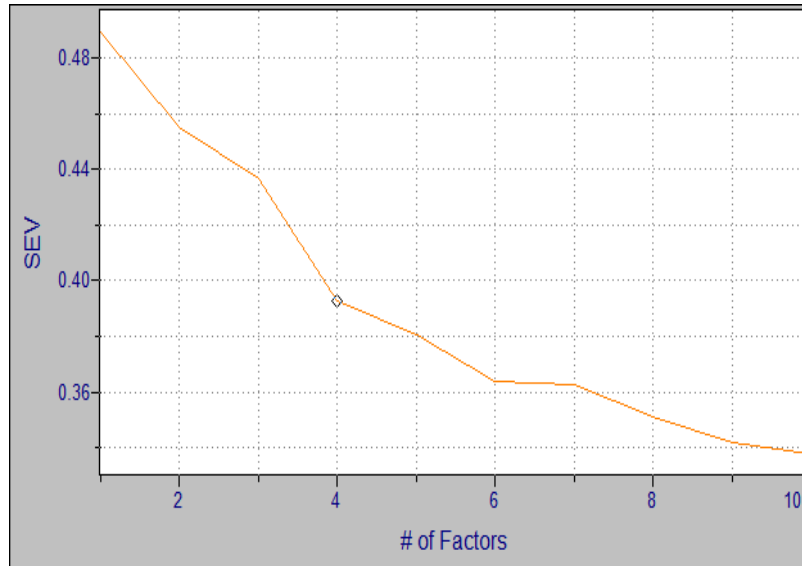
Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем 10 спектра.

На основу вредности грешке валидације (слика 152) као и процента објашњених варијација у моделу (99,5%) одређено је да је оптималан број фактора у моделу 4.

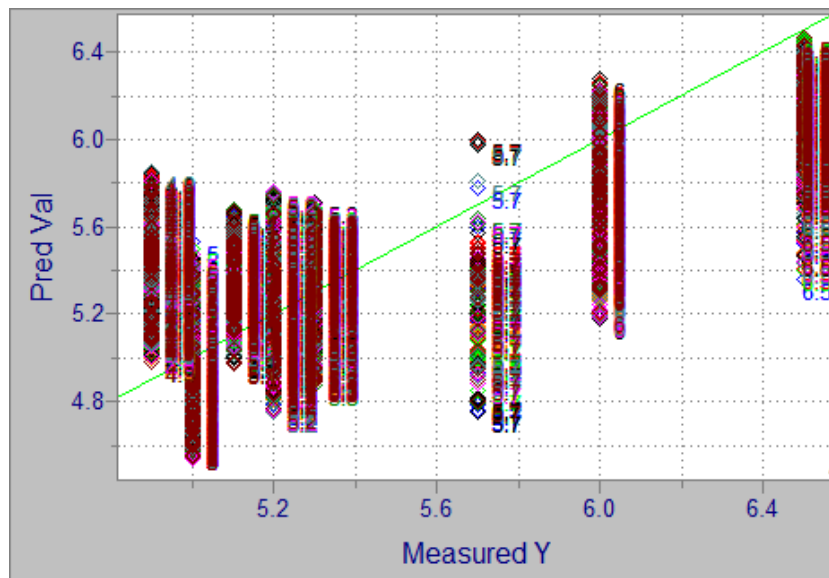
Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,76$ при чему је стандардна грешка валидације била $RMSEV=0.35\text{mmol/l}$. Коефицијент регресије је

прилично велик, грешка валидације је мала, и будући да су резултати добијени за јако велик број спектра ово може указивати на јако добру остварену линеарну регресију.

На слици 153 приказан је резултат фитовања регресионог модела.

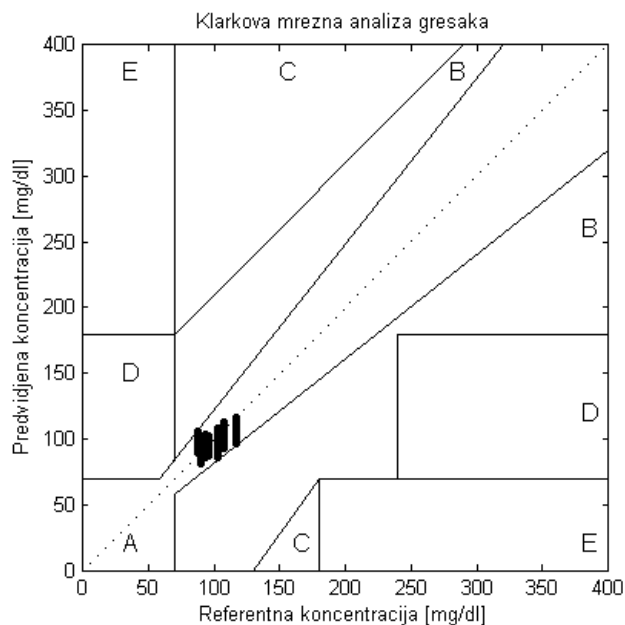


Слика 152. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4



Слика 153. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за хиперспектралне слике крвног суда у SWIR региону

За референтне и предвиђене вредности концентрације глукозе извршена је Кларкова мрежна анализа грешака и резултат је графички приказан на слици 154.

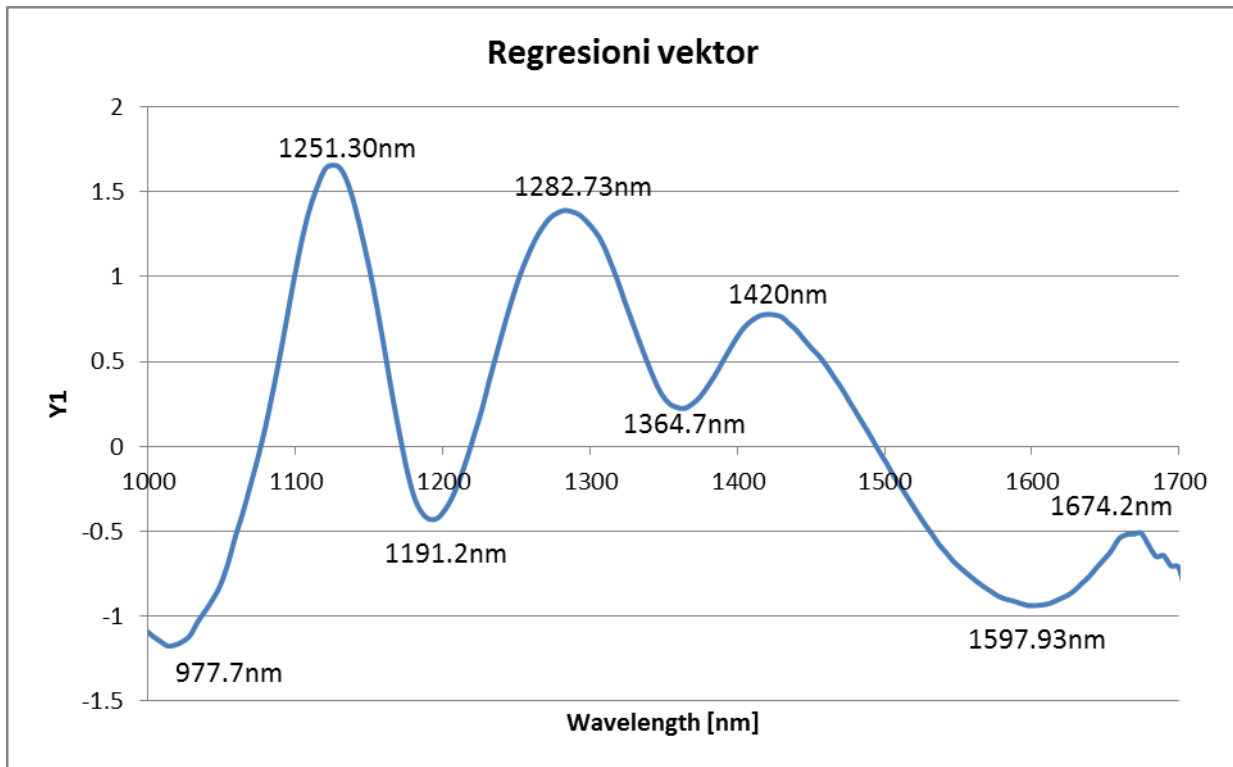


Слика 154. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда

Са графика се може уочити да сви резултати припадају зони А: 100%, што значи да све предвиђене вредности концентрације глукозе одступају од референтне за највише 20% и сматрају се апсолутно клинички прихватљивим.

За овако добијен регресиони модел дат је регресиони вектор који указује на то које су таласне дужине у спектрима значајне са становишта перурбација изазваних глукозом.

На основу регресионог вектора уочено је да су важне таласне дужина на којима долази до промене у рефлектанси услед промене концентрације глукозе следеће: 977.7nm, 1250,13nm, 119.22nm, 1282.73nm, 1364,7nm, 1420nm, 1597,93nm и 1674.19nm.



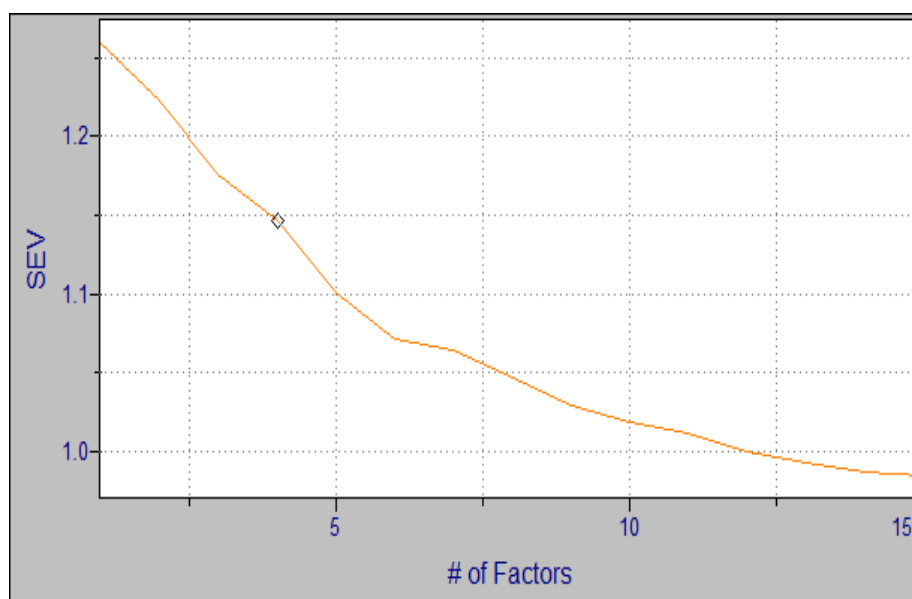
Слика 155. Регресиони вектор за PLSR модел развијен на основу спектра са хиперспектралне слике крвног суда у SWIR региону

7.8.4. VNIR регион –кожа

Због јако великог шума на краћим таласним дужинама, само је коришћен у обради регион таласних дужина од 450nm до 1000nm. Препроцесирање је било осредњавање спектра, и урађено је заглађивање спектра (Савицки-Голеј алгоритам, 21 тачка). Након извршене PCA анализе и уклањања оутлајера, спроведена је регресиона анализа.

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем 10 спектра.

За добијени PLSR модел одређено је на основу вредности грешке валидације (слика 156) да је оптималан број фактора у моделу 4. Оптималан број фактора није одређиван на основу минимума стандардне грешке валидације, већ узимајући у обзир и укупан проценат објашњених варијација у спектрима који је за 4 фактора износио 99,3%.

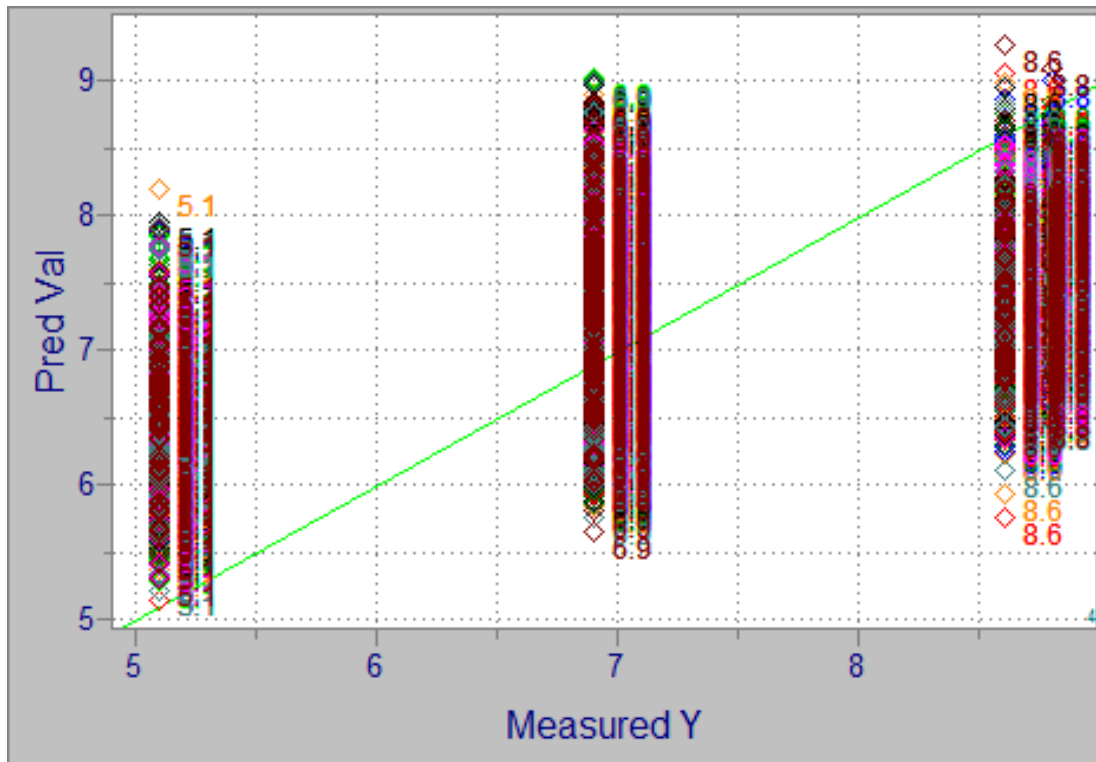


Слика 156. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,583$ при чему је стандардна грешка валидације била $RMSEV=1,15\text{mmol/l}$. Коефицијент регресије није прилично велик, а грешка валидације је релативно велика.

На слици 157 приказан је резултат фитовања регресионог модела.

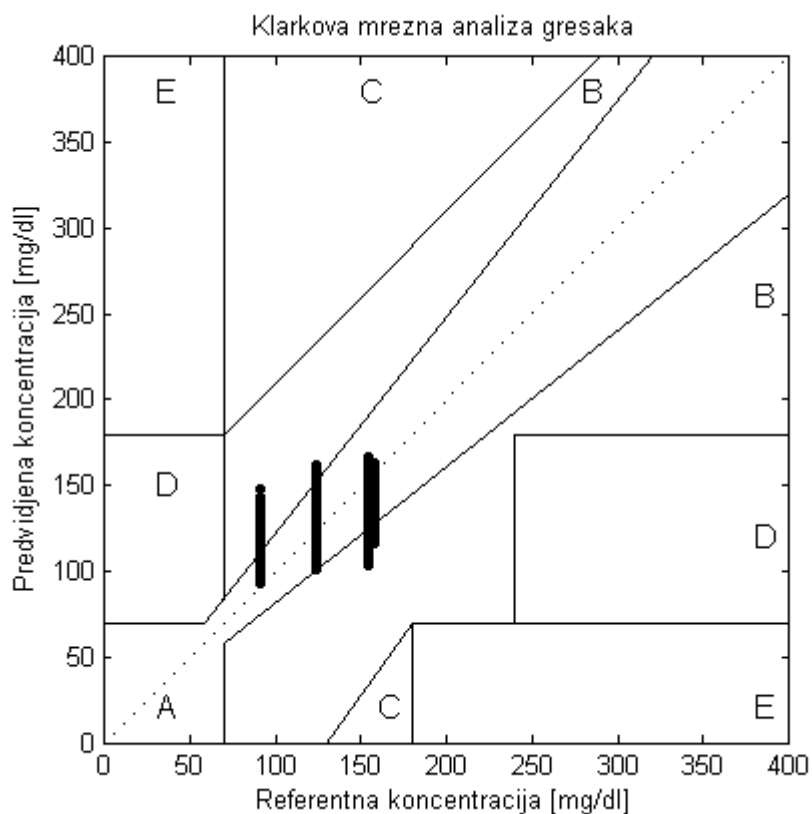
С обзиром да је коефицијент корелације релативно низак, а стандардна грешка валидације висока ако се узме у обзир распон вредности концентрације глукозе на основу којих је калибрисан модел ($5\text{-}8\text{mmol/l}$) то значи да највероватније линеарна регресија није добар модел. Вероватније је међутим, да је регресиони модел прављен за сувише мали распон различитих вредности глукозе.



Слика 157. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за хиперспектралне слике коже у VNIR региону

За референтне и предвиђене вредности концентрације глукозе извршена је Кларкова мрежна анализа грешака и резултат је графички приказан на слици 158.

Са графика се може уочити следећа припадност резултата по зонама: Зона А: 77.003%, Зона В: 22.997%, Зона С: 0%, Зона D: 0% и Зона Е : 0%. Вредности у зонама А и В су клинички прихватљиве.



Слика 158. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда

7.8.5. VNIR регион – крвни суд

Због јако великог шума на краћим таласним дужинама, само је коришћен у обради регион таласних дужина од 450nm до 1000nm. Препроцесирање је било осредњавање спектра, и урађено је заглађивање спектра (Савицки-Голеј алгоритам, 21 тачка). Након извршене PCA анализе и уклањања оутлајера, спроведена је регресиона анализа.

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем 10 спектра.

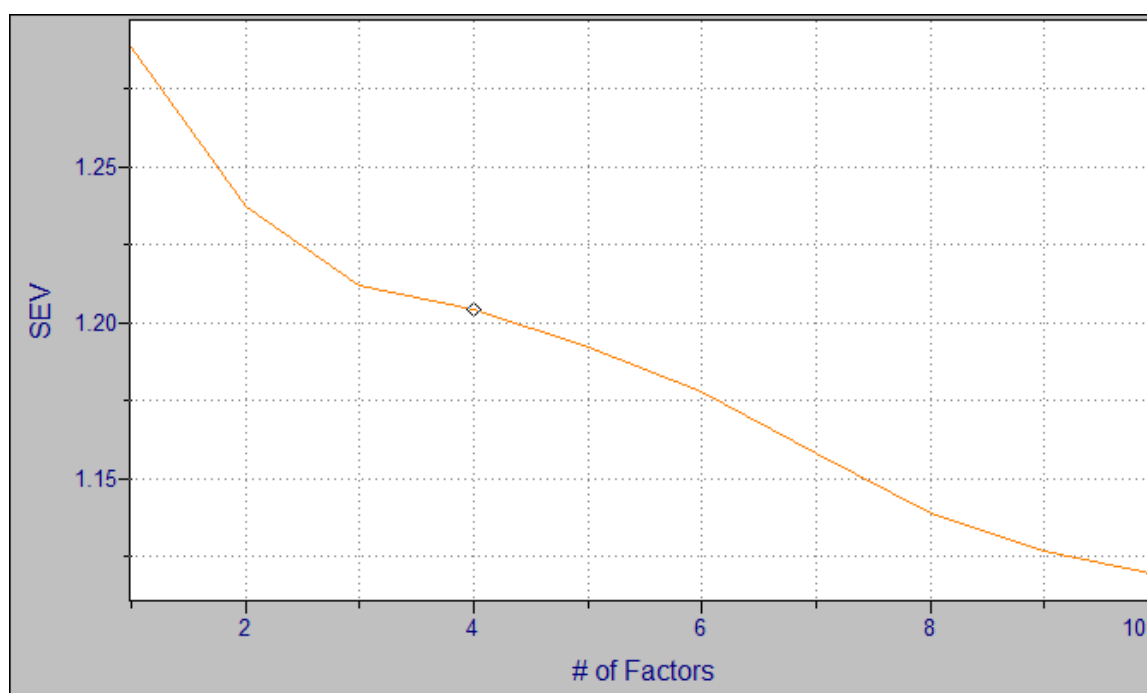
За добијени PLSR модел одређено је на основу вредности грешке валидације (слика 159) да је оптималан број фактора у моделу 4. Оптималан број фактора није одређиван

на основу минимума стандардне грешке валидације, већ узимајући у обзир и укупан проценат објашњених варијација у спектрима који је за 4 фактора износио 99,32%.

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,45$ при чему је стандардна грешка валидације била $RMSEV=1,2\text{mmol/l}$. Коефицијент регресије није прилично велик, а грешка валидације је релативно велика.

На слици 160 приказан је резултат фитовања регресионог модела.

С обзиром да је коефицијент корелације релативно низак, а стандардна грешка валидације висока ако се узме у обзир распон вредности концентрације глукозе на основу којих је калибрисан модел (5-8mmol/l) то значи да нејвероватније линеарна регресија није добар модел. Вероватније је међутим, да је регресиони модел прављен за сувише мали распон различитих вредности глукозе.

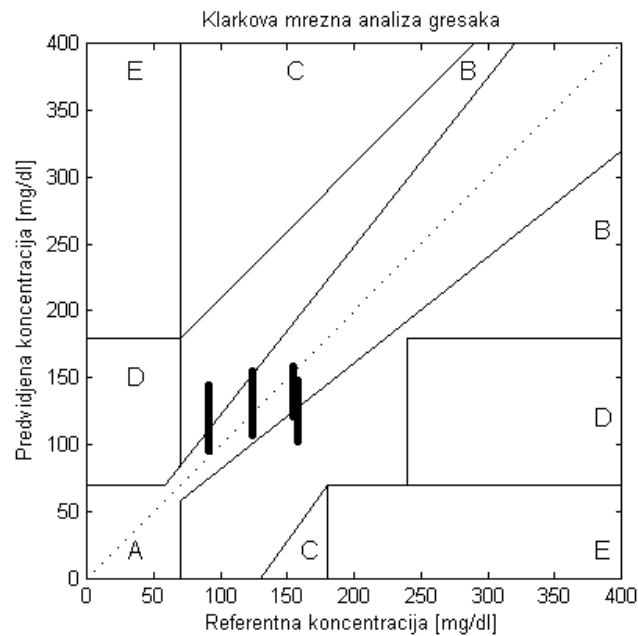


Слика 159. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4



Слика 160. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за хиперспектралне сликекоже и крвног суда у SWIR региону

За референтне и предвиђене вредности концентрације глукозе извршена је Кларкова мрежна анализа грешака и резултат је графички приказан на слици 161.



Слика 161. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда

Са графика се може уочити следећа припадност резултата по зонама: Зона А: 75.1925%, Зона В: 24.8075%, Зона С: 0%, Зона D: 0% и Зона Е : 0%. Вредности у зонама А и В су клинички прихватљиве.

7.8.6. VNIR регион – спектри коже одузети од спектра крвног суда

Због јако великог шума на краћим таласним дужинама, само је коришћен у обради регион таласних дужина од 450nm до 1000nm. Препроцесирање је било осредњавање спектра добијених одузимањем спектра коже од спектра крвног суда, и урађено је заглађивање спектра (Савицки-Голеј алгоритам, 21 тачка). Након извршене РСА анализе и уклањања оутлајера, спроведена је регресиона анализа.

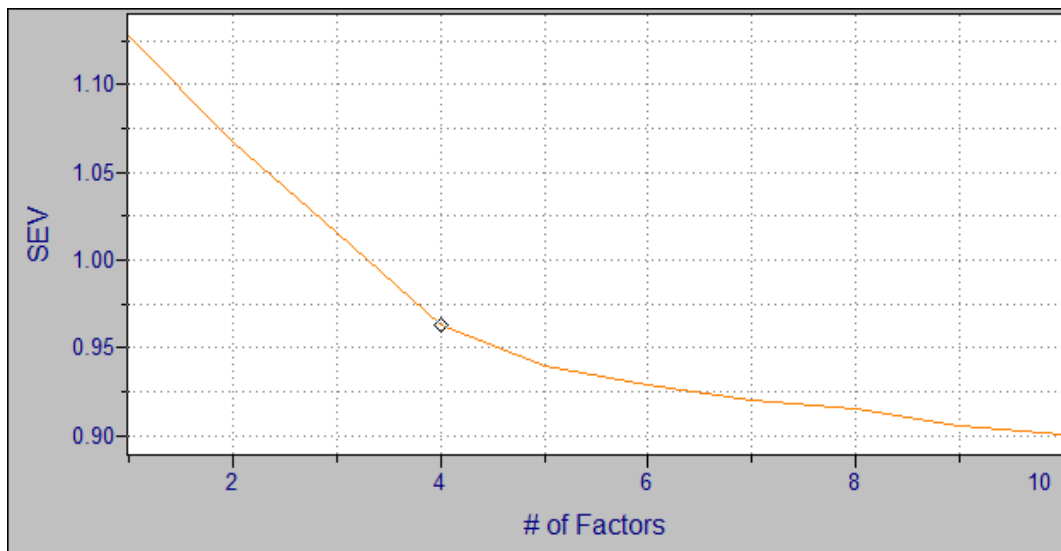
Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем 10 спектра.

За добијени PLSR модел одређено је на основу вредности грешке валидације (слика 162) да је оптималан број фактора у моделу 4. Оптималан број фактора није одређиван на основу минимума стандардне грешке валидације, већ узимајући у обзир и укупан проценат објашњених варијација у спектрима који је за 4 фактора износио 99,5%.

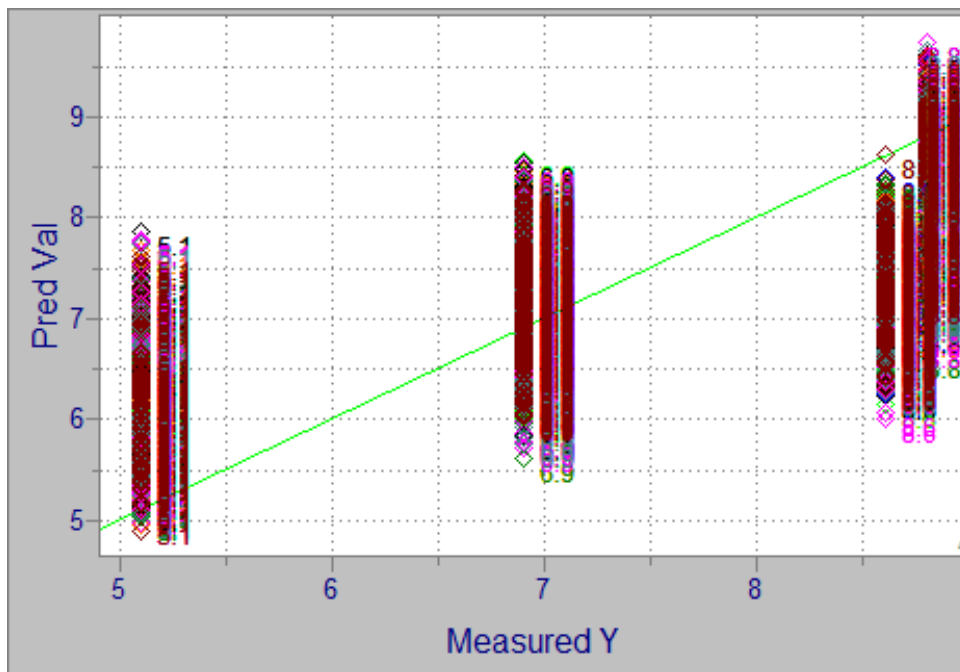
Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,7$ при чему је стандардна грешка валидације била $RMSEV=0,9\text{mmol/l}$. Коефицијент регресије није прилично велик, а грешка валидације је релативно велика.

На слици 163 приказан је резултат фитовања регресионог модела.

С обзиром да је коефицијент корелације повишен у односу и на анализе спектра коже и анализе спектра крвног суда, а стандардна грешка валидације смањена може се закључити да одузимање спектра коже доприноси побољшању тачности модела и највероватније линеарна регресија јесте добар модел. Тачност модела би вероватно била већа уколико се користи већи распон различитих вредности глукозе.

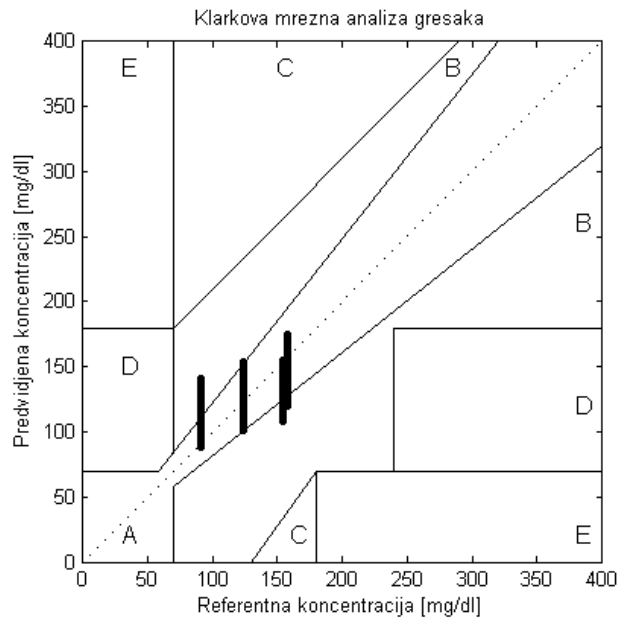


Слика 162. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4



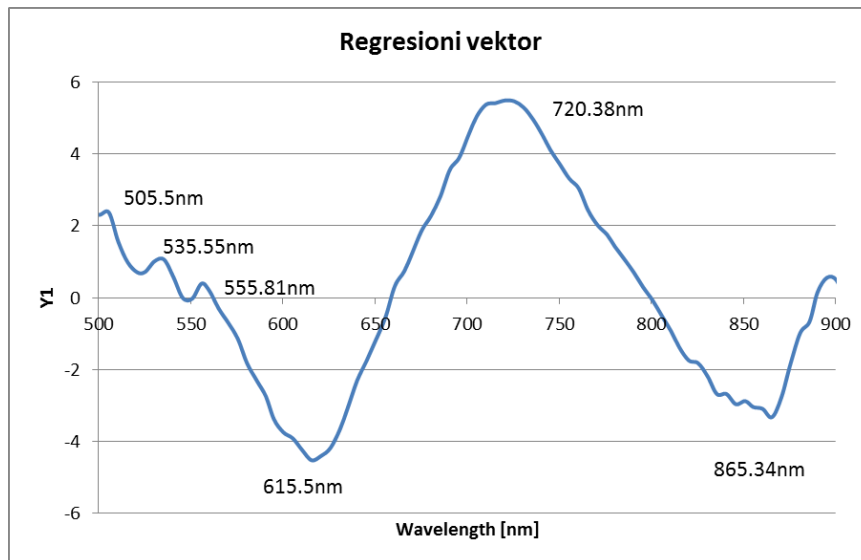
Слика 163. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за хиперспектралне слике крвног суда у VNIR региону

За референтне и предвиђене вредности концентрације глукозе извршена је Кларкова мрежна анализа грешака и резултат је графички приказан на слици 164.



Слика 164. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда

Са графика се може уочити следећа припадност резултата по зонама: Зона А: 85.057%, Зона В 14.943%, Зона С: 0%, Зона D: 0% и Зона Е : 0%. Вредности у зонама А и В су клинички прихватљиве.



Слика 165. Регресиони вектор за PLSR модел развијен на основу спектара са хиперспектралне слике крвног суда у VNIR региону

На основу регресионог вектора уочено је да су важне таласне дужине на којима долази до промене у рефлектанси услед промене концентрације глукозе следеће: 505,5nm, 535,55nm, 555,81nm, 615,5nm, и 720,38nm.

7.9. In vivo испитивања – FTIR спектроскопија

7.9.1. Локација – крвни суд

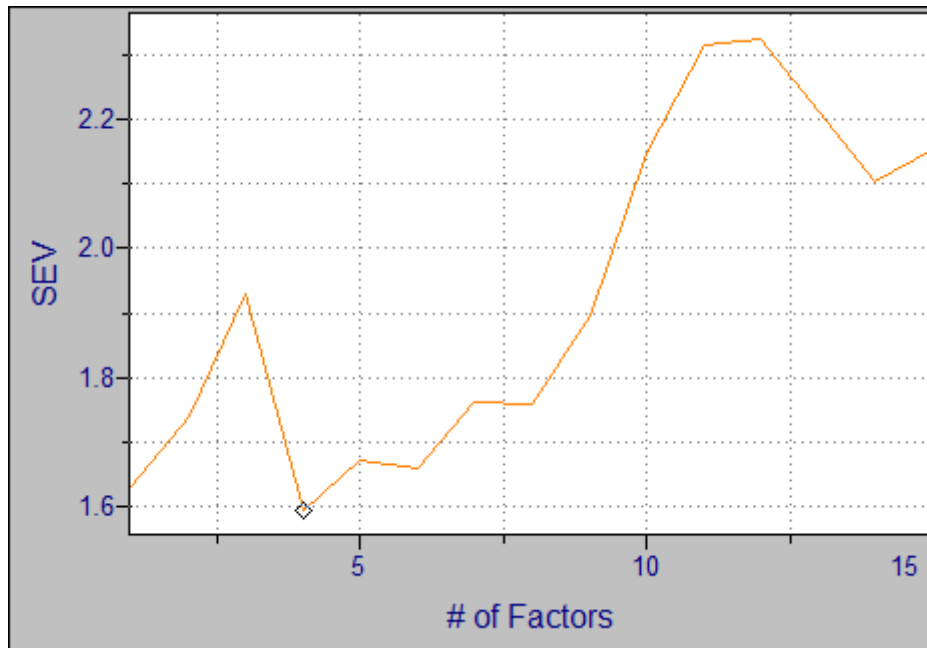
Обрада спектра рефлектансе започета је препроцесирањем односно осредњавањем спектра, и вршено је заглађивање спектра по алгоритму Савицки – Голај (13 тачка). Због малог броја спектра, само 13, није рађена PCA анализа и регресија је рађена на овом броју узорака.

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем 1 спектра.

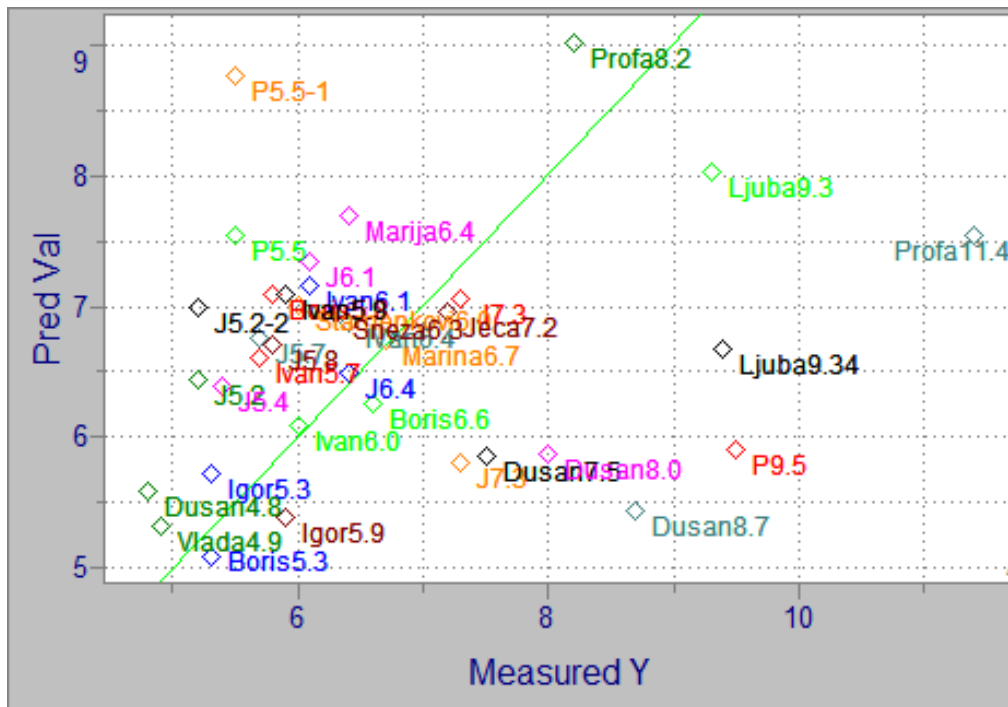
На основу вредности грешке валидације (слика 166) као и процента објашњених варијација у моделу (98,8%) одређено је да је оптималан број фактора у моделу 4.

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,68$ при чему је стандардна грешка валидације била $RMSEV=1.18\text{mmol/l}$. Коефицијент регресије је прилично мали, грешка валидације је велика имајући у виду распон концентрација глукозе, и будући да су резултати добијени за јако статистички довољан број спектра ово може указивати на недовољно добру линеарну регресију.

На слици 167 приказан је резултат фитовања регресионог модела.



Слика 166. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4



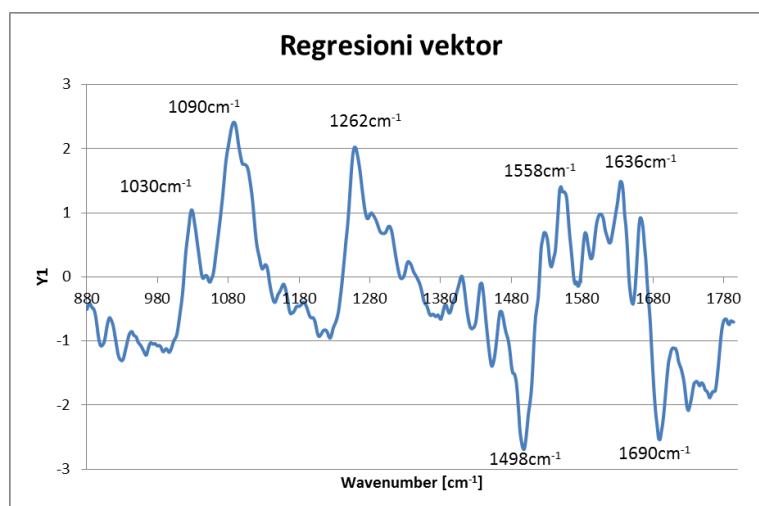
Слика 167. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за FTIR спектре крвног суда

Табела 22. Разлике између измерене вредности концентрације глукозе и вредности концентрације предвиђене моделом за FTIR спектре крвног суда

Испитаник	Измерена концентрација глукозе у mmol/l	Предвиђена концентрација глукозе у mmol/l	Остатак у mmol/l
1	5.3	5.087617	0.212383
2	5.8	7.089132	-1.28913
3	6.6	6.259102	0.340898
4	6	7.004294	-1.00429
5	4.8	5.584333	-0.78433
6	7.5	5.862569	1.637431
7	8	5.873851	2.126149
8	8.7	5.442435	3.257565
9	5.9	5.39955	0.50045
10	5.3	5.722585	-0.42259
11	5.7	6.616019	-0.91602
12	6	6.090015	-0.09002
13	7.3	5.802061	1.49794
14	5.2	6.446197	-1.2462
15	5.2	6.989478	-1.78948
16	5.4	6.385505	-0.98551
17	5.7	6.750799	-1.0508
18	5.8	6.706363	-0.90636
19	6.4	6.496571	-0.09657
20	9.5	5.915976	3.584024
21	5.5	7.542681	-2.04268
22	5.5	8.762058	-3.26206

23	4.9	5.317721	-0.41772
24	5.9	7.091351	-1.19135
25	6.1	7.334633	-1.23463
26	6.4	6.874225	-0.47423
27	7.2	6.953031	0.246969
28	6.1	7.153059	-1.05306
29	7.3	7.050823	0.249177
30	9.3	8.025829	1.274171
31	6.7	6.741734	-0.04173
32	8.2	9.012478	-0.81248
33	9.4	6.673573	2.726427
34	6.4	7.68578	-1.28578
35	11.4	7.537487	3.862513
36	6.3	6.937026	-0.63703

За овако урађену линеарну регресију пронађени су најутицајнији таласни бројеви у моделу и регресиони вектор је приказан на слици 168.



Слика 168. Регресиони вектор за модел линеарне регресије над спектрима крвног суда

За референтне и предвиђене вредности концентрације глукозе извршена је Кларкова мрежна анализа грешака и резултат је графички приказан на слици 169.



Слика 169. Кларкова мрежна анализа грешака за предвиђене вредности концентрације глукозе за методу OMIS - B53 при чему су коришћени спектри крвног суда

Са графика се може уочити следећа припадност резултата по зонама: Зона А: 58.333%, Зона В 41.667%, Зона С: 0%, Зона D: 0% и Зона Е : 0%. Вредности у зонама А и В су клинички прихватљиве.

7.9.2. Локација – спољни део длана

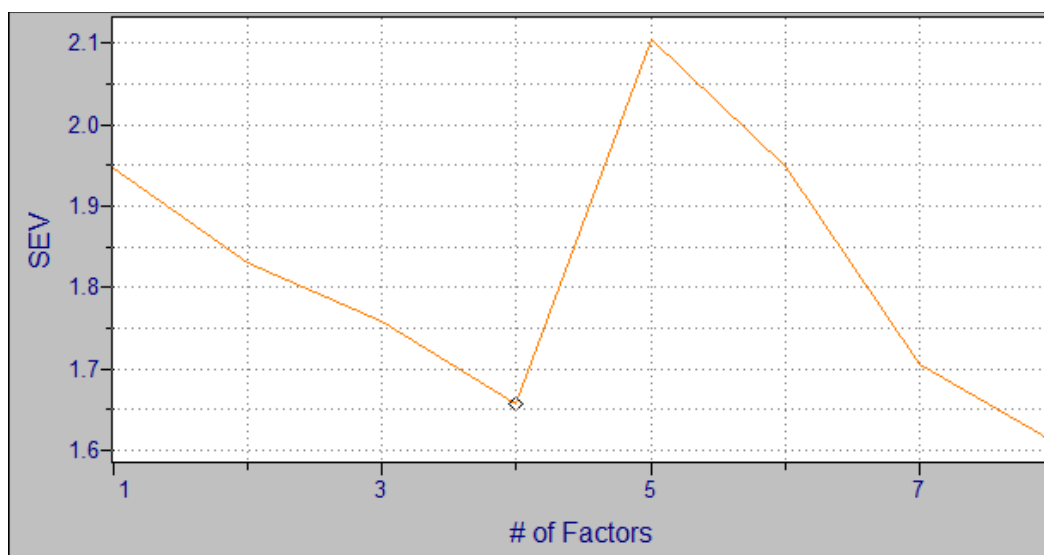
Обрада спектра рефлектансе започета је препроцесирањем односно осредњавањем спектра, и вршено је заглађивање спектра по алгоритму Савицки – Голај (13 тачка). Због малог броја спектра, само 13, није рађена РСА анализа и регресија је рађена на овом броју узорака.

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем 1 спектра.

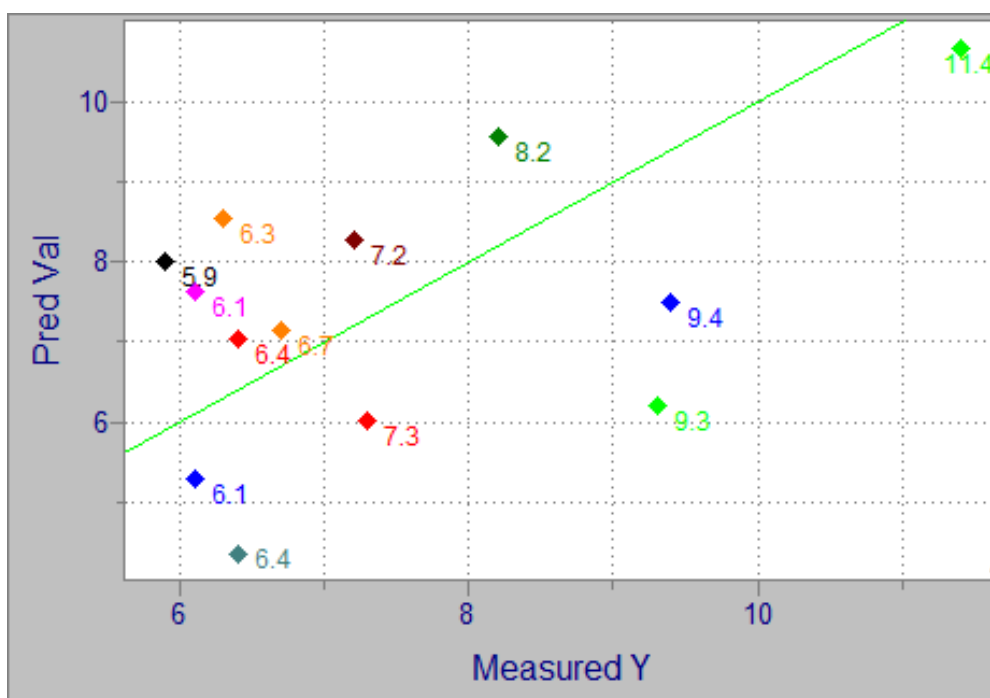
На основу вредности грешке валидације (слика 170) као и процента објашњених варијација у моделу (99,0%) одређено је да је оптималан број фактора у моделу 4.

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,48$ при чему је стандардна грешка валидације била $RMSEV=1.66\text{mmol/l}$. Коефицијент регресије је прилично велик, грешка валидације је мала, и будући да су резултати добијени за јако велик број спектра ово може указивати на јако добру остварену линеарну регресију.

На слици 171 приказан је резултат фитовања регресионог модела.



Слика 170. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4



Слика 171. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за FTIR спектре спољног дела длана

Табела 23. Разлике између измерене вредности концентрације глукозе и вредности концентрације предвиђене моделом за FTIR спектре спољног дела длана

Испитаник	Измерена концентрација глукозе у mmol/l	Предвиђена концентрација глукозе у mmol/l	Остатак у mmol/l
1	6.1	5.276009	0.823991
2	7.3	6.021975	1.278026
3	9.3	6.200826	3.099174
4	6.7	7.154005	-0.45401
5	8.2	9.567314	-1.36731
6	5.9	8.004832	-2.10483
7	6.1	7.619522	-1.51952
8	6.4	4.340137	2.059863
9	7.2	8.283906	-1.08391

10	9.4	7.498366	1.901633
11	6.4	7.0384	-0.6384
12	11.4	10.6807	0.719296
13	6.3	8.535563	-2.23556

7.9.3. Локација – корен средњег прста

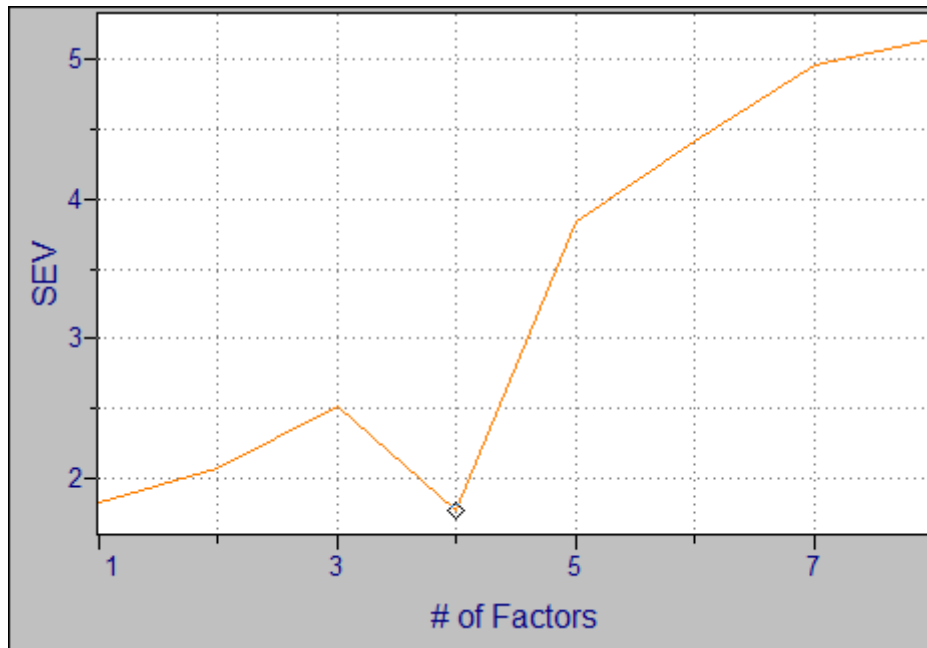
Обрада спектра рефлектансе започета је препроцесирањем односно осредњавањем спектра, и вршено је заглађивање спектра по алгоритму Савицки – Голај (13 тачка). Због малог броја спектра, само 13, није рађена РСА анализа и регресија је рађена на овом броју узорака.

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем 1 спектра.

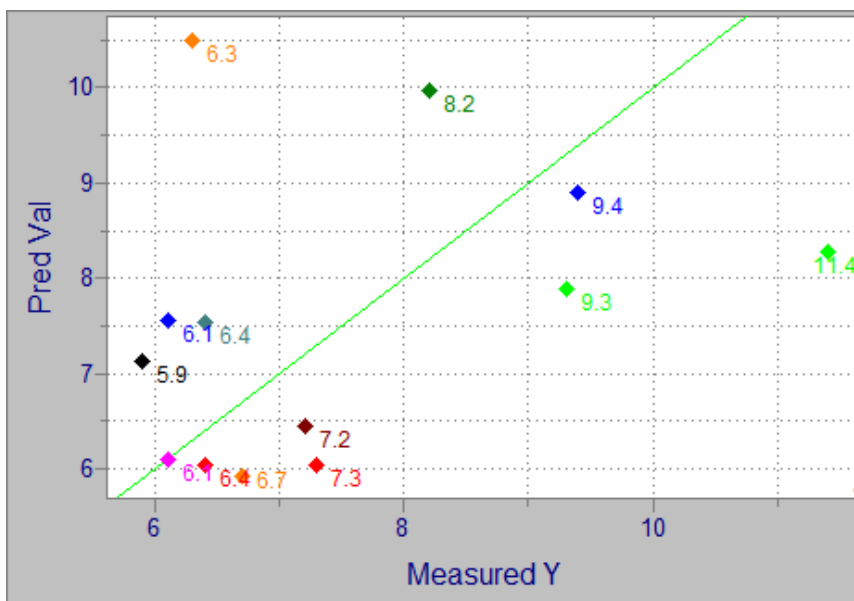
На основу вредности грешке валидације (слика 172) као и процента објашњених варијација у моделу (99,9%) одређено је да је оптималан број фактора у моделу 4.

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,34$ при чему је стандардна грешка валидације била $RMSEV=1.77\text{mmol/l}$. Коефицијент регресије је прилично велик, грешка валидације је мала, и будући да су резултати добијени за јако велик број спектра ово може указивати на јако добру остварену линеарну регресију.

На слици 173 приказан је резултат фитовања регресионог модела.



Слика 172. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4



Слика 173. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за FTIR спектре коже у корену средњег прста

Табела 24. Разлике између измерене вредности концентрације глукозе и вредности концентрације предвиђене моделом за FTIR спектре коже у корену средњег прста

Испитаник	Измерена концентрација глукозе у mmol/l	Предвиђена концентрација глукозе у mmol/l	Остатак у mmol/l
1	6.1	7.561361	-1.46136
2	7.3	6.033608	1.266392
3	9.3	7.87956	1.420441
4	6.7	5.917449	0.782551
5	8.2	9.973053	-1.77305
6	5.9	7.131797	-1.2318
7	6.1	6.094685	0.005315
8	6.4	7.530582	-1.13058
9	7.2	6.442744	0.757256
10	9.4	8.900212	0.499787
11	6.4	6.033244	0.366756
12	11.4	8.276837	3.123162
13	6.3	10.5001	-4.2001

7.9.4. Локација – јагодица прста

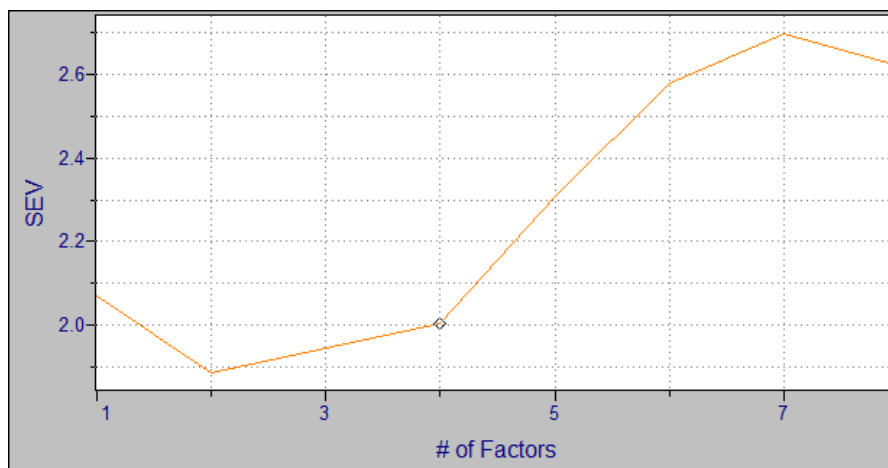
Обрада спектра рефлектансе започета је препроцесирањем односно осредњавањем спектра, и вршено је заглађивање спектра по алгоритму Савицки – Голај (13 тачка). Због малог броја спектра, само 13, није рађена РСА анализа и регресија је рађена на овом броју узорака.

Коришћен је интерни метод валидације – унакрсна валидација са изостављањем 1 спектра.

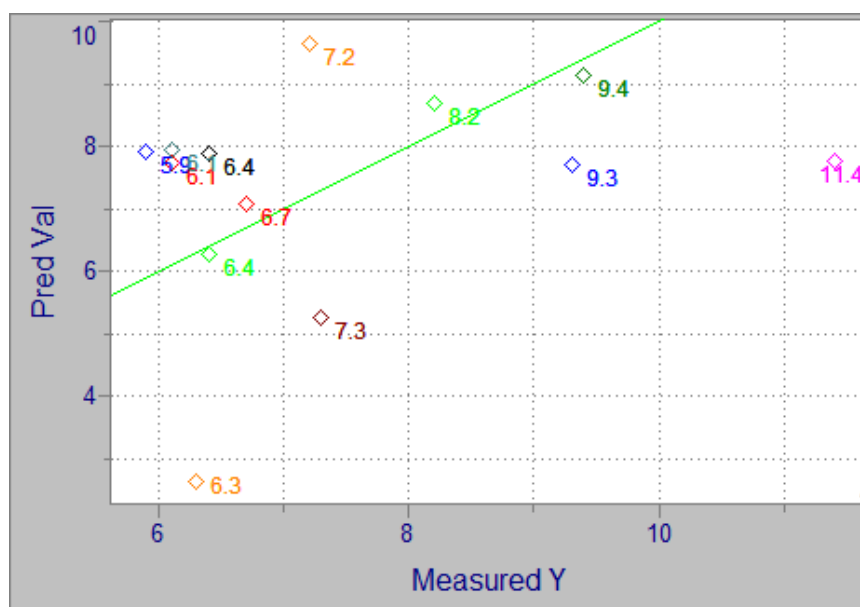
На основу вредности грешке валидације (слика 174) као и процента објашњених варијација у моделу (99,53%) одређено је да је оптималан број фактора у моделу 4.

Вредност коефицијента корелације износила је за овај број фактора $r^2=0,3$ при чему је стандардна грешка валидације била $RMSEV=2\text{mmol/l}$. Коефицијент регресије је прилично велик, грешка валидације је мала, и будући да су резултати добијени за јако велик број спектра ово може указивати на јако добру остварену линеарну регресију.

На слици 175 приказан је резултат фитовања регресионог модела.



Слика 174. Стандардна грешка валидације – одређен је оптималан број фактора у моделу да је 4



Слика 175. Корелација између измерених вредности глукозе (Measured Y) и вредности глукозе одређене према развијеном моделу (Pred Val) за FTIR спектре јагодице прста из којег је вађена крв

Табела 25. Разлике између измерене вредности концентрације глукозе и вредности концентрације предвиђене моделом за FTIR спектре јагодице прста из којег је вађена крв

Испитаник	Измерена концентрација глукозе у mmol/l	Предвиђена концентрација глукозе у mmol/l	Остатак у mmol/l
1	5.9	7.91535	-2.01535
2	6.1	7.746089	-1.64609
3	6.4	6.284087	0.115913
4	7.2	9.660615	-2.46062
5	9.4	9.154846	0.245153
6	6.4	7.891175	-1.49118
7	11.4	7.775665	3.624334
8	6.1	7.946709	-1.84671
9	7.3	5.276417	2.023583
10	9.3	7.716547	1.583453
11	6.7	7.091824	-0.39182
12	8.2	8.693496	-0.4935
13	6.3	2.62887	3.671131

8. Анализа и дискусија резултата

8.1. Дискусија резултата истраживања

Истраживања чији су резултати представљени у претходним поглављима дисертације имала су за циљ утврђивање оптичких својстава глукозе и испитивање потенцијала неколико неинвазивних оптичких метода – односно спектроскопских метода чији *output* – хиперспектрална слика или спектар служе за одређивање концентрације глукозе у узорку или *in vivo* на неинвазиван начин.

Истраживање је обухватило развој и тестирање нове методе – Опто-магнетне имицинг спектроскопије, и постојећих спектроскопских метода: спектроскопије у видљивој области (*vis-NIR*: 400-1000nm), блиске инфрацрвене спектроскопије (*NIR*: 900-2500nm), и методе инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом у средњем инфрацрвеном региону (*FTIR*, 1000-4000 cm^{-1} , односно 2500-10000nm), као и хиперспектралног имицинга у видљивом-блиском инфрацрвеном региону (*VNIR*: 400-1000nm) и у краткоталасном блиском инфрацрвеном региону (*SWIR*: 950-1700nm). Опто-магнетна имицинг спектроскопија подразумевала је употребу две вредности угла: Брустеровог угла за воду од 53° и Брустеровог угла за глукозу од 60°, као и употребу светлости таласних дужина у ултраљубичастом региону: UV1 (365nm) UV2(385nm).

Прелиминарна истраживања ових метода најпре су извршена на најједноставнијем моделу – воденом раствору глукозе. Затим су истраживања настављена *in vitro* – на узорцима крви, али због малог броја узорака крви на располагању, ова истраживања спроведена су у врло ограниченом формату. Највећи број истраживања извршен је *in vivo* – на неинвазиван начин, при чему је аквизиција слика или спектра била вршена на кожи без видљивих крвних судова, на кожи са израженим и видљивим крвним судовима, као и на различитим локацијама на телу: подлактици - близу ручног зглоба, затим на делу длана који има велику прокрвљеност, у корену средњег прста и на јагодици прста

из којег је вађена крв за утврђивање концентрације глукозе стандардном, референтном методом.

Над спектрима добијеним сваком методом вршена је мултиваријациона анализа и спроведена је парцијална регресија методом најмањих квадрата за развој модела на основу којег се може израчунати концентрација глукозе на основу спектра, а који је калибрисан у односу на измерене вредности концентрације глукозе стандардном методом. У наредним поглављима дат је компаративни приказ перформанси развијених модела за анализу резултата водених раствора глукозе, крви и спектра односно хиперспектралних слика коже и коже са видљивим крвним судовима.

8.2. Анализа резултата водених раствора глукозе

Као најједноставнији модел за иницијална испитивања одабран је водени раствор глукозе, при чему су концентрације глукозе варирале у опсегу физиолошких.

У случају испитивања Инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом, вредности глукозе у воденим растворима биле су и ван физиолошких граница, али услед немогућности мерења тачне концентрације у тим растворима, калибрација PLSR модела вршена је у односу на номиналне вредности.

У табели 26 дат је компаративни приказ перформанси развијених PLSR модела за спектре добијене различитим методама. Оцена перформанси модела заснива се на поређењу коефицијента регресије r^2 чија вредност треба да буде што ближа јединици уколико модел добро описује карактеристике спектра, на основу броја фактора у моделу и средње стандардне грешке валидације која треба да буде што мања.

Из табеле 26, могуће је уочити да највећи коефицијент регресије имају методе NIR и FTIR, са коефицијентом регресије 0.99, при чему је у случају NIR спектроскопије грешка најмања и износи 0,67mmol/l.

Табела 26. Компаративни приказ валидности модела парцијалне линеарне регресије и оцена перформанси модела за различите методе аквизиције спектра водених раствора глукозе

Метода	Додатне информације	Број фактора у PLSR моделу	r^2	RMSEV[mmol/l]
OMIS	B60	3	0,49	4,28
OMIS	B53	5	0,67	3,62
NIR	Калибрација вршена у односу на измерене вредности концентрације глукозе	5	0,99	0,67
NIR	Калибрација вршена у односу на номиналне вредности	2	0,993	10
FTIR	Референца ваздух; номиналне вредности концентрације глукозе	5	0,999	10,76
FTIR	Референца ваздух; измерене вредности концентрације глукозе	4	0,91	3,31

У случају FTIR спектроскопије грешке су веће, али је то последица вршења калибрације коришћењем номиналних вредности концентрација глукозе у воденим растворима, уместо реалних измерених вредности што није било могуће јер се није располагало одговарајућом стандардном методом за овај распон концентрација глукозе. У случају опто-магнетне имидинг спектроскопије бољи резултат је показало коришћење Брустеровог угла од 53° - што је Брустеров угао за воду. Овај резултат, као

и резултат за NIR спектроскопију су интересантни, јер у NIR региону глукоза не апсорбује већ је њен сигнал замаскиран водом. Ови резултати упућују на закључак да промене воде услед присуства и варирања концентрације глукозе дају промене у спектрима – опто-магнетним и NIR спектрима које су мерљиве и које носе информацију о вредности концентрације глукозе.

Овај налаз је у складу са открићима Аквафотомике, и представља изузетну новину – а то је да се праћењем промена у води могу открити информације о супстанци која је у њој растворена, у овом случају глукози чак и на основу дела спектралног региона у којем она уопште не апсорбује (NIR), односно преко промена поларизационих својстава воде (OMIS) чак и кад је концентрација глукозе ниска и у распону физиолошких вредности. Ови резултати заправо откривају сасвим нове могућности за детекцију глукозе на неинвазиван начин и нису присутни у постојећој литератури.

8.3. Анализа резултата *in vitro* испитивања крви

Анализа резултата испитивања крви спроведена су у врло ограниченом обиму, због инвазивности процедуре која захтева узимање крви од стране испитаника. Из овог разлога истраживања су рађена само коришћењем две методе, али број узорака за методу инфрацрвене спектроскопије није био довољан да се спроведе регресија.

Табела 27. Компаративни приказ валидности модела парцијалне линеарне регресије и оцена перформанси модела за различите методе аквизиције спектра крви

Метода	Додатне информације	Број фактора у PLSR моделу	r^2	RMSEV [mmol/l]
OMIS	B53	7	0,65	0,24
FTIR	ATR Референца ваздух;	Недовољан број узорака крви за калибрацију		

Резултати парцијалне линеарне регресије методом најмањих квадрата на опто-магнетним спектрима крви показују добре прелиминарне резултате, са коефицијентом регресије од 0.65 и врло малом грешком од само 0,24 mmol/l. Међутим, имајући у виду да је распон варијација концентрације глукозе у крви варирао у опсегу од само 1 mmol/l, за очекивање би било да ова грешка буде чак и мања, јер овако представља четвртину стандардне девијације.

8.4. Анализа резултата *in vivo* испитивања

Најважнији део истраживања за процену потенцијала сваке од метода представљала су *in vivo* истраживања. Обим и број испитаника за сваку од примењених метода дат је у протоколима испитивања.

Испитивања методом опто-магнетне спектроскопије подразумевала су коришћење две врсте апарата: једног са Брустеровим углом од 53° и другог са Брустеровим углом од 60°, као и са још две врсте осветљења из области ултраљубичастог – UV1 на 365nm и UV2 на 385nm. За свако снимање вршена је подела на регион коже и регион коже са видљивим крвним судовима – и за ове регионе слика су развијани опто-магнетни спектри, а затим је вршена и још једна врста трансформације – одузимање спектра коже од спектра коже са крвним судовима како би се добиле само карактеристике крвног суда. Ово значи да је линеарна регресија вршена на 12 скупова спектра (4 врсте осветљења и 3 врсте обраде), али у поглављу Резултати приказани су само изабрани најбољи резултати, док је преглед изостављених резултата дат у Прилогу 1.

У табели 28 дат је компаративни приказ перформанси развијених PLSR модела за спектре добијене коришћеним методама. Оцена перформанси модела заснива се на поређењу коефицијента регресије r^2 чија вредност треба да буде што ближа јединици уколико модел добро описује карактеристике спектра, на основу броја фактора у моделу и средње стандардне грешке валидације која треба да буде што мања.

Табела 28. Компаративни приказ валидности модела парцијалне линеарне регресије и оцена перформанси модела за различите методе аквизиције спектра коже и крвног суда на различитим локацијама

Метода	Додатне информације	Број фактора у PLSR моделу	r^2	RMSEV[mmol/l]
OMIS	B53, Крвни суд	2	0,341	3,237
OMIS	UV1, Кожа&Крвни суд	2	0,2	3,54
OMIS	UV2, Кожа&Крвни суд	2	0,2	3,604
OMIS	B60, Кожа	3	0,05	3,588
OMIS	B60, Кожа&Крвни суд	4	0,2	7,213
OMIS	B60, Крвни суд	4	0,102	3,562
HSI	SWIR, Кожа	3	0,515	0,46
HSI	SWIR, Кожа&Крвни суд	3	0,6	0,43
HSI	SWIR, Крвни суд	4	0,76	0,35
HSI	VNIR, Кожа	4	0,583	1,15
HSI	VNIR, Кожа & Крвни суд	4	0,45	1,2
HSI	VNIR, Крвни суд	4	0,7	0,9
FTIR	Оптичка влакна, Крвни	4	0,68	1,18

	суд			
FTIR	Оптичка влакна, Спољни део длана	4	0,48	1,66
FTIR	Оптичка влакна, Корен средњег прста	4	0,34	1,77
FTIR	Оптичка влакна, јагодица прста	4	0,3	2

Из табеле 28 може се видети да су најбољи резултати добијени коришћењем хиперспектралног имиџинга у краткоталасном блиском инфрацрвеном региону (SWIR: 950-1700nm), да је коефицијент регресије само нешто већи за слике односно спектре крвног суда, при чему грешка износи 0,43mmol/l за кожу са виљивим крвним судом, а 0,46mmol/l за саму кожу. Неопходно је нагласити да се ова величина грешке постигла захваљујући веома робусном моделу, у којем је за једну вредност концентрације глукозе у крви, коришћено 1600 спектра (40x40 пиксела величина одабраног региона хиперспектралне слике). То значи да је у калибрацију укључено неколико хиљада спектра и то за само једног испитаника. Поређења ради, калибрација за спектре добијене OMIS методом, рађена је на 59 спектра за случај коришћења апарата са углом од 53°, односно 213 за апарат са углом 60° и то спектра различитих испитаника.

У случају OMIS методе, коефицијент регресије је прилично мали и може се закључити да модел линеарне регресије није адекватан за корелацију са концентрацијом глукозе у крви. Интересантно је да се и при *in vivo* истраживањима OMIS методом бољи резултат добија за коришћење Брустеровог угла за воду од 53°. У случају коришћења Брустеровог угла за глукозу модел се показује као потпуно неадекватан са коефицијентом регресије од само 0.05.

У случају испитивања FTIR спектроскопијом, вршено је и варирање локације са које су узимани спектри, и најбољи коефицијент регресије, односно најмања грешка добијена је за аквизицију спектра са места крвног суда – где је коефицијент износио $r^2=0.68$, а грешка $RMSEV=1,18\text{mmol/l}$. Ово је донекле неочекиван резултат, јер се могло сматрати да ће најбоља корелација бити успостављена за спектре узете са јагодице прста из којег је узимана крв за мерење концентрације глукозе стандардном методом. Међутим, ако се узме у обзир да најбоље резултате даје заправо хиперспектрални имиџинг у блиској инфрацрвеној области и то за слику крвног суда, то значи да је важно узети већи регион односно више спектра на једној локацији. У случају FTIR спектроскопије додир се остварује приближно у тачки, па се може закључити да приликом аквизиције спектра са других локација (длан, корен средњег прста и јагодица прста) рефлектанса сонда није дошла у контакт са крвним судовима.

У Табели 29 извршена је компарација клиничке тачности *in vivo* мерења за сваку методу појединачно, на основу резултата Кларкове мрежне анализе (дијаграма расипања).

Табела 29. Кларкова мрежна анализа грешака – компаративни преглед припадности предвиђених концентрација глукозе у крви – компаративна анализа свих примењених метода

		Процентуална заступљеност резултата мерења по зонама [%]				
Метода	Додатне информације	A	B	C	D	E
OMIS	B53, Крвни суд	32,143	57,143	0	10,714	0
OMIS	UV1, Кожа&Крвни суд	26,667	61,667	0	11,667	0
OMIS	UV2, Кожа&Крвни суд	23,333	65,0	0	11,667	0
OMIS	B60, Кожа	7,065	90,761	0	2,174	0

OMIS	B60, Кожа&Крвни суд	10,744	61,9835	5,785	6,612	14,876
OMIS	B60, Крвни суд	26,067	65,877	0	8,057	0
HSI	SWIR, Кожа&Крвни суд	100	0	0	0	0
HSI	SWIR, Кожа	1,744	98,835	0	0	0
HSI	SWIR, Крвни суд	100	0	0	0	0
HSI	VNIR, Кожа	77,003	22,997	0	0	0
HSI	VNIR, Кожа & Крвни суд	75,1925	24,8075	0	0	0
HSI	VNIR, Крвни суд	85,057	14,943	0	0	0
FTIR	Оптичка влакна, Крвни суд	58,333	41,667	0	0	0

Кларкова мрежна анализа грешака је заснована на претпоставкама које рефлектују принципе медицинске праксе и даје пет зона са различитим нивоом тачности. Вредности измерене глукозе у зонама А и Б, се могу сматрати тачним у клиничком смислу, јер би водили ка клинички коректној терапији, док су остале зоне потенцијално опасне. Резултати у зони Ц воде прејакој корективној терапији, резултати у зони Д су опасни јер се стварне вредности глукозе налазе у зони када је потребна терапија, а метода то не региструје, док резултати у зони Е воде погрешној терапији, тј. супротној од оне која је потребна.

Из табеле 29 види се да методе хиперспектралног имиџинга, као и FTIR спектроскопија имају потребну клиничку тачност, тј. сви резултати се налазе у зонама А и Б. Метода SWIR даје најбољи резултат, тј. сви резултати су у зони А, која је најпожељнија и значи да максимално одступање резултата може да износи 20%. Остале методе имају резултате и у зони Д, што значи да би водили у лажну сигурност да није потребна корективна терапија.

С обзиром да је утврђено да је најбољи резултат добијен за SWIR регион блиског инфрацрвеног спектра, односно за опсег 900-1700nm, то се из регресионог вектора добијеног за развијени PLSR модел могу издвојити таласне дужине на којима се мења рефлектансни спектар коже са крвним судом када се мења концентрација глукозе у крви и то су следеће таласне дужине: 977.7nm, 1191.22nm, 1250.13nm, 1282.73nm, 1364.7nm, 1420nm, 1597.93nm и 1674.19nm. Основне водене траке у овом региону налазе се у областима око 970 nm (други овертон), 1200nm и 1450 nm (први овертон). Издвојене значајне таласне дужине се све налазе у овим областима, па се може закључити да се детекција глукозе у моделу врши на основу промена воде. Карактеристика водених апсорпционих трака у овом региону је да се померају ка већим таласним дужинама са порастом јачине водоничне везе, што је у складу са добијеним резултатима дејства глукозе на воду приказаних на акваграмима на сликама 92 и 93 у Поглављу 7.2.

Од интереса је продужити испитивања у овом региону и сузити овај избор таласних дужина на само неколико на којима се уочава најизразитија промена у спектру приликом варијација концентрације глукозе у крви. Оваква селекција омогућила би конструкцију врло једноставног мултиспектралног сензора, који би уз развијени алгоритам могао да у реалном времену на основу мултиспектралне слике малих димензија (40x40пиксела или мање) давао информације о концентрацији глукозе у крви на потпуно неинвазиван начин.

9. Закључак

Спроведена истраживања у овој докторској дисертацији имала су за циљ утврђивање потенцијала неколико неинвазивних, оптичких, транскутаних методе за одређивање концентрације глукозе у крви, којима би се на потпуно безболан начин преко спектара или хиперспектралних слика коже могло у реалном времену измерити концентрација глукозе у крви. Осим већ постојећих спектроскопских метода у видљивом, блиском инфрацрвеном и инфрацрвеном региону, развијена је и опто-магнетна имицинг метода и њен потенцијал је такође истражен.

На основу прегледа патентних пријава и литературних података о начинима мерења концентрације глукозе у крви на неинвазиван начин, утврђено је да за сад није развијен и у комерцијалну употребу уведен ниједан такав уређај. Закључено је да са аспекта неинвазивности највећи потенцијал имају оптичке методе – методе на бази интеракције светлости и ткива и истраживања су извршена у целом видљивом и инфрацрвеном региону, а коришћењем метода спектроскопије и спектралног имицинга.

Истраживања изабраним методама започета су на најједноставнијем моделу – воденим растворима глукозе, будући да је основни састојак свих човекових ткива вода. Истраживања су даље настављена *in vitro* на узорцима крви са различитом концентрацијом глукозе, и најзад најобимнији део истраживања извршен је *in vivo* на испитаницима, особама са дијабетесом и здравим особама које су дале писмену сагласност за учествовање у истраживањима.

Анализом добијених резултата дата је оцена потенцијала сваке методе за неинвазивно мерење концентрације глукозе у крви, и утврђено је да је најпогоднији регион блиске инфрацрвене светлости и то како на воденим растворима, тако и и при истраживањима *in vivo* на хиперспектралним сликама крвног суда.

На основу испитивања водених раствора глукозе утврђено је да највећи потенцијал имају методе NIR и FTIR, са коефицијентом регресије 0.99, при чему је у случају NIR

спектроскопије грешка најмања и износи $0,67\text{mmol/l}$. Анализа водених раствора глукозе применом Аквафотомике показала је да је основно дејство глукозе на воду стварање јачих водоничних веза између молекула воде и промоција везивања у кластере.

У случају FTIR спектроскопије грешке одређивања концентрације глукозе су веће, али је то последица вршења калибрације коришћењем номиналних вредности концентрација глукозе. У случају опто-магнетне имидинг спектроскопије бољи резултат је показало коришћење Брустеровог угла од 53° - што је Брустеров угао за воду. Ови резултати упућују на закључак да промене воде услед присуства и варирања концентрације глукозе дају промене у спектрима – опто-магнетним и NIR спектрима које су мерљиве и које носе информацију о вредности концентрације глукозе, што је у складу са нашим резултатима добијених применом Аквафотомике, и представља изузетну новину – а то је да се праћењем промена у води могу открити информације о супстанци која је у њој растворена, у овом случају глукози чак и на основу дела спектралног региона у којем она уопште не апсорбује (NIR), односно преко промена поларизационих својстава воде (OMIS) чак и кад је концентрација глукозе ниска и у распону физиолошких вредности. Ови резултати заправо откривају сасвим нове могућности за детекцију глукозе на неинвазиван начин.

При *in vivo* испитивањима најбољи резултати су добијени коришћењем хиперспектралног имидинга у краткоталасном блиском инфрацрвеном региону (SWIR: $950\text{-}1700\text{nm}$), што се подудара са резултатима добијеним за водене растворе. Резултати су били скоро подједнако добри и за спектре коже и крвног суда као и за спектре самог крвног суда (корен средње стандардне грешке за случај коже и крвног суда $\text{RMSEV}=0,43\text{mmol/l}$, а за случај само крвног суда $\text{RMSEV}=0,35\text{mmol/l}$), што значи да светлост из овог региона добро продире у прокрвљене делове ткива и зато рефлексциони спектар поседује информације о концентрацији глукозе у крви.

У случају OMIS методе, може се закључити да модел линеарне регресије није довољно адекватан за корелацију са концентрацијом глукозе у крви, али будићи да су испитивања овом методом извршена на релативно великом броју испитаника (59

испитаника за коришћење Брустеровог угла од 53° , и 213 испитаника за коришћење угла од 60°), иако је грешка при мерењу за сада релативно велика, постоји могућност да се неким другим видом методама и алгоритмима добију тачнији резултати. Интересантно је да се и при *in vivo* истраживањима OMIS методом бољи резултат добија за коришћење Брустеровог угла за воду од 53° .

У случају испитивања FTIR спектроскопијом, најмања грешка добијена је за аквизицију спектра са места крвног суда – где је коефицијент износио $r^2=0.68$, а грешка $RMSEV=1,18\text{mmol/l}$. У случају FTIR спектроскопије додир се остварује приближно у тачки, па се може закључити да приликом аквизиције спектра са других локација (длан, корен средњег прста и јагодица прста) рефлектансна сонда не остварује довољно велики контакт са крвним судовима. То значи да се овај резултат може побољшати ако се узима више спектра, у неколико различитих места са једне површине коже која је довољно прокрвљена као што је то био случај са аквизицијом спектра на месту видљивог крвног суда.

С обзиром да је утврђено да је најбољи резултат добијен за регион блиског инфрацрвеног спектра 900-1700nm, то се из регресионог вектора добијеног за развијени PLSR модел могу издвојити таласне дужине на којима се мења спектар коже са крвним судом када се мења концентрација глукозе у крви и то су следеће таласне дужине: 977.7nm, 1191.22nm, 1250,13nm, , 1282.73nm, 1364,7nm, 1420nm, 1597,93nm и 1674.19nm. Све наведене таласне дужине налазе се у области првог и другог овертона воде, што значи да се детекција глукозе одвија на основу промена у води.

Научни допринос тезе:

- (1) Одређене су спектралне и опто-магнетне карактеристике глукозе у воденим растворима у региону од 300-16500 nm
- (2) Идентификован је најосетљивији регион спектра за детекцију глукозе на бази модела водени раствор глукозе и то је блиски инфрацрвени регион 900-1700nm

- (3) Извршена су *in vivo* испитивања концентрације глукозе у крви трима спектроскопским методама (FTIR, OMIS и Хиперспектрални имицинг), а добијени резултати су показали да највећу тачност одређивања концентрације глукозе у крви омогућује хиперспектрални имицинг у блиском инфрацрвеном региону (SWIR: 900-1700nm, грешка RMSEV=0.35mmol/l за коришћење спектра самог крвног суда), затим хиперспектрални имицинг у видљивом и блиском инфрацрвеном домену (VNIR: 400-1000nm, грешка RMSEV=0.9mmol/l за коришћење спектра самог крвног суда), затим FTIR спектроскопија (FTIR: 2500-10000nm , грешка RMSEV=1,18mmol/l за коришћење спектра самог крвног суда) и најзад OMIS метода са коришћењем Брустеровог угла за воду од 53° (OMIS: 400-700nm , грешка RMSEV=3,237mmol/l за коришћење спектра самог крвног суда)
- (4) Примењен је метод и алгоритам Аквафотомике за одређивање концентрације глукозе за NIR део спектра у којем она не апсорбује (1300-1600nm), преко промена у организацији воде и показано је да се концентрација глукозе боље утврђује ако се разматрају параметри стања и динамике воде, него директно мерење параметара глукозе
- (5) Развијен је алгоритам и направљена су два прототипа уређаја за одређивање концентрације глукозе новом методом Опто-магнетне имицинг спектроскопије и то један на бази Брустеровог угла за глукозу од 60° (на узорку од 213 испитаника) и други на бази Брустеровог угла за воду од 53° (на узорку од 59 испитаника). Боља тачност мерења добијена је за Брустеров угао за воду, и анализа резултата показује да веза између концентрације глукозе и опто-магнетних карактеристика највероватније није линеарна. Ови резултати указују да будућа истраживања инфрацрвене спектроскопије и опто-магнетне имицинг спектроскопије у сврху неинвазивног мерења концентрације глукозе у крви, треба усмерити на интеракцију глукозе са водом преко водоничних веза.

10. Литература

- [1] Glucose molecule structure: <http://www.dreamstime.com/stock-photo-glucose-molecule-image11063520>.
- [2] Glucose isomeres: L- and D-glucose: <http://nds.wikipedia.org/wiki/Bild:DL-Glucose.svg>.
- [3] Tuchin V.V. (ed). Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues, Series in Medical Physics and Biomedical Engineering, CRC Press Taylor&Francis Group, USA, 2009
- [4] Zirler K., Whole body glucose metabolism, American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, Vol. 276, No.3, pp. 409-426, 1999
- [5] Aronoff S.L., Berkowitz K., Shreiner B., Want L., Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon, Diabetes Spectrum, Vol. 17, No.3, pp.183-190, 2004
- [6] Insulin resistance affects glucose and insulin levels: <http://metabolic-syndrome.insulitelabs.com/>.
- [7] Pathological Complications of Diabetes Mellitus - Diabetic Retinopathy: http://missinglink.ucsf.edu/lm/IDS_106_DM_Complications/default.htm
- [8] Waugh A., Grant A., Anatomy and Physiology in Health and Illness, 9th ed. ,Churchill Livingstone, Elsevier Ltd., Spain, 2004
- [9] International Diabetes Federation, IDF Diabetes Atlas, IDF, Brussels, Belgium, 2011
- [10] Shaw J.E., Sicree R.A., Zimmet P.Z., Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Research and Clinical Practice, Vol. 87, No.1, pp.4-14, 2010
- [11] Whiting D. R, Guariguata L., Weil C., Shaw J., IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. Diabetes Research and Clinical Practice, Vol.94, No.3, pp.311-321, 2011

- [12] Rakocevic I., Miljus D., (eds.), Incidencija i mortalitet od dijabetesa u Srbiji 2000. godine, Serbian Diabetes Registry, Belgrade, 2010
- [13] Bottomley J.M., Raymon F.D., Pharmaco - economic issues for diabetes therapy, Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, Vol. 21, No. 4, pp.657-685, 2007
- [14] Complications of Diabetes, ADA: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-statistics/?loc=DropDownDB-stats>
- [15] Williams R., Van Gaal L., Lucioni C., Assesing the impact of complications on the costs of type II diabetes, Diabetologia, No. 45, pp.13-17, 2002
- [16] Johnsson B., Revealing the cost of Type II diabetes in Europe, Diabetologia, No.45, pp.5-12, 2002
- [17] Zimmet P., The burden of Type 2 diabetes: are we doing enough?, Diabetes Metab, No.29, pp.6S9-6S18, 2003
- [18] Biorac N., Jakovljevic M., Stefanovic D., Perovic S., Jankovic S., Procena troškova lečenja diabetes mellitus-a tip2 u Republici Srbiji. Vojnosanitetski pregled, Vol.66, No. 4, pp.271-276, 2009
- [19] Renard E., Monitoring glycemic control: the importance of self-monitoring of blood glucose, Am J Med, Vol. 118, Supp. 9A, pp. 12S-19S, 2005
- [20] Ryden L., et al. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. European Heart Journal, Vol. 28, No. 1, pp.88-136, 2007
- [21] Clarke W.L. Anderson S., Farhy L., Breton M., Gonder-Frederick L., Cox D., Kovatchev B., Evaluating the Clinical Accuracy of Two Continous Glucose Sensors Using Continous Glucose-Error Grid Analysis. Diabetes Care, No. 28, pp.2412-2417, 2005
- [22] Blood Glucose Meters brands(Roche, Lifescan, Bayer, Arkray, Allmedicus, etc.): <http://changdae.en.ecplaza.net/blood-glucose-monitors--224816-1478342.html>

- [23] Wilkins E., Atanasov P., Glucose Monitoring: State of the Art and Future Possibilities. A Review. *Medical Engineering & Physics*, No. 18, pp. 273-288, 1996
- [24] Abel P.U., Woedtke T.V., Biosensors for glycaemic control. *Sensor review*, Vol. 21, No. 4, pp. 297-304, 2001
- [25] Biomedical devices: <http://bingo13.wordpress.com/category/biomedical-devices/page/2>
- [26] Zimmermann S., Fienbork D., Flounders A. W., Liepmann D., Chemical, 2004 In-device enzyme immobilization: wafer-level fabrication of an integrated glucose sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 99, No.1, pp.163-173, 2004
- [27] Mendelson Y., Optical sensors, in *The Biomedical Engineering Handbook*, Bronzino J.D. (ed.), Boca Raton, pp.764-778, 1995
- [28] Klonoff D.C., Continuous glucose monitoring: Roadmap for 21st century diabetes therapy. *Diabetes Care*, No. 28, pp.1231-1239, 2005
- [29] Pickup J.C., Hussain F., Evans N.D., Sachedina N., In vivo glucose monitoring: the clinical reality and the promise. *Biosensor and Bioelectronics*, No.20, pp.1897-1902, 2005
- [30] Newman J.D., Turner A.P.F., Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 20, No. 12, pp. 2435-2453, 2005
- [31] Arnold M.A., Small G.W., Perspectives in Analytical Chemistry: Noninvasive glucose sensing. *Analytical chemistry*, Vol.77, No.17, pp.5429-5439, 2005
- [32] Rohrscheib M., Robinson R., Eaton R.P., Non-invasive glucose sensors and improved informatics-the future of diabetes management, *Diabetes, obesity, and metabolism*, No.5, pp. 280-284, 2003
- [33] Sieg A., Guy R.H., Delgado-Charro M.B., Noninvasive and minimally-invasive methods for transdermal glucose monitoring, *Diabetes Technology & Therapeutics*, No.7, pp. 174-197, 2005

- [34] Chen W., Liu R., Xu K., Wang R.K., Influence of contact state on NIR diffuse reflectance spectroscopy in vivo. *Journal of physics, D, Applied Physics*, No. 38, pp.2691-2695, 2005
- [35] NBM 200 MP, OrSense Ltd: <http://www.diabetesnet.com/diabetes-technology/meters-monitors/future-meters-monitors/orsense>
- [36] do Amaral, C.E.F., Wolf B., Current development in non-invasive glucose monitoring. *Medical Engineering & Physics*, Vol. 30, No. 5, pp. 541-549, 2008
- [37] do Amaral C.E.F., Brischwein M., Wolf B., Multiparameter techniques for non-invasive measurement of blood glucose, *Sensors and Actuators B-Chemical*, Vol.140, No.1, pp.12-16, 2009
- [38] Yeh S.J., Hanna C.F., Khalil O.S., Monitoring blood glucose changes in cutaneous tissue by temperature-modulated localized reflectance measurements, *Clinical Chemistry*, Vol.49, No.6, pp. 924-934, 2003
- [39] Maruo K., Tsurugi M., Chin J., Ota T., Arimoto H., Yamada Y., Tamura M., Ishii M., Ozaki Y., Noninvasive blood glucose assay using a newly developed near infrared system, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, Vol.9, No. 2, pp.322-330, 2003
- [40] Schrader W., Meuer P., Popp J., Kiefer W., Menzebach J.U., Schrader B., Noninvasive glucose determination in the human eye. *Journal of Molecular Structure*, Vol.735, pp.299-306, 2005
- [41] Kasemsumran S., Du Y., Maruo K., Ozaki Y., Improvement of partial least squares models for in vitro and in vivo glucose quantifications by using near-infrared spectroscopy and searching combination moving window partial least squares, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, No.82, pp. 97–103, 2006
- [42] Olesberg J.T., Liu L., Van Zee V., Arnold V.A., In vivo near-infrared spectroscopy of rat skin tissue with varying blood glucose levels, *Proceedings of the SPIE*, Vol. 5325, pp.180-189, 2004

- [43] Li L-N., Li Q-B., Zhang G-J., A Weak Signal Extraction Method for Human Blood Glucose Noninvasive Measurement using Near Infrared Spectroscopy, *J Infrared Milli Terahz Waves*, No. 30, pp. 1191-1204, 2009
- [44] Xu K., Qiu Q., Jiang J., Yang X., Non-invasive glucose sensing with near-infrared spectroscopy enhanced by optical measurement conditions reproduction technique, *Optics and Lasers in Engineering*, No.43, pp.1096-1106, 2005
- [45] Amir O., Weinstein D., Zilberman S., Less M. , Perl-Treves D., Primack H., Weinstein A., Gabis E., Fikhte B., Karasik A., Continuous Noninvasive Glucose Monitoring Technology Based on “Occlusion Spectroscopy”, *Journal of Diabetes Science and Technology*, Vol.1, No.4, pp. 463-469, 2007
- [46] Li Q-B., Li L-N., Zhang G-J., A nonlinear model for calibration of blood glucose noninvasive measurement using near infrared spectroscopy, *Infrared Physics & Technology*, , No.53, pp.410-417, 2010
- [47] Kawano S., Uwadara Y., Ikeahata A., Factors affecting the accuracy of non-invasing blood glucose measurment by short-wavelength near infrared spectroscopy and development of blood glucose sensor, *NIR 2013 Abstracts*, : pp. 110, 2013
- [48] Leboulanger B., Guy R.H., Begona M., Charro D., Reverse iontophoresis for non-invasive transdermal monitoring, *Physiological Measurement*, No.25, pp. R35-R50, 2004
- [49] Potts R.O., Tamada J.A., Tierney M.J., Glucose monitoring by reverse iontophoresis, *Diabetes/metabolism research and reviews*, No.18, pp. S49-S53, 2002
- [50] Tierney M.J., Tamada J.A., Potts R.O., Eastman R.C., Pitzer K., Ackerman N.R., Fermi S.J., The GlucoWatch® biographer: a frequent, automatic and noninvasive glucose monitor, *Annals of Medicine*, Vol.32, No.29, pp.632-641, 2000
- [51] Tierney, M. J., Tamada, J. A., Potts, R. O., Jovanovic, L., Garg, S., Cygnus Res Team, Clinical evaluation of the GlucoWatch (R) biographer: a continual, non-invasive glucose monitor for patients with diabetes, *Biosensors & Bioelectronics*, Vol.16, No.9-12, pp. 621-629, 2001

- [52] Pitzer, K. R., Desai, S., Dunn, T., Edelman, S., Jayalakshmi, Y., Kennedy, J., Tamada, J. A., Potts, R. O., Detection of hypoglycemia with the GlucoWatch biographer, *Diabetes Care*, Vol.24, No.5, pp. 881-885, 2001
- [53] Chase, H. P., Roberts, M. D., Wightman, C., Klingensmith, G., Garg, S. K., Van Wyhe, M., Desai, S., Harper, W., Lopatin, M., Bartkowiak, M., Tamada, J., Eastman, R. C., Use of the GlucoWatch biographer in children with type 1 diabetes, *Pediatrics*, Vol.111, No.4, pp. 790-794, 2003
- [54] Chase, H. P., Wightman, C., Garg, S. K., Van Wyhe, M., Desai, S., Harper, W., Tamada, J. A., Eastman, R. C., Use of the GlucoWatch (R) biographer in children and adolescents with type 1 diabetes, *Diabetes*, No.51, pp. A119-A120, 2002
- [55] Chase H.P., Beck R., Tamborlane W., Buckingham B., Mauras N., Tsalikian E., Wysocki T., Weinzimer S., Kollman C., Ruedy K., Xing D., A randomized multicenter trial comparing the GlucoWatch biographer in with standard glucose monitoring in children with type 1 diabetes., *Diabetes Care*, Vol. 28, No.5, pp. 1101-1106, 2005
- [56] Newman, S. P., Cooke, D., Casbard, A., Walker, S., Meredith, S., Nunn, A., Steed, L., Manca, A., Sculpher, M., Barnard, M., Kerr, D., Weaver, J., Ahlquist, J., Hurel, S. J., A randomised controlled trial to compare minimally invasive glucose monitoring devices with conventional monitoring in the management of insulin-treated diabetes mellitus (MITRE), *Health Technology Assessment*, Vol. 13, No. 28, pp. 1-194, 2009
- [57] Liu J., Jiang L., Liu H., Cai X., A bifunctional biosensor for subcutaneous glucose monitoring by reverse iontophoresis, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol.660, No.1, pp.8-13, 2011
- [58] GlucoWatch on the wrist: http://cdn.medgadget.com/img/Gluco-wrist_1.jpg.
- [59] GlucoWatch: <http://mendosa.com/glucowatch1.jpg>
- [60] MacKenzie, H. A., Ashton, H. S., Spiers, S., Shen, Y., Freeborn, S. S., Hannigan, J., Lindberg, J., Rae, P., Advances in photoacoustic noninvasive glucose testing, *Clinical Chemistry*, Vol. 45, No.9, pp.1587-95, 1999

- [61] Weiss R., Yegorchikov Y., Shusterman A., Raz I., Noninvasive Continuous Glucose Monitoring Using Photoacoustic Technology—Results from the First 62 Subjects, *Diabetes Technology & Therapeutics*, Vol.9, No.1, pp.68-74, 2007
- [62] von Lilienfeld-Toal, Weidenmuller M., Xhelaj A., Mantele W., A novel approach to non-invasive glucose measurement by mid-infrared spectroscopy: The combination of quantum cascade lasers (QCL) and photoacoustic detection, *Vibrational Spectroscopy*, No.38, pp. 209-215, 2005
- [63] Ko, J. B., Cho, O. K., Kim, Y. O., Yasuda, K., Body metabolism provides a foundation for noninvasive blood glucose monitoring, *Diabetes Care*, Vol.2, No.5, pp. 1211-1212, 2004
- [64] Cho O.K., Kim Y.O., Mitsumaki H., Kuwa K., Noninvasive Measurement of Glucose by Metabolic Heat Conformation Method, *Clinical Chemistry*, Vol.50, No.10 pp. 1894-1898, 2004
- [65] Caduff, A., Hirt, E., Feldman, Y., Ali, Z., Heinemann, L., First human experiments with a novel non-invasive, non-optical continuous glucose monitoring system, *Biosensors & Bioelectronics*, Vol.19, No.3, pp. 209-217, 2003
- [66] Wentholt, I. M. E., Hoekstra, J. B. L., Zwart, A., DeVries, J. H., Pendra goes Dutch: lessons for the CE mark in Europe, *Diabetologia*, Vol.48, No.6, pp.1055-1058, 2005
- [67] Caduff, A., Dewarrat, F., Talary, M., Stalder, G., Heinemann, L., Feldman, Y., Non-invasive glucose monitoring in patients with diabetes: A novel system based on impedance spectroscopy, *Biosensors & Bioelectronics*, Vol.22, No.5, pp. 598-604, 2006
- [68] Pendra, уређај за неинвазивно мерење глукозе на принципу биоимпедансне спектроскопије: <http://www.aktive-diabetiker.at/data-1997-2007/pendratag.htm>
- [69] Caduff A., Talary M.S., Mueller M., Dewarrat F., Klisic J., Donath M., Heinemann L., Stahel W.A., Non-invasive glucose monitoring in patients with Type 1 diabetes: A Multisensor system combining sensors for dielectric and optical characterisation of skin, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol.24, No.9, pp. 2778–2784, 2009

- [70] Caduff, A., Mueller, M., Megej, A., Dewarrat, F., Suri, R. E., Klisic, J., Donath, M., Zakharov, P., Schaub, D., Stahel, W. A., Talary, M. S., Characteristics of a multisensor system for non invasive glucose monitoring with external validation and prospective evaluation, *Biosensors & Bioelectronics*, Vol.26, No.9, pp. 3794-3800, 2011
- [71] Kost J., Mitragotri S., Gabbay R.A., Pishko M., Langer R., Transdermal monitoring of glucose and other analytes using ultrasound, *Nature Medicine*, Vol.6, No.3, pp. 347-350, 2000
- [72] Kost, J., Ultrasound-Assisted Insulin Delivery and Noninvasive Glucose Sensing, *Diabetes Technology & Therapeutics*, No. 4, pp.489-497, 2002
- [73] Esenaliev R.O., Prough D.S., Noninvasive glucose sensing methods and systems, patent application publication, US 2007/0255141 A1, USA, 2007
- [74] Oza G., H Henry P-G., Seaquest E.E., Gruetter R., Direct, noninvasive measurement of brain glycogen metabolism in humans, *Neurochemistry International*, No. 43, pp. 323-329, 2003
- [75] Tura A., Sbrignadello S., Cianciavichia D., Pacini G., Ravazzani P., A Low Frequency Electromagnetic Sensor for Indirect Measurement of Glucose Concentration: In Vitro Experiments in Different Conductive Solutions, *Sensors*, No.10, pp.5346-5358, 2010
- [76] Lakowicz, J.R., Introductory Statement, *Journal of Fluorescence*, Vol.1, No.1, 1991
- [77] McShane M.J, Potential for glucose monitoring with nanoengineered fluorescent biosensors, *Diabetes Technology & Therapeutics*, No.4, pp. 533-538, 2002
- [78] Khalil, O.S., Noninvasive photonic-crystal material for sensing glucose in tears, *Clinical Chemistry*, No.50, pp. 2236-7, 2004
- [79] Zhang J., Hodge W.G., Contact lens integrated with a biosensor for the detection of glucose and other components in tears, US 8,385,998 B2, U.P. Office, USA, 2010
- [80] Moschou E.A., Sharma B.V., Deo S.K., Daunert S., Fluorescence glucose detection: advances toward the ideal in vivo biosensor, *Journal of Fluorescence*, No.14, pp. 535-47, 2004

- [81] March W., Lazzaro D., Rastogi S., Fluorescent measurement in the non-invasive contact lens glucose sensor, *Diabetes Technology & Therapeutics*, No.8, pp. 312-7, 2006
- [82] Cameron B.D., Baba J.S., Cot'e G.L., Optical polarimetry applied to the development of a noninvasive vivo glucose monitor, *Proceedings of SPIE*, Vol. 3923, pp. 66-77, 2004
- [83] Ansari R.R., Bockle S., Rovati L., New optical scheme for a polarimetric-based glucose sensor, *J Biomed Opt*, Vol.9, No.1, pp. 103-15, 2004
- [84] Baba J.S., Cameron .B., Theru S., Cot'e G.L., Effect of temperature, pH, and corneal birefringence on polarimetric glucose monitoring in the eye, *J Biomed*, No.7, pp. 321-8, 2002
- [85] Rawer R., Stork W., Kreiner C.F., Non-invasive polarimetric measurement of glucose concentration in the anterior chamber of the eye, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, No. 242, pp. 1017-23, 2004
- [86] Lo Y.L., Yu T.C., A polarimetric glucose sensor using a liquid crystal polarization modulator driven by a sinusoidal signal, *Opti Commun*, No.259, pp. 40-48, 2006
- [87] Ellis D.I., Goodacre R., Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy, *Analyst*, No.131, pp.875-85, 2006
- [88] Berger A.J., Itzkan I., Feld M.S., Feasibility of measuring blood glucose concentration by near-infrared Raman spectroscopy, *Spectrochim Acta A*, No. 53, pp. 287-92, 1997
- [89] Tar R.V., Steffes P.G., Non-invasive blood glucose measurement system and method using stimulated Raman spectroscopy, US5243983 A, U.P. Office, USA, 1993
- [90] Malchoff, C. D., Shoukri, K., Landau, J. I., Buchert, J. M., A novel noninvasive blood glucose monitor, *Diabetes Care*, Vol.25, No.12, pp. 2268-75, 2002
- [91] Buchert, J.M., Non-invasive continuous blood glucose monitoring, US5823966, UP. Office, USA, 1998
- [92] Krouwer J.S., Cembrowski G.S., A Review of Standards and Statistics Used to Describe Blood Glucose Monitor Performance, *Journal of Diabetes Science and Technology*, Vol.4, No.1, pp. 75-83, 2010

- [93] European Committee for Standardization, In vitro diagnostic test systems--requirements for bloodglucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus, International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2003
- [94] Clarke W.L, Cox D., Gonder-Frederick L.A., Carter W., Pohl S.L., Evaluating Clinical Accuracy of Systems for Self-Monitoring of Blood Glucose, Diabetes Care, Vol.10, No.5, pp. 622-628, 1987
- [95] Wilson G.S., Gifford R., Biosensors for real-time in vivo measurements. Biosensors and Bioelectronics, Vol. 20, No.12, pp. 2388-2403, 2005
- [96] Standardization, E.C.F., DIN EN ISO 15197: In Vitro Diagnostic Test Systems– Requirements for Blood Glucose Monitoring Systems for Self-Testing in Managing Diabetes Mellitus (ISO 15197:2003). E.C.f. Standardization, : Brussels, 2003
- [97] Freckmann G., Baumstark A., Jendrike N., Zschornack E., Kocher S., Tshiananga J., Heister F., Haug C., System Accuracy Evaluation of 27 Blood Glucose Monitoring Systems According to DIN EN ISO 15197, Diabetes Technology & Therapeutics, Vol. 12, No.3, pp. 221-231, 2010.
- [98] Tuchin V.V.(ed.), Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues, Taylor&Francis Group, LLC, 2009
- [99] McNichols R.J., Cote G.L., Optical glucose sensing in biological fluids: an overview, Journal of Biomedical Optics, Vol.5, No.1, pp. 5-16, 2000
- [100] Klonoff D.C., Benefits and Limitations of Self-Monitoring of Blood Glucose, Journal of Diabetes Science and Technology, Vol.1, No.1, pp. 130-132, 2007
- [101] Vaddiraju, S., Burgess D. J., Tomazos I., Jain F. C., Papadimitrakopoulos F., Technologies for continuous glucose monitoring: current problems and future promises, J Diabetes Sci Technol, Vol.4, No.6, pp. 1540-62, 2010
- [102] Burmeister J.J., Arnold M.A., Evaluation of Measurement Sites for Noninvasive Blood Glucose Sensing with Near-Infrared Transmission Spectroscopy. Clinical Chemistry, Vol.45, No.9, pp.1621-7, 1999

- [103] Khalil O.S., Spectroscopic and Clinical Aspects of Noninvasive Glucose Measurements. Clinical Chemistry, Vol. 45, No.2, pp. 165-177, 1999
- [104] Tsenkova R., Introduction: Aquaphotomics: dynamic spectroscopy of aqueous and biological systems describes peculiarities of water, Journal of Near Infrared Spectroscopy, Vol.17, No.1, pp. 303-313, 2009
- [105] Koruga Dj., Tomic A., Method and algorithm for analysis of light-matter interaction based on spectral convolution, US Pat. App. No. 61/061, 852, 2008, PCT/US2009/030347, U.S. Patent Office, USA, 2009
- [106] Bandic J., Koruga Dj., Mehendale R., Marinkovich S., System, device and method for dermal imaging, US Pat. App. No. PCT/US2008/050438, U.S. Patent Office, USA 2008
- [107] Ophard C.E., Virtual Chembook, Elmhurst College: Illinois, 2003
- [108] Bakier S., Application of NIR spectroscopy for the analysis of water-carbohydrate interactions in water solutions, Acta Agrophysica, Vol.11, No.1, pp. 7-21, 2008
- [109] Giangiacomo, R., Study of water-sugar interactions at increasing sugar concentration by NIR spectroscopy, Food Chemistry, Vol. 96, No.3, pp. 371-379, 2005
- [110] Giangiacomo, R., Pani P., Barzaghi S., Sugars as a perturbation of the water matrix, Journal of Near Infrared Spectroscopy, Vol. 17, No.1, pp. 329 -335, 2009
- [111] Yuzhen C., Zhang W., Liu R., Zhang W., Xu K., Cote G.L., Study of specificity for noninvasive glucose measurements based on two-dimensional correlation mid-infrared spectroscopy, Proc. of SPIE Vol. 8229 82291B-1, 2012
- [112] do Amaral C.E.F., Multiparameter Methods for Non-invasive Measurement of Blood Glucose, PhD thesis, Institut für Elektronik, Technischen Universität München, München, 2008
- [113] Bozkurt A., Onaral B., Safety assessment of near infrared light emitting diodes for diffuse optical measurements, BioMedical Engineering OnLine, Vol.3, No.1, pp. 9, 2004

- [114] Guo B., Wang Y., Peng C., Zhang H., Luo G., Le H., Gmachl C., Sivco D., Peabody M., Cho A., Laser-based mid-infrared reflectance imaging of biological tissues, *Opt. Express*, Vol.12, No.1, pp. 208-219, 2004
- [115] Vogel A., Venugopalan V., Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues, *Chemical Reviews*, Vol.103, No.2, pp. 577-644, 2003
- [116] Shaw R.A., Mantsch H.H., Infrared Spectroscopy in Clinical and Diagnostic Analysis, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers, (Ed.) John Wiley & Sons Ltd: Chichester, 2000
- [117] Skin composition : <http://www.aimatmelanoma.org/images/content/1/1/11248.jpg>
- [118] Whitton J.T, Everall J.D., The thickness of the epidermis, *British Journal of Dermatology*, Vol.89, No.5, pp. 467-476, 1973
- [119] Magnenat-Thalmann N., Kalra P., Luc Leveque J., Bazin R., Batisse D., Querleux B., A computational skin model: fold and wrinkle formation. *Information Technology in Biomedicine*, *IEEE Transactions*, Vol. 6, No.4, pp. 317-323, 2002
- [120] Zhao Z.M., Pulsed photoacoustic techniques and glucose determination in human blood and tissue, PhD thesis, University of Oulu, Finland, 2002
- [121] Sieg A., Guy R.H., Delgado-Charo M.B., Noninvasive and Minimally Invasive Methods for Transdermal Glucose Monitoring, *Diabetes Technology & Therapeutics*, Vol.7, No.1, pp. 174-197, 2005
- [122] Epidermis structure: http://4.bp.blogspot.com/_OwoEg7Db_AE/TQDe-y2KaSI/AAAAAAAAA3s/EuXzg6N1NMA/s1600/SKin.png.
- [123] Khalil O.S., Non-invasive glucose measurement technologies: an update from 1999 to the dawn of the new millennium, *Diabetes Technol Ther*, Vol. 6, No.5, pp. 660-97, 2004
- [124] Wray S., Mark C., Delpy D.T., Wyatt J.S., Reynolds E. Osmund R., Characterization of the near infrared absorption spectra of cytochrome aa3 and haemoglobin for the non-invasive monitoring of cerebral oxygenation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, Vol.933, No.1, pp. 184-192, 1998

- [125] Kollias N., Baqer A., Spectroscopic Characteristics of Human Melanin In Vivo, Journal of Investigative Dermatology, Vol.85, No.1, pp. 38-42, 1985
- [126] Kollias N., Sayre R. M., Zeise L., Chedekel M. R., Photoprotection by melanin, J Photochem Photobiol B, Vol.9, No.2 pp. 135-60, 1991
- [127] Downing H.D., Williams D., Optical Constants of Water in the Infrared. J. Geophys. Res., Vol.80, No.12, pp. 1656-1661, 1975
- [128] Hale G.M., Querry M.R., Optical Constants of Water in the 200-nm to 200-microm Wavelength Region, Appl Opt, Vol.12, No.3, pp. 555-63, 1973
- [129] Saidi I.S., Jacques S.L., Tittel F.K., Mie and Rayleigh modeling of visible-light scattering in neonatal skin, Appl. Opt., Vol.34, No.31, pp. 7410-7418, 1995
- [130] Dunn A., Richards-Kortum R., Three-dimensional computation of light scattering from cells, Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal, Vol.2, No.4, pp. 898-905, 1996
- [131] Schmitt J.M., Kumar G., Turbulent nature of refractive-index variations in biological tissue, Opt Lett, Vol.21, No.16, pp. 1310-2, 1996
- [132] Schmitt J.M., Kumar G., Optical Scattering Properties of Soft Tissue: A Discrete Particle Model, Appl. Opt., Vol.37, No.13, pp. 2788-2797, 1998
- [133] Mourant J.R., Polarized angular dependent spectroscopy of epithelial cells and epithelial cell nuclei to determine the size scale of scattering structures, J Biomed Opt, Vol.7, No.3, pp. 378-87, 2002
- [134] Goldman J.N., Benedek G.B., The relationship between morphology and transparency in the nonswelling corneal stroma of the shark, Invest Ophthalmol, Vol.6, No.6, pp. 574-600, 1967
- [135] Accu-Chek Active Blood Glucose Meter - Instructions for use: <https://www.accu-chek.com/index.html>.
- [136] Honess J., Muler P., Surridge N., The Technology Behind Glucose Meters: Test Strips, Diabetes Technology & Therapeutics, Vol.10, No.1, pp. S10-S26, 2008

- [137] Tsenkova R., Aquaphotomics: Water in the biological and aqueous world scrutinized with invisible light, Spectroscopy Europe, Vol.22, No.6, pp. 6-10, 2010
- [138] Jacques S.L., Biomedical Optics: <http://omlc.ogi.edu/news/jan98/skinoptics.html>
- [139] Matija L., Kojic D., Vasic A., Jovanovic T., Koruga Dj., Uvod u Nanotehnologije, Nauka, Beograd, 2010
- [140] Koruga Dj., Ratkaj Z., Matija L., Classical and Quantum Information Channels in Protein Chain, Materials Science Forum, Vol.518, pp. 491-496, 2006
- [141] Koruga Dj., Miljkovic S., Ribar S., Matija L., Kojic D., Water Hydrogen Bonds Study by Opto-Magnetic Fingerprint Technique, Acta Physica Polonica A, Vol.117, No.5, pp. 777-781, 2010
- [142] Papic-Obradovic M., Kojic D., Matija L., Opto-Magnetic Method for Epstein — Barr Virus and Cytomegalovirus Detection in Blood Plasma Samples, Acta Physica Polonica A, Vol.117, No.5, pp. 782-785, 2010
- [143] Muncan J., Comparative study of structure and properties of water by IR and Opto-magnetic spectroscopy, Contemporary materials, Vol. 3, No.1, pp. 72-80, 2012
- [144] Muncan J., Janjic G., Influence of carcinogen compounds on hydrogen bonds in water. Contemporary materials, Vol. 3, No.1, pp. 123-130, 2012
- [145] Materlli F., Del Bianco S., Ismaelli A., Zaccanti G., Light Propagation through Biological Tissue and Other Diffusive Media: Theory, Solutions, and Software, SPIE, 2010
- [146] Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Tuchin V.V., Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm, Journal of Physics D: Applied Physics, Vol.38, No.15, pp. 2543, 2005
- [147] Geladi P., Kowalski B.R., Partial least-square regression: A tutorial. Analytica Chimica Acta, Vol.185, pp. 1-17, 1986

- [148] Martens H., Naes T., Multivariate calibration by data compression, in Near-infrared technology in the agricultural and food industries, K.N. P. Williams (ed.) St Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, Inc. pp. 57-82, 1987
- [149] Song K., Jang P., Cho H., Jun C., Partial least square-based model predictive control for large-scale manufacturing processes, IEEETransactions, Vol.34, pp. 881-890, 2004
- [150] Noda I., Dowrey A.E., Marcott C., Story G.M, Ozaki Y., Generalized Two-Dimensional Correlation Spectroscopy. Applied Spectroscopy, Vol.54, No.7, pp. 236-248, 2001

Биографија кандидата

Јелена Мунђан је рођена 1982. године у Вршцу.

Године 2008. дипломирала је на смеру Производно машинство са просечном оценом 9.28. Као сарадник у настави учествовала је у одржавању наставе на предметима Технологија машиноградње, Производни системи и Компјутерска графика.

Докторске студије на модулу Биомедицинско инжењерство уписала је 2008. године, када добија стипендију Министарства за науку, технологију и развој Републике Србије. Као стипендиста истраживач 2009.године ангажована је на пројекту „Истраживање у области замора, механике лома и поузданости рударских и енергетских конструкција“ и учествује у одржавању наставе на предмету Машински елементи.

Године 2010. ангажована је на пројекту „Развој метода и техника за карактеризацију биоматеријала, биомолекула и ткива помоћу Наноскопа и биоимпедансе“ и учествује у извођењу наставе на предмету Анатомија и физиологија човека за инжењере.

У својству истраживача сарадника, 2011.године заснива радни однос са Машинским факултетом у Београду, и ради на пројектима „Функционализација наноматеријала за добијање нове врсте контактних сочива и рану дијагностику дијабетеса“, и „Развој нових метода и техника за рану дијагностику канцера и меланома“. Учествоје у одржавању наставе на предметима Фрактална механика, Биофизика, Спектроскопске методе и технике.

Године 2010. била је на усавршавању на Кобе Универзитету, Јапан из области спектроскопије и Аквафотомике. Године 2013. била је на усавршавању на Токијском Институту за технологију, Јапан, у области хиперспектралног имиџинга у дијагностици канцера.

Добитник је Гилберт Линг награде за најбољи постер на конференцији Биологија, хемија и физика воде, 2012, у Вермонту, САД. Држала је гостујућа предавања у

Истраживачком центру Масачусетског Универзитета у Амхерсту, САД, 2012.године, и на Токијском факултету за медицину и стоматологију, Јапан, 2013. године. Била је и гостујући предавач под руководством проф. др Ђ. Коруге на предмету Основе наномедицине на докторским студијама Европског центра за мир и развој, Универзитета за Мир Уједињених Нација, у Пули, 2013. године.

Прилог 1

1. Дијабетес – опште информације

Термин Diabetes mellitus описује поремећај метаболизма вишеструке етиологије, који се манифестује хроничном хипергликемијом са поремећајима метаболизма угљених хидрата, масти и протеина који је резултат поремећаја секреције инсулина, дејства инсулина или оба.

Основни дијагностички критеријум за дијабетес је концентрација глукозе (Табела 1):

Табела 30. Концентрација глукозе као дијагностички критеријум за дијабетес (адаптирано на основу [3])

Тест	Нормалне вредности	Дијабетес
Гликемија пре јела (на празан стомак)	<100 mg/dl (<5.6 mmol/l)	≥126 mg/dl (≥ 7 mmol/l)
Орални тест толеранције на глукозу	<140 mg/dl (<7.7 mmol/l)	≥200 mg/dl (≥ 11.1 mmol/l)

Последице дијабетеса укључују дугорочна оштећења, дисфункцију и отказивање различитих органа [2].

Постоје два основна типа дијабетеса:

1. Дијабетес типа 1 који се углавном развија у детињству и адолесценцији, и пацијентима је неопходна доживотна инсулинска терапија
2. Дијабетес типа 2, се углавном развија у одраслом добу и у вези је са гојазношћу, недостатком физичке активности и нездравим навикама у исхрани. Ово је чешћи тип дијабетеса (представља 90% случајева дијабетеса у свету) и третман укључује промене у животним навикама, смањење телесне тежине, терапија оралним лековима или инјекције инсулина.
3. Остале категорије – укључују гестациони дијабетес (стање хипергликемије које се развија у току трудноће) и други ретки узорци (генетски синдром, стечен услед панкреатитиса, болести као што је цистична фиброза, изложеност одређеним лековима, дрогама, вирусима или другим непознатим узроцима).

Постоје и стања хипергликемије који се дефинишу као поремећај метаболизма глукозе и поремећаји толеранције на глукозу. Ова стања су значајна јер могу да се развију у дијабетес, али мршављење и промене у животном стилу могу да спрече или одложе развој дијабетеса.

Основна карактеристика дијабетеса, без обзира на тип је хипергликемија, односно повишени ниво глукозе у крви. Основне последице дијабетеса на организам су:

- ❖ Преузимање и искоришћење глукозе од стране ћелије ја дефектно
- ❖ Конверзија глукозе у гликоне у јетри и мишићима је смањена

- ❖ Јавља се глуконеогенеза из протеина као одговор на дефицијент интрацелуларне глукозе.

Краткорочно, хипергликемија проузрокује следеће симптоме: повишена жеђ, чешће мокрење, повећани осећај глади, и губитак тежине. Дугорочно, хипергликемија доводи до оштећења вида (слепило), бубрега (отказивање бубрега), и нерава (доводи до импотенције и деформација стопала што у неким случајевима доводи до ампутације). Такође, хипергликемија повећава ризик од срчаних болести, можданог удара и отежане циркулације крви у стопалима.

Примарни циљ терапије је да се повишени ниво шећера у крви доведе у нормалне границе, како би се ублажили симптоми дијабетеса и спречиле или одложиле компликације услед дијабетеса.

1.1. Дијабетес тип 1

Дијабетес типа 1 се јавља углавном код деце и младих људи и развој болести је најчешће изненадан. Дијабетес типа 1 погађа око 10% пацијената од укупног броја оболелих од дијабетеса. Недостатак инсулина у организму је основни узрок настанка овог типа дијабетеса, а резултат је деструкције β -ћелија Лангерханових острваца панкреаса. Узроци уништавања ових ћелија нису у потпуности познати али постоји фамилијална тенденција која сугерише генетичку компоненту. У многим случајевима постоји аутоимуна реакција у којој су присутна антитела на β -ћелије. У неким случајевима присутна су и антитела на вирусе и она могу уништавати ове ћелије директно или преко аутоимуног механизма [3].

У наставку следи кратак преглед основних информација о овом типу болести [2].

Основне карактеристике:

- ❖ Познат и под називом инсулин-зависни дијабетес (*IDDM – Insulin-dependent Diabetes Mellitus*)
- ❖ Узрок хипергликемије лежи у апсолутном недостатку хормона инсулина који се производи у панкреасу
- ❖ Пацијенту је неопходна доживотна терапија инјекцијама инсулина
- ❖ Обично се развија у детињству или адолесценцији (иако може да се јави и касније у животу)
- ❖ Може имати веома озбиљне последице као што су кома или кетоацидоза
- ❖ Пацијенти углавном нису гојазни
- ❖ Пацијенти носе повећан ризик од развоја микроваскуларних и макроваскуларних компликација

Етиологија болести:

- ❖ Најчешће (али не у свим случајевима) узрок је аутоимуна деструкција бета ћелија панкреаса са присутним одређеним антителима у крви
- ❖ Комплексна болест проузрокована мутацијама на више гена, као и факторима средине

Симптоми:

- ❖ Повећана учестаност мокрења (полиурија), жеђ (полидипсија), глад(полифагија), и необјашњив губитак тежине
- ❖ Утрнулост и губитак осећаја у екстремитетима, бол у стопалима, умор, замућен вид
- ❖ Инфекције које се понављају, озбиљне инфекције
- ❖ Губитак свести или јака мучнина и повраћање, кетоацидоза и кома

Дијагноза:

- ❖ Дијагноза се успоставља на основу присуства класичних симптома хипергликемије и абнормалних резултата лабораторијских тестова крви
- ❖ Концентрација глукозе у плазми је $\geq 7\text{mmol/l}$ (162mg/dl) или $\geq 11.1\text{mmol/l}$ (200mg/dl) 2 сата након администрације 75g глукозе (тест оптерећења глукозом)
- ❖ Код пацијената који не испољавају класичне симптоме дијагноза се може успоставити на основу абнормалних резултата лабораторијских тестова крви урађених два пута у различитим данима
- ❖ У већини случајева (иако то није случај у многим земљама са ниским националним дохотком) ради се и тест HgbA1C (гликолизирани хемоглобин, хемоглобин који се везује за глукозу, код дијабетичара се повећава проценат везаног хемоглобина). Ниво HgbA1C је у корелацији са нивоом глукозе у претходни 2-3 месеца. Због тога омогућава информације у праћењу гликемије него појединачно одређивање глукозе.

Терапија обухвата:

- ❖ Циљ терапије је ублажавање симптома и превенција или одлагање компликација контролисањем нивоа глукозе и довођењем у нормалне физиолошке границе
- ❖ Инјекције инсулина се примењују доживотно и подразумевају различиту и пацијенту прилагођену организацију терапије (кратко-делујући и дуготрајно-делујући лекови, више инјекција пре оброка, једном или два пута у току дана, инсулинске пумпе итд.)
- ❖ Конзистентно снабдевање организма инсулином је есенцијално
- ❖ Примена глюкометара у циљу само-надгледања глукозе у крви
- ❖ Рана дијагностика и терапија компликација
- ❖ Едукација пацијента о дијабетесу, исхрани, физичким активностима и нези стопала
- ❖ Уколико је могуће, учествовање у групама за подршку особама са дијабетесом

1.2. Дијабетес тип 2

Дијабетес типа 2 је најчешћа форма ове болести, која обухвата 90% свих случајева дијабетеса. Највећи део оболелих од дијабетеса типа 2, такође пати и од гојазности, а болест се углавном развија код жена после 75. године живота, односно код мушкараца после 65. године. Узрок настанка болести није довољно разјашњен и претпоставља се да је заправо у питању комбинација различитих фактора која доводи до обољења, различитих токова болести и крајњег исхода.

Код овог типа болести секреција инсулина може бити испод или изнад границе нормалног. Дефицит глукозе у ћелијама јавља се у току хипергликемије иако је ниво инсулина довољан. Разлог томе могу бити промене на ћелијској мембрани које блокирају улазак глукозе у ћелију уз помоћ инсулина (инсулинска резистенција)[3].

У наставку су прегледно дате основне информације о овом типу дијабетеса како их даје Светска здравствена организација (WHO) [2].

Основне карактеристике:

- ❖ Познат и као инсулин-независни дијабетес (NIDDM – *Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus*)
- ❖ Карактерише се хипергликемијом услед поремећаја у секрецији инсулина, као и инсулинском резистенцијом
- ❖ Пацијенти углавном не захтевају доживотне инјекције инсулина, већ се ниво глукозе у крви може кориговати и променом у исхрани и физичком активношћу, или у комбинацији са лековима, као и додавањем инсулина
- ❖ Обично (али не увек) се развија у одраслом добу
- ❖ У вези је са гојазношћу, смањеном физичком активношћу и нездравим навикама у исхрани
- ❖ Као и у случају дијабетеса типа 1 пацијенти су изложени високом ризику развоја микро и макроваскуларних компликација

Етиологија болести:

- ❖ У вези је са гојазношћу, смањеном физичком активношћу и нездравим навикама у исхрани (и у скоро свим случајевима укључује инсулинску резистенцију)
- ❖ Чешће се јавља код особа са хипертензијом, дислипидемијом (абнормални профил холестерола) и гојазношћу и компонента је „метаболичког синдрома“
- ❖ Често се јавља породични, али је комплексна болест проузрокована мутацијама на више гена као и факторима средине

Симптоми:

- ❖ Пацијенти могу бити асимптоматични, или имати минималне симптоме годинама пре дијагнозе
- ❖ Може бити повећана учестаност мокрења, жеђ, глад и необјашњив губитак тежине
- ❖ Може постојати утрнулост екстремитета, бол у стопалима и замућен вид
- ❖ Пацијенти могу доживети губитак свести или кому, али се то много ређе дешава него код дијабетеса типа 1

Дијагноза:

- ❖ Дијагноза се успоставља на основу присуства класичних симптома хипергликемије и абнормалних резултата лабораторијских тестова крви
- ❖ Концентрација глукозе у плазми је $\geq 7\text{mmol/l}$ (162mg/dl) или $\geq 11.1\text{mmol/l}$ (200mg/dl) 2 сата након администрације 75g глукозе (тест оптерећења глукозом)

- ❖ Код пацијената који не испољавају класичне симптоме дијагноза се може успоставити на основу абнормалних резултата лабораторијских тестова крви урађених два пута у различитим данима
- ❖ У већини случајева (иако то није случај у многим земљама са ниским националним дохотком) ради се и тест HgbA1C (гликолизирани хемоглобин, хемоглобин који се везује за глукозу, код дијабетичара се повећава проценат везаног хемоглобина). Ниво HgbA1C је у корелацији са нивоом глукозе у претходни 2-3 месеца. Због тога омогућава информације у праћењу гликемије него појединачно одређивање глукозе.
- ❖ Код неких асимптоматичних пацијената, дијагноза се успоставља приликом рутинских здравствених прегледа уколико се пацијент налази у ризичној групи (гојазност, хипертензија и сл.)

Терапија обухвата:

- ❖ Циљ терапије је ублажавање симптома и превенција или одлагање компликација насталих услед дијабетеса, путем контролисања нивоа глукозе у крви и адекватним акцијама
- ❖ Пацијентима се преписује дијета/физичка активност, са додатком оралних лекова и инсулина или само инсулинском терапијом
- ❖ Примена глукометара у циљу селф-мониторинга глукозе у крви
- ❖ Самопреглед пацијената у потрази са симптомима хипогликемије (повећана глад, палпитација, знојење, дрхтање, поспаност и вртоглавица)
- ❖ Едукација пацијента о исхрани, физичким вежбама и нези стопала

1.3. Гестациони дијабетес

Гестациони дијабетес се развија у току трудноће и најчешће нестаје након порођаја, али чест је случај да се поново јавља касније у животу. У току трудноће, плацента обезбеђује исхрану фетуса, односно ембриона, али такође она при том ствара одређен број хормона који утичу на уобичајену телесну реакцију на инсулин (инсулинску резистенцију). Повишени ниво глукозе у крви у току трудноће доводи до рађања изразито велике одојчади, али може довести и до рађања мртвог плода или смрти беба недуго након рођења [3].

Следи преглед општих карактеристика гестационог дијабетеса према подацима Светске здравствене организације [2].

Опис болести:

- ❖ Карактерише се хипергликемијом различитог интензитета која се дијагностикује у току трудноће (а да трудница претходно нема историју дијабетеса) и обично (али не у свим случајевима нестаје 6 недеља након порођаја)
- ❖ Представља ризик за трудноћу који укључује конгениталне малформације, већу тежину плода и повећан ризик перинаталне смртности
- ❖ Повећан ризик обољевања од дијабетеса типа 2 касније у животу

Етиологија:

- ❖ Механизам настанка болести није добро разјашњен, али је познато да лучење хормона у трудноћи утиче на дејство инсулина

Симптоми:

- ❖ Повећана жеђ и повећана учестаност мокрења
- ❖ С обзиром да трудноћа сама по себи доводи до повећане учестаности мокрења некада се овај симптом превиди
- ❖ Величина плода већа од уобичајене може на пренаталном прегледу бити један од показатеља и захтевати проверу тестова за утврђивање гестационог дијабетеса

Дијагноза:

- ❖ Стандардни гликемијски тестови се врше на 24-28 недеља на празан стомак (вредности глукозе у плазми ујутру на празан стомак и глукоза у плазми 2 сата након оралне администрације 75g глукозе)
- ❖ Двочасовни ниво глукозе већи или једнак 7.8mmol/l (140mg/dl) сматра се дијагностичким критеријумом за гестациони дијабетес
- ❖ Уколико је ниво глукозе у плазми ујутру на празан стомак и постпрандијални ниво повећан у првом триместру трудноће, то може бити индикација већ постојећег дијабетеса пре трудноће (који представља другачије обољење са другачијим импликацијама и захтева другачији третман)

Терапија:

- ❖ Стриктна контрола нивоа глукозе како би се смањио ризик у трудноћи по мајку и плод
- ❖ Пацијентима се препоручује посена исхрана и физичка активност у комбинацији са оралним лековима или инсулина
- ❖ Примена глюкометара за праћење нивоа глукозе у крви
- ❖ Едукација пацијената о здравој исхрани и физичком вежбању
- ❖ Едукација пацијенткиња након порођаја о начинима за скидање сувишних килограма насталих у току трудноће као и физичкој активности и мерама које могу предузети за превенцију дијабетеса у будућности
- ❖ Доживотно праћење нивоа глукозе јер пацијенти спадају у ризичну групу за обољевање од дијабетеса типа 2

2. Рецептурса за добијање водених раствора глукозе

Рецептура за добијање по 1dl раствора глукозе концентрација 5mmol/l, 10mmol/l, 15mmol/l, 20mmol/l коришћењем 10% раствора Glucosi Infundibile:

100g глукозе → 10% масени раствор

1l 10% раствора: растворена супстанца – глукоза; растварач: вода

$$m_{gl} = 100g$$

$$\text{Моларна маса глукозе: } M_{gl}(C_6H_{12}O_6) = 6 \cdot 12 + 12 \cdot 1 + 6 \cdot 16 = 72 + 12 + 96 = 180g/mol$$

$$\text{Количина супстанце: } n_{gl} = \frac{m}{M} = \frac{100g}{180g/mol} = 0.555 \frac{g}{mol}$$

Потребне концентрације: 5mmol/l, 10mmol/l, 15mmol/l, 20mmol/l.

Укупна запремина добијеног раствора глукозе 1dl.

Прорачун потребне запремине 10% раствора глукозе (V_x) и чисте воде (V_{vode}) да би се добио 1dl раствора глукозе наведене концентрације :

$$c = 5 \text{ mmol/l}$$

$$0.555mol \cdot V_x = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot 0.1 \text{ l} \rightarrow V_x = 0.9ml; V_{vode} = 99.1ml$$

$$c = 10 \text{ mmol/l}$$

$$0.555mol \cdot V_x = 10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot 0.1 \text{ l} \rightarrow V_x = 1.8ml; V_{vode} = 98.2ml$$

$$c = 15 \text{ mmol/l}$$

$$0.555mol \cdot V_x = 15 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot 0.1 \text{ l} \rightarrow V_x = 2.7ml; V_{vode} = 97.3ml$$

$$c = 20 \text{ mmol/l}$$

$$0.555mol \cdot V_x = 20 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot 0.1 \text{ l} \rightarrow V_x = 3.6ml; V_{vode} = 96.4ml$$

Рецептура за добијање по 2dl раствора глукозе концентрација 5mmol/l, 10mmol/l, 15mmol/l, 20mmol/l и 25mmol/l коришћењем праха чисте глукозе:

Концентрација воденог раствора глукозе: **c=5mmol/l**

$$V_{vode} = 200ml = 200cm^3$$

$$c = \frac{n}{V} \rightarrow n = c \cdot V = \frac{5mmol}{1dm^3} \cdot 200cm^3 = \frac{5mmol}{1000cm^3} \cdot 200cm^3 = 1mmol$$

$$M_{glukoze} = 180 \frac{g}{mol} \quad M = \frac{m}{n}$$

$$m_{glukoze} = M \cdot n = 180 \frac{g}{mol} \cdot 10^{-3} mol = \mathbf{0.18g}$$

Концентрација воденог раствора глукозе: **c=10mmol/l**

$$V_{vode}=200ml=200cm^3$$

$$c = \frac{n}{V} \rightarrow n = c \cdot V = \frac{10mmol}{1dm^3} \cdot 200cm^3 = \frac{10mmol}{1000cm^3} \cdot 200cm^3 = 2mmol$$

$$M_{glukoze} = 180 \frac{g}{mol} \quad M = \frac{m}{n}$$

$$m_{glukoze} = M \cdot n = 180 \frac{g}{mol} \cdot 2 \cdot 10^{-3} mol = \mathbf{0.36g}$$

Концентрација воденог раствора глукозе: **c=15mmol/l**

$$V_{vode}=200ml=200cm^3$$

$$c = \frac{n}{V} \rightarrow n = c \cdot V = \frac{15mmol}{1dm^3} \cdot 200cm^3 = \frac{15mmol}{1000cm^3} \cdot 200cm^3 = 3mmol$$

$$M_{glukoze} = 180 \frac{g}{mol} \quad M = \frac{m}{n}$$

$$m_{glukoze} = M \cdot n = 180 \frac{g}{mol} \cdot 3 \cdot 10^{-3} mol = \mathbf{0.54g}$$

Концентрација воденог раствора глукозе: **c=20mmol/l**

$$V_{vode}=200ml=200cm^3$$

$$c = \frac{n}{V} \rightarrow n = c \cdot V = \frac{20mmol}{1dm^3} \cdot 200cm^3 = \frac{20mmol}{1000cm^3} \cdot 200cm^3 = 4mmol$$

$$M_{glukoze} = 180 \frac{g}{mol} \quad M = \frac{m}{n}$$

$$m_{glukoze} = M \cdot n = 180 \frac{g}{mol} \cdot 4 \cdot 10^{-3} mol = \mathbf{0.72g}$$

Концентрација воденог раствора глукозе: **c=25mmol/l**

$$V_{vode}=200ml=200cm^3$$

$$c = \frac{n}{V} \rightarrow n = c \cdot V = \frac{25mmol}{1dm^3} \cdot 200cm^3 = \frac{25mmol}{1000cm^3} \cdot 200cm^3 = 5mmol$$

$$M_{glukoze} = 180 \frac{g}{mol} \quad M = \frac{m}{n}$$

$$m_{glukoze} = M \cdot n = 180 \frac{g}{mol} \cdot 5 \cdot 10^{-3} mol = 0.9g$$

3. Аквафотомика

3.1. Вода као мултиелементни систем

Основна компонента свих биолошких система је вода. И поред комплексних и опсежних истраживања својства и функционалност воде и даље представљају непознаницу.

У истраживању физичко-хемијских својстава воде примењиване су бројне методе: спектрометрија X-зрачења, инфрацрвена спектроскопија (IR), Раманова спектроскопија, нуклеарна магнетна резонанца (NMR), диелектрична релаксациона спектроскопија (DRS), Терахерц спектроскопија (THz), неутронска дифракција и многе друге. Свака од ових метода омогућила је нова сазнања о различитим аспектима воде. Међутим за разумевање воде као система од круцијалног значаја за живот, није довољно посматрати воду само као физички објекат и постоји потреба за развојем нових метода које ће омогућити ин виво, неинвазивну динамичку анализу биолошких и водених система у реалном времену.

Познато је да људске ћелије садрже чак и до 90% воде, међутим у биолошким наукама приликом истраживања природних феномена или узрока болести, фокус се поставља на јединствене биолошке молекуле који су у вези са датим феноменом или болешћу. Могућност да су ове појаве резултат симултаног динамичког учешћа више различитих компоненти живих система, нарочито воде као медијума, најчешће се не разматра.

Структура важних биомолекула као што су на пример протеини и нуклеотиди уско је повезана са њиховом функцијом. Савијање и стабилизација терцијарних и кватернарних структура је у великој мери резултат стварања водоничних веза са околним молекулима воде. На пример, формирање терцијарне структуре протеина, при чему његова структура дефинише његову функцију, је највећим делом заправо процес излагања хидрофилних делова и сакривања хидрофобних резидуа молекула. Отуда је дакле, формирање функционалне структуре протеина, последица интеракције са околном водом. Иако структура воде није до сада адекватно објашњена и моделирана, са становишта спектроскопије постоји слагање да се може посматрати као мрежа односно матрикс или матрица водених молекулских конформација са различитим популацијама водоничних веза и специјалном дистрибуцијом у сврху прилагођавања и омогућавања различитих функција, укључујући и биолошке. Како јачина водоничне везе и њена локација одређују њену функционалност, то се она може описати као

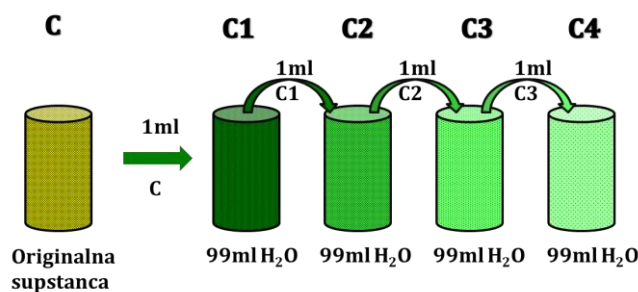
мултифункционални „објекат“ који истовремено има много „лица“ односно много структура.

3.2. Историјски преглед

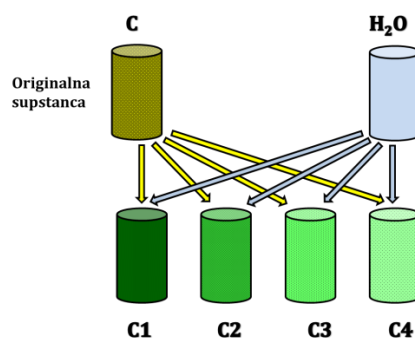
Први спектар воде у блиској инфрацрвеној области снимљен је пре скоро 100 година (Collins, 1925.g.). Тада су први пут уочени пикови на 775нм, 980нм, 1220нм, 1450нм и 1997нм у хладној води (0°C). Међутим, при вишим температурама од 0,5°C па до 90-96°C, нови пикови се јављају на краћим таласним дужинама. Касније студије су показале да претходно су описане водене апсорпционе траке у НИР спектру под утицајем других конституената у води, као што су соли на пример. Ово је показатељ да је спектар воде као медијума зависан од вибрационих модова молекула у води као растварачу. Другим речима, молекуларне вибрације воде, тј. молекуларне конформације су под утицајем интеракције молекула у воденом раствору. Већ ове ране студије наговестиле су да је за разумевање интеракције НИР енергије и воде у својим различитим молекуларним конформација од кључног интереса за разумевање свих водених система. Касније студије укључујући и оне данас, пријавиле су постојање неколико апсорпционих трака воде у НИР области. Даље анализе потврдиле су да се ови пикови систематично понављају у вис-НИР области приликом анализе узорака различитог порекла. И иако су ови узорци били по много чему различити, основна одлика им је била да су садржавали воду. Овим установљеним апсорпционим тракама приписане су различите молекуларне конформације воде.

3.3. вис-НИР спектроскопија водених система

Даља истраживања, на растворима метала у врло малим концентрацијама (ppb ниво – *parts per billion*), показала су да вис-НИР спектрални модели развијени на основу снимљених спектара, показују разлике за растворе добијене на различити начин – односно, да начин растварања, да ли је то серијски или паралелно разблаживање (слике 1 и 2), има утицаја на спектрални модел. Сви ови резултати довели су до закључка да вис-НИР спектрални образац воде даје детаљну слику водене матрице и то како се она мења под утицајем осталих молекула у раствору (Слика 3).

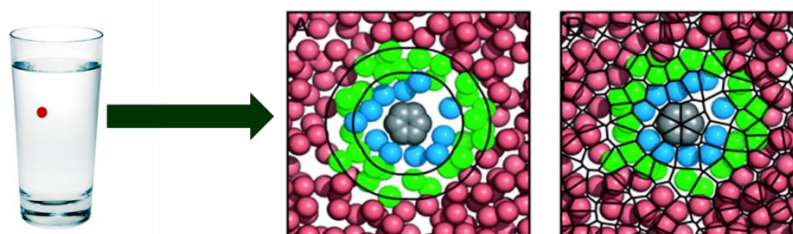


Слика 176. Поступак серијског разблаживања



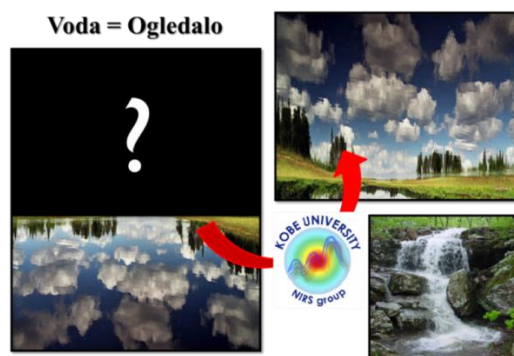
Слика 177. Поступак паралелног разблаживања

По први пут, вода се разматра као основни заједнички чинилац водених и биолошких система. Вода је природни заједнички чинилац целог биолошког живота.



Слика 178. Молекули воде се прилагођавају молекулима који се у њој налазе и заузимају одређене конфигурације које се могу открити преко вис-НИР спектра воденог раствора.

Зато се интеракција воде и светлости изражена у облику спектра може сматрати својеврсним молекуларним огледалом, где је вода огледало које рефлектује остале молекуле који се у њој налазе (Слика 4). Како би се систематизовало знање и прикупљене информације о интеракцији воде у воденим и биолошким системима, а коришћењем светлости, предложено је формирање нове научне дисциплине Аквафотомике [4].

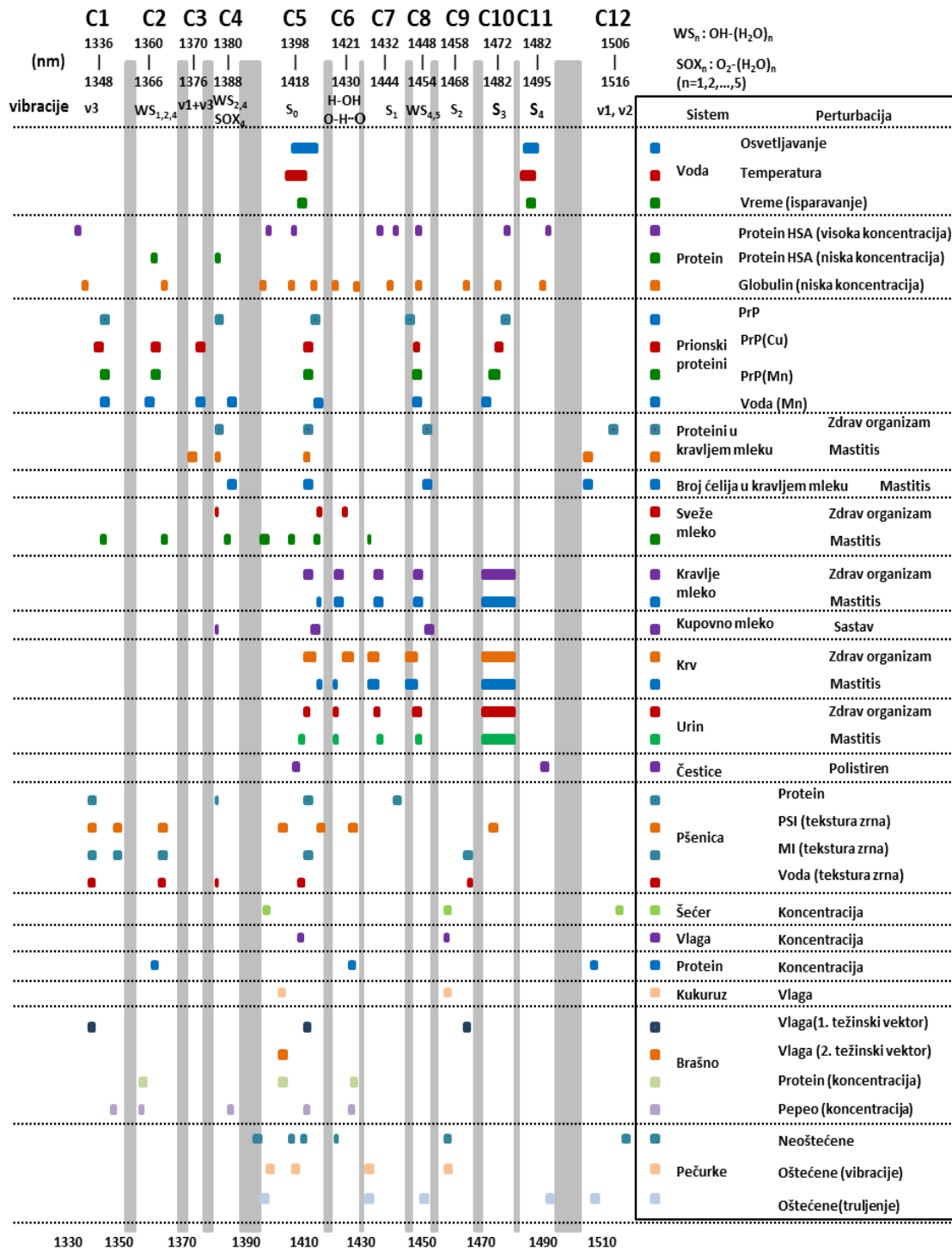


Слика 179. Вода као огледало – на молекуларном нивоу рефлектује шта се у њој налази

Увођење ове нове научне дисциплине, предложила је Роумиана Тсенкова вођа Лабораторије за биомерења Пољопривредног факултета, Кобе Универзитета у Јапану.

3.4. Координате водене мреже (WAMACS – Water Matrix Coordinates)

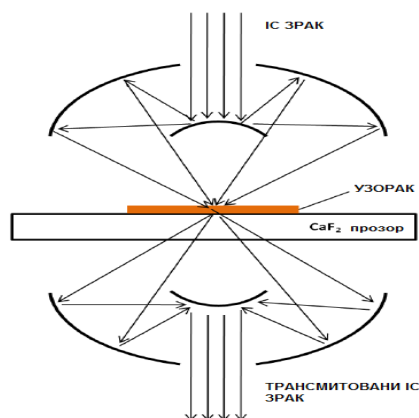
Табела 31. Координате водене мреже (WAMACS): карактеристичне апсорпционе траке воде које су се показале као најзначајније приликом испитивања воде при различитим пертурбацијама (концентрације, температура, осветљеност, болест, оштећења, димензије честица)[4]



3.5. Режији рада ФТИР спектрометра

3.5.1. Трансмисиони режим FTIR-а

Већина ИС микроскопа користи оптичку конфигурацију приказану на слици испод, Касегрејн (Cassegrain) објектив се фокусира на ИС светлост на узорку у корнету и на тај начин је преноси путем узорка. Узорак треба да буде подржан прозором који има 100% идеални пренос инфрацрвеног светла, материјал који се користи је калцијум флуорид (CaF_2) зато што има близу 100% пренос у $1000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ домета таласног броја. Испод узорка и прозора, преносива светлост је прикупљена од објектива "кондензатора", који је сличан cassegrain објективу, који скупља мембране налик преносивом зраку и фокусира зрак у тачку где се затим преноси на детектор кроз низ огледала.



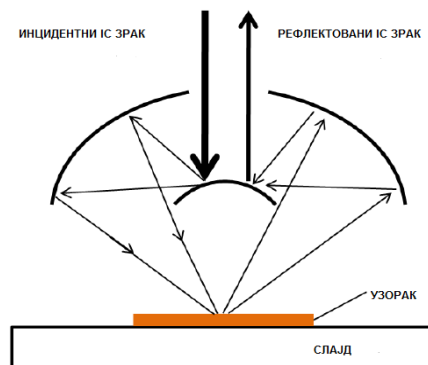
Слика 180. Шема преносног мода FTIR-а

Начин преноса FTIC ради добро за узорке који имају оптичку густину такву да вредности апсорбанце се налазе унутар Beer-Lambert режима (апсорпција између 0,1 и 1,2). Узорци који су дебели, и/или веома снажно апсорбовани могу довести до укупног нестанка ИС светла док пролази кроз сам узорак што значи да детектор неће рачунати довољно фотона да би дали значајан спектар. Узорци који су веома густе, и даље могу да се мере помоћу FTIC тако да рефлектују светлост са површине и посматрају сам одраз спектра.

3.5.2. Рефлексиони режим FTIR-а

Рефлексиони режим ИС спектроскопије укључује коришћење само једног Cassegrain-а, који се налази изнад узорка, где се половина објектива користи да фокусира светлост на површину узорка, а друга половина објектива прикупља рефлектовану светлост и прослеђује га на детектор (слика испод). Предност рефлексионог режима је да дебелина узорка (под претпоставком да хомогеност није проблем) је ирелевантна, што значи да се узорци дебелине неколико милиметара могу да се мере без проблема. Рефлексиони спектар може да се претвори у нарцисоидни спектар обављањем Kramers-Kronig

трансформације. Ограничење рефлексионог мода FTIC-a је да површина узорка треба да буде довољно полирана да би се могао довести јак сигнал, феномен одраза је сам по себи слаб са биолошким узорцима. Површине за рефлексију које се користе уместо дифузног модела дају резултат много већег сигналног шума од измереног спектра. Друге методе прикупљања рефлексије подразумевају коришћење омлитављеле укупне унутрашње рефлексије (ATR) спектроскопије у којој се кристал са високим индексом преламања (као што је дијамант) ставља у контакт са површином узорка. Упадни угао упадног светла је такав да изазива укупну-унутрашњу рефлексију. ATR инструментација је прилагођена да обавља врло високе просторне резолуције IC снимања.

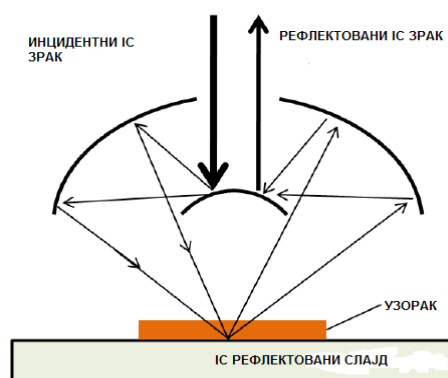


Слика 181. Шема рефлексионог мода FTIR-a

Дубина продирања светлости када се рефлектује од површине зависи од таласне дужине и од реда саме таласне дужине.

3.5.3. Трансфлексионни режим FTIR-a

Трансфлексионни режим IC спектроскопије, као што име сугерише је комбинација мерења преноса и режима рефлексије. Узорак се ставља на слајд који се одражава на инфрацрвено светло, у свим слајдовима радних MirrIC (Kevley Technologies, Chesterland, Ohio, USA) се користе због своје рефлексије на IC, али и због високог преноса видљиве светлости. Пренос на видљиву светлост омогућава видљивој микроскопији да се спроводе на узорку који помаже при локацији и позиционирању слајдова.



Слика 182. Шема трансфлексионог мода

Шема експеримента трансфлексионог режима, зрак се преноси кроз узорак, а затим се одбија од површине Mirr IC пре него што се преноси назад кроз узорак поново у колекцију оптике. Ово у суштини омогућава пренос спектра и могућност да се прикупљају у квази-рефлексионој геометрији, предности укључују дупли пролаз кроз узорак дајући апсорбацији јачи сигнал. Mirr IC слајдови се често првенствено бирају због преноса и због подлога пошто су знатно јефтиније за употребу, и да су физички мање крте значи да се припрема узорка изводи на доста лакши начин. Говорећи на оптички начин мање конфигурације су потребне него ли са објективом кондензатора испод узорка је потребан и Cassegrain објектив да дистрибуира и прикупља ИС светлост.

4. Обрада резултата мерења

4.1. Обрада НИР резултата за веће варирање концентрације глукозе

Табела 32. Разлике између референтних вредности глукозе и предвиђених вредности по моделу за НИР спектре водених раствора глукозе већих концентрација

Ред.број спектра	Измерено [mmol/l]	Предвиђено [mmol/l]	Грешка [mmol/l]
5mmol-1	5	3.209503	1.790497
5mmol-2	5	4.679855	0.320145
5mmol-3	5	3.323135	1.676865
5mmol-4	5	3.313171	1.686829
5mmol-5	5	2.449173	2.550827
7mmol-1	7	74.32058	-67.3206
7mmol-2	7	77.1071	-70.1071
7mmol-3	7	77.70554	-70.7055
7mmol-4	7	76.04382	-69.0438

7mmol-5	7	73.25603	-66.256
10mmol-1	10	-20.2091	30.20911
10mmol-2	10	-18.1371	28.1371
10mmol-3	10	-18.5654	28.56543
10mmol-4	10	-20.2352	30.23517
10mmol-5	10	-19.6373	29.63731
15mmol-1	15	-19.2588	34.2588
15mmol-2	15	-16.4888	31.4888
15mmol-3	15	-15.506	30.50597
15mmol-4	15	-11.7834	26.78337
15mmol-5	15	-13.1282	28.1282
18mmol-1	18	35.76885	-17.7688
18mmol-2	18	33.09943	-15.0994
18mmol-3	18	32.33009	-14.3301
18mmol-4	18	20.05922	-2.05922
18mmol-5	18	22.1479	-4.1479
20mmol-1	20	-31.1946	51.19464
20mmol-2	20	-31.7885	51.78853
20mmol-3	20	-32.2991	52.29909
20mmol-4	20	-32.7319	52.7319
20mmol-5	20	-33.5331	53.53307
25mmol-1	25	84.99815	-59.9981
25mmol-2	25	85.78762	-60.7876
25mmol-3	25	86.43369	-61.4337
25mmol-4	25	88.14756	-63.1476
25mmol-5	25	80.29447	-55.2945
50mmol-1	50	0.7061	49.2939
50mmol-2	50	-2.89471	52.89471
50mmol-3	50	-7.26363	57.26363
50mmol-4	50	-3.41214	53.41214
50mmol-5	50	-2.63055	52.63055
100mmol-1	100	144.0832	-44.0832
100mmol-2	100	147.7179	-47.7179
100mmol-3	100	148.6496	-48.6496
100mmol-4	100	146.1086	-46.1086
100mmol-5	100	144.5548	-44.5548
250mmol-1	250	228.399	21.60103
250mmol-2	250	227.2311	22.76886
250mmol-3	250	224.512	25.48798
250mmol-4	250	225.3664	24.63359
250mmol-5	250	224.689	25.31104

500mmol-1	500	536.9794	-36.9794
500mmol-2	500	537.4083	-37.4083
500mmol-3	500	537.5011	-37.5011
500mmol-4	500	538.8152	-38.8152
500mmol-5	500	543.4315	-43.4315
1000mmol-1	1000	960.7717	39.22827
1000mmol-2	1000	958.3174	41.68262
1000mmol-3	1000	960.0681	39.93195
1000mmol-4	1000	959.3364	40.66364
1000mmol-5	1000	960.6424	39.35761

4.2. Обрада ФТИР АТР резултата водених раствора глукозе

4.2.1. Референца - ваздух

Табела 33. Разлике између номиналних вредности глукозе и предвиђених вредности по моделу за ФТИР спектре водених раствора глукозе

Ред.број спектра	Номинална вредност [mmol/l]	Предвиђено [mmol/l]	Грешка [mmol/l]
1000g	1000	967.172668	32.827332
500g2	500	510.305176	-10.305176
500g1	500	516.503784	-16.503784
500g	500	497.923431	2.076569
250g2	250	270.750763	-20.750763
250g1	250	267.642578	-17.642578
250g	250	274.909302	-24.909302
100g3	100	110.47718	-10.47718
100g1	100	92.117142	7.882858
100g	100	107.02626	-7.02626
50g3	50	52.240234	-2.240234
50g1	50	43.86869	6.13131
50g	50	48.509163	1.490837
25g3	25	18.620056	6.379944
25g1	25	20.956535	4.043465
25g	25	13.280434	11.719566
20g3	20	25.572754	-5.572754
20g1	20	37.703201	-17.703201
20g	20	24.973	-4.973
18g4	18	19.74762	-1.74762
18g3	18	13.398483	4.601517
18g2	18	12.752853	5.247147

18g1	18	27.460396	-9.460396
18g	18	25.052498	-7.052498
15g4	15	12.418427	2.581573
15g3	15	14.891045	0.108955
15g2	15	8.028564	6.971436
15g1	15	15.619232	-0.619232
15g	15	2.41185	12.58815
10g5	10	12.558022	-2.558022
10g4	10	10.237411	-0.237411
10g3	10	2.019287	7.980713
10g2	10	9.882278	0.117722
10g1	10	17.715454	-7.715454
10g	10	6.018951	3.981049
7g3	7	-2.579544	9.579544
7g1	7	-4.27417	11.27417
7g	7	21.263123	-14.263123
5g2	5	-3.068466	8.068466
1000g2	1000	997.725891	2.274109
1000g1	1000	986.418213	13.581787
5g1	5	0.797516	4.202484
5g	5	-4.244461	9.244461

4.2.2. ФТИР спектроскопија: раствори глукозе – референца вода, концентрације од 4-30ммол/л

Табела 34. Разлике између измерених вредности глукозе и предвиђених вредности по моделу за ФТИР спектре водених раствора глукозе

Ред.број спектра	Измерена вредност [mmol/l]	Предвиђено [mmol/l]	Грешка [mmol/l]
1	4.2	9.292955	-5.09296
2	4.2	6.397807	-2.19781
3	4.2	9.196084	-4.99608
4	5.9	9.710875	-3.81088
5	5.9	9.261847	-3.36185
6	5.9	9.511418	-3.61142
7	9.7	10.91376	-1.21376
8	9.7	13.78762	-4.08762
9	9.7	11.73333	-2.03333
10	9	9.053535	-0.05354
11	9	11.14761	-2.14761
12	9	11.1712	-2.1712
13	11.5	13.41552	-1.91552

14	11.5	9.308521	2.191479
15	11.5	10.83847	0.661534
16	12.4	14.00861	-1.60861
17	12.4	10.70527	1.694729
18	12.4	10.03474	2.365257
19	15.6	11.46719	4.13281
20	15.6	16.50315	-0.90315
21	15.6	13.58408	2.015917
22	15.7	13.71649	1.983509
23	15.7	13.00036	2.699641
24	15.7	14.4387	1.2613
25	17.5	14.58135	2.918648
26	17.5	16.56353	0.93647
27	17.5	16.84301	0.656986
28	19.6	16.11696	3.483042
29	19.6	12.48801	7.111986
30	19.6	16.25816	3.341843
31	27.8	23.43055	4.369453
32	27.8	28.95584	-1.15584
33	27.8	21.21971	6.580294
34	30.6	36.06833	-5.46833
35	30.6	32.11138	-1.51138
36	30.6	35.11034	-4.51034
37	0	-5.57266	5.572655
38	0	2.415771	-2.41577

4.3. In vitro испитивања крви

4.3.1. Опто-магнетна имицинг спектроскопија – Брустеров угао 53°

Табела 35. Разлике између измерених вредности глукозе у крви стандардном методом и предвиђених вредности по моделу за опто-магнетне спектре узорак крви сниманих под Брустеровим углом од 53°

Узорак крви	Измерена вредност глукозе	Предвиђена вредност глукозе по моделу	Грешка
1	5.7	5.372157	0.327843
2	4.8	4.840228	-0.04023
3	4.8	5.021472	-0.22147
4	4.7	4.494647	0.205353
5	4.7	4.5102	0.1898
6	5.3	5.002712	0.297288
7	5.4	4.961509	0.438491

8	4.7	4.937483	-0.23748
9	4.5	4.260378	0.239622
10	4.9	5.095154	-0.19515
11	4.8	4.943601	-0.1436
12	5	5.407939	-0.40794
13	4.8	4.674129	0.125872
14	4.9	5.018757	-0.11876
15	4.8	4.836794	-0.03679
16	4.7	4.732225	-0.03223
17	5	4.656388	0.343612
18	4.7	4.855037	-0.15504
19	4.8	4.544932	0.255068

4.4. *In vivo* испитивања – апарат B53-2UV

4.4.1. Резултати за крвни суд – Брустеров угао 53°

Табела 36. Разлике између референтних вредности глукозе и предвиђених вредности по моделу за опто-магнетне спектре коже снимане под Брустеровим углом од 53°

Испитаник	Измерена концентрација глукозе у ммол/л	Предвиђена концентрација глукозе у ммол/л	Остатак у ммол/л
1	10.3	8.37941	1.92059
2	16.4	9.28515	7.11485
3	11.2	8.770002	2.429997
4	12.3	8.399318	3.900682
5	13.6	7.703223	5.896777
6	14.3	8.24291	6.05709
7	5.7	7.676355	-1.976356
8	4.8	8.424007	-3.624007
9	9.1	6.255969	2.844031
10	14	13.070087	0.929913
11	6.2	6.25168	-0.05168
12	5.4	7.424175	-2.024175
13	5.7	8.895668	-3.195668
14	6.2	6.605475	-0.405475
15	5.6	4.777758	0.822242
16	6.7	7.206609	-0.506609
17	5.5	4.992227	0.507773
18	5.7	5.062218	0.637782
19	4.8	7.16194	-2.36194

21	7.5	4.12626	3.37374
22	5.3	5.883167	-0.583167
23	4.8	6.662305	-1.862305
24	4.9	6.729823	-1.829823
25	5.8	9.518622	-3.718622
27	6.2	9.655825	-3.455825
28	5	7.139122	-2.139122
29	5.7	6.091164	-0.391164
30	5.2	7.858124	-2.658124
31	4.9	7.145775	-2.245775
32	7.7	7.890475	-0.190475
33	5.2	5.891135	-0.691135
34	6.5	9.457227	-2.957227
35	6.9	9.235727	-2.335727
36	5.7	7.832003	-2.132003
37	5.3	7.732372	-2.432372
38	9.9	7.922557	1.977443
39	6.5	7.393404	-0.893404
41	4.9	7.388641	-2.488641
42	5.4	8.229378	-2.829378
43	6.9	1.75805	5.14195
44	13.4	7.403748	5.996252
45	13.2	8.33383	4.86617
46	10.5	5.148446	5.351554
47	8.5	9.050411	-0.550411
48	10.5	9.803942	0.696058
49	9.6	9.797715	-0.197715
50	18.6	9.628219	8.971782
51	5.3	8.45903	-3.15903
52	13.6	8.318854	5.281146
53	5.1	8.336447	-3.236447
54	6.7	9.115664	-2.415665
55	5.2	7.845237	-2.645237
56	6.4	9.12794	-2.72794
57	6.2	8.801877	-2.601877
58	4.8	8.667311	-3.867311
59	7	7.717473	-0.717473

4.4.2. Резултати за крвни суд и кожу – UV1

Табела 37. Разлике између референтних вредности глукозе и предвиђених вредности по моделу за опто-магнетне спектре коже и крвног суда снимане под UV1 осветљењем

Испитаник	Измерена концентрација глукозе у ммол/л	Предвиђена концентрација глукозе у ммол/л	Остатак у ммол/л
1	10.3	7.636033	2.663967
2	16.4	6.824498	9.575501
3	5.7	9.277219	-3.57722
4	4.8	7.338756	-2.53876
5	9.1	9.607995	-0.508
6	14	8.904013	5.095987
7	6.2	8.2628	-2.0628
8	5.4	8.469453	-3.06945
9	5.7	9.273516	-3.57352
10	6.2	6.497223	-0.29722
11	5.6	6.105923	-0.50592
12	6.7	7.196144	-0.49614
13	5.5	7.140711	-1.64071
14	5.7	5.852952	-0.15295
15	4.8	6.145937	-1.34594
16	7.5	7.388546	0.111454
17	7.5	7.208946	0.291054
18	5.3	5.427357	-0.12736
19	4.8	8.328603	-3.5286
20	4.9	8.961079	-4.06108
21	5.8	5.994002	-0.194
22	6	5.210711	0.789289
23	6.2	8.31299	-2.11299
24	5	10.19484	-5.19484
25	5.7	7.413485	-1.71349
26	5.2	6.681559	-1.48156
27	4.9	6.884348	-1.98435
28	7.7	9.640462	-1.94046
29	5.2	10.01043	-4.81043
30	6.5	8.964382	-2.46438
31	6.9	8.832352	-1.93235
32	5.7	4.921048	0.778952
33	5.3	6.966791	-1.66679
34	9.9	6.904411	2.995588
35	6.5	8.718432	-2.21843
36	7.6	9.192173	-1.59217

37	4.9	6.892982	-1.99298
38	5.4	9.593279	-4.19328
39	6.9	6.304325	0.595675
40	11.2	9.10564	2.094359
41	12.3	9.243426	3.056574
42	13.6	8.534776	5.065225
43	14.3	9.383485	4.916515
44	13.4	7.639443	5.760556
45	13.2	8.549392	4.650608
46	10.5	6.998736	3.501264
47	8.5	8.190884	0.309116
48	10.5	9.178375	1.321625
49	9.6	7.188003	2.411997
50	18.6	7.670169	10.92983
51	5.3	8.191576	-2.89158
52	13.6	9.494287	4.105713
53	5.1	7.730289	-2.63029
54	6.7	6.399188	0.300812
55	5.2	8.718532	-3.51853
56	6.4	8.021479	-1.62148
57	6.2	10.2126	-4.0126
58	4.8	8.592888	-3.79289
59	7	7.390532	-0.39053
60	18.5	8.938422	9.561578

4.4.3. Резултати за крвни суд и кожу – UV2

Табела 38. Разлике између референтних вредности глукозе и предвиђених вредности по моделу за опто-магнетне спектре коже и крвног суда снимане под UV2 осветљењем

Испитан ик	Измерена концентрација глукозе у ммол/л	Предвиђена концентрација глукозе у ммол/л	Остатак у ммол/л
1	10.3	7.56054	2.73946
2	16.4	7.127143	9.272856
3	5.7	11.36424	-5.66424
4	4.8	6.45793	-1.65793
5	9.1	9.28171	-0.18171
6	14	9.32788	4.67212
7	6.2	7.523346	-1.32335
8	5.4	5.670509	-0.27051
9	5.7	7.059343	-1.35934
10	6.2	9.435703	-3.2357

11	5.6	10.08938	-4.48938
12	6.7	10.75891	-4.05891
13	5.5	6.856062	-1.35606
14	5.7	9.135416	-3.43542
15	4.8	6.001653	-1.20165
16	7.5	7.880685	-0.38069
17	7.5	5.537964	1.962036
18	5.3	6.206404	-0.9064
19	4.8	6.014641	-1.21464
20	4.9	5.883864	-0.98386
21	5.8	7.785873	-1.98587
22	6	10.04217	-4.04217
23	6.2	8.478294	-2.2783
24	5	6.836624	-1.83662
25	5.7	7.364892	-1.66489
26	5.2	8.199912	-2.99991
27	4.9	6.333136	-1.43314
28	7.7	10.16972	-2.46972
29	5.2	7.531718	-2.33172
30	6.5	8.513331	-2.01333
31	6.9	8.751652	-1.85165
32	5.7	7.838136	-2.13814
33	5.3	4.706481	0.593519
34	9.9	8.961174	0.938826
35	6.5	6.828764	-0.32876
36	7.6	9.30286	-1.70286
37	4.9	6.45863	-1.55863
38	5.4	8.646701	-3.2467
39	6.9	8.798302	-1.8983
40	11.2	7.340325	3.859674
41	12.3	6.04416	6.25584
42	13.6	10.34311	3.256887
43	14.3	8.762879	5.537121
44	13.4	8.002937	5.397062
45	13.2	6.641079	6.55892
46	10.5	9.347405	1.152595
47	8.5	5.907543	2.592457
48	10.5	9.77894	0.72106
49	9.6	7.930491	1.669509
50	18.6	9.524928	9.075072
51	5.3	6.18293	-0.88293

52	13.6	8.687381	4.91262
53	5.1	7.5405	-2.4405
54	6.7	12.42367	-5.72367
55	5.2	5.811728	-0.61173
56	6.4	7.207016	-0.80702
57	6.2	7.154094	-0.95409
58	4.8	7.188473	-2.38847
59	7	10.91043	-3.91043
60	18.5	7.497369	11.00263

4.5. *In vivo* испитивања – апарат В60

4.5.1. Резултати обраде за спектре коже

Табела 39. Разлике између референтних вредности глукозе и предвиђених вредности по моделу за опто-магнетне спектре коже снимане под Брустеровим углом од 60°

Испитан ик	Измерена концентрација глукозе у ммол/л	Предвиђена концентрација глукозе у ммол/л	Остатак у ммол/л
1	11.8	8.142283	3.657717
2	13.3	7.787779	5.512221
3	12.2	6.955415	5.244585
4	11.4	8.896755	2.503244
5	10.8	10.12492	0.675082
6	12	8.519083	3.480917
7	12	8.069807	3.930193
8	8.4	6.615818	1.784182
9	8.6	8.603727	-0.00373
10	5.1	8.068995	-2.969
11	10.5	8.11552	2.38448
12	15.4	7.02945	8.370549
13	8.1	9.235679	-1.13568
14	5.4	7.787942	-2.38794
15	7	7.38051	-0.38051
16	10.3	8.672009	1.627991
17	13.9	7.242473	6.657527
18	6	6.093416	-0.09342
19	13	7.885182	5.114818
20	5.3	7.202667	-1.90267
21	4.9	7.112525	-2.21253
22	5	6.116895	-1.1169
23	4.9	6.902814	-2.00281

24	4.9	8.38789	-3.48789
25	5.2	8.170211	-2.97021
26	4.9	8.46287	-3.56287
27	4.3	7.93444	-3.63444
28	4.7	7.846097	-3.1461
29	4	7.585214	-3.58521
30	4.6	8.397404	-3.7974
31	4.5	5.598022	-1.09802
32	4.9	6.451914	-1.55191
33	4.7	8.753467	-4.05347
34	5	8.966455	-3.96646
35	4.2	7.616242	-3.41624
36	13.3	7.334896	5.965105
37	9.3	7.865052	1.434948
38	6.7	12.47748	-5.77748
39	18.9	8.555995	10.34401
40	5.3	9.839306	-4.53931
41	4.7	9.642006	-4.94201
42	8.8	7.404801	1.395199
43	7.5	7.858418	-0.35842
45	5.9	8.278384	-2.37838
46	15.6	5.428783	10.17122
47	5.8	7.425801	-1.6258
48	5.5	7.542809	-2.04281
49	5.9	8.173324	-2.27332
50	13	8.893128	4.106872
51	10.4	9.725847	0.674152
52	12.5	7.350292	5.149708
53	8.3	7.433705	0.866295
54	7	7.460282	-0.46028
55	4.9	7.503853	-2.60385
56	9.9	7.401456	2.498543
57	6.4	7.472653	-1.07265
58	6.5	7.470587	-0.97059
59	5.3	7.495496	-2.1955
60	5.5	7.491328	-1.99133
61	7.7	7.445932	0.254068
62	8.7	7.425593	1.274406
63	15.8	7.287967	8.512033
64	6.9	7.462339	-0.56234
65	6.8	7.464399	-0.6644

67	5.3	9.410723	-4.11072
68	5.4	8.43161	-3.03161
69	4.7	10.05091	-5.35091
70	5.8	7.922381	-2.12238
72	6.5	8.533449	-2.03345
73	5.5	8.77397	-3.27397
74	5.3	9.374278	-4.07428
75	5.2	6.623892	-1.42389
76	6.2	5.592058	0.607942
77	6.3	5.865076	0.434924
78	4.7	8.285421	-3.58542
79	5	7.308428	-2.30843
80	5	7.494199	-2.4942
81	5.2	7.500185	-2.30019
82	4.7	7.017198	-2.3172
83	5.3	8.081116	-2.78112
84	6.2	6.965282	-0.76528
85	5.3	7.704197	-2.4042
86	5.7	7.285796	-1.5858
87	4.8	6.968391	-2.16839
88	9.1	6.773843	2.326157
89	14	6.268842	7.731158
90	6.2	7.359674	-1.15968
91	5.4	6.028305	-0.6283
92	5.7	6.786088	-1.08609
93	6.2	6.793103	-0.5931
94	5.6	6.541459	-0.94146
95	6.7	6.907344	-0.20735
96	5.5	7.300385	-1.80039
97	5.7	6.790024	-1.09002
98	4.8	7.320321	-2.52032
99	7.5	6.859023	0.640977
100	7.5	8.008745	-0.50875
101	5.3	8.528303	-3.2283
102	4.8	6.545575	-1.74557
103	4.9	8.137778	-3.23778
105	6	8.296906	-2.29691
106	6.2	7.423191	-1.22319
107	5	7.208356	-2.20836
108	5.7	8.183921	-2.48392
110	4.9	6.022029	-1.12203

111	7.7	7.417852	0.282147
112	5.2	7.24548	-2.04548
115	5.7	7.707354	-2.00735
118	6.5	6.931314	-0.43131
119	7.6	6.394781	1.205219
120	4.9	7.921421	-3.02142
122	6.9	7.115199	-0.2152
123	6.7	6.152332	0.547668
126	12.2	7.870761	4.329239
128	8.8	9.178178	-0.37818
129	5.2	10.73971	-5.53971
131	8.7	9.24934	-0.54934
134	7.6	6.489521	1.110479
135	8.9	7.899372	1.000628
136	15.7	7.476187	8.223813
137	22.6	8.405915	14.19409
138	10.3	8.461304	1.838696
139	10.3	8.302376	1.997624
141	5.5	7.564022	-2.06402
143	4.2	9.800266	-5.60027
144	7.5	7.520114	-0.02011
145	6.1	7.560661	-1.46066
146	11.6	8.603199	2.996801
147	12.4	8.261403	4.138597
151	7.3	7.261738	0.038262
152	18.5	7.007519	11.49248
153	13	8.351208	4.648792
155	13.2	8.53445	4.66555
156	13	8.192566	4.807434
157	5	7.304002	-2.304
158	14	7.544358	6.455642
159	12.8	8.372251	4.42775
160	9.3	9.092453	0.207547
161	7.8	7.091249	0.708751
162	6.3	7.823015	-1.52302
163	5.5	8.09172	-2.59172
164	6.3	8.816414	-2.51641
165	16.6	7.372321	9.227679
166	9.6	6.604876	2.995125
167	11.8	8.504034	3.295966
168	15.7	8.719056	6.980944

169	15.9	8.410307	7.489693
170	5.9	5.615565	0.284435
171	11.5	8.46823	3.03177
174	8.7	6.946949	1.75305
176	5.9	7.863713	-1.96371
177	4.2	8.08847	-3.88847
178	8.9	7.368416	1.531584
180	7.7	8.526984	-0.82698
181	5.4	7.245416	-1.84542
183	9.5	8.41678	1.08322
184	11.6	8.214437	3.385564
185	5.7	7.881325	-2.18133
186	6.4	9.342634	-2.94263
188	6.9	8.811744	-1.91174
189	6.3	7.910754	-1.61075
190	6.2	7.833607	-1.63361
191	6.1	8.137793	-2.03779
192	4.7	9.177977	-4.47798
193	11.3	8.187055	3.112946
194	6	6.710186	-0.71019
195	5	7.894081	-2.89408
196	15.1	8.97185	6.12815
197	5	9.066582	-4.06658
198	6.5	7.449147	-0.94915
200	6.5	7.165027	-0.66503
201	9.5	9.026125	0.473875
202	4.2	8.110061	-3.91006
203	5.5	8.492254	-2.99225
204	6.4	9.050976	-2.65098
205	6.1	8.238197	-2.1382
206	12.9	8.793874	4.106126
207	5.3	7.983306	-2.68331
208	6	8.694267	-2.69427
209	4.7	8.696596	-3.9966
210	10.5	6.660103	3.839897
211	8	8.250828	-0.25083
212	5.6	6.931599	-1.3316
213	5.8	9.460935	-3.66093

4.5.2. Резултати обраде за слике коже и крвног суда

Табела 40. Разлике између измерене вредности концентрације глукозе и вредности концентрације предвиђене моделом за опто-магнетне спектре коже и крвног суда сниманих под Брустеровим углом од 60°. У табели се не налазе вредности за оне испитанике који су процењени као оутлајери, и који су избачени из анализе

Испитаник	Измерена концентрација глукозе у ммол/л	Предвиђена концентрација глукозе у ммол/л	Остатак у ммол/л
2	13.3	4.270339	9.029661
3	12.2	3.148785	9.051215
4	11.4	7.68253	3.717469
7	12	1.5757	10.4243
8	8.4	4.259151	4.140849
10	5.1	-1.72958	6.829576
12	15.4	1.859018	13.54098
13	8.1	11.72832	-3.62832
14	5.4	3.064329	2.335671
15	7	6.195257	0.804743
16	10.3	6.641828	3.658172
17	13.9	3.047421	10.85258
19	13	4.770589	8.229411
23	4.9	-3.38786	8.287856
25	5.2	-6.23369	11.43369
26	4.9	16.15986	-11.2599
30	4.6	8.879828	-4.27983
31	4.5	1.83218	2.66782
33	4.7	11.12112	-6.42112
34	5	1.648346	3.351654
35	4.2	5.620778	-1.42078
36	13.3	-0.81314	14.11314
40	5.3	8.021078	-2.72108
42	8.8	5.952535	2.847465
43	7.5	10.47613	-2.97613
45	5.9	12.14286	-6.24286
46	15.6	6.865799	8.734201
47	5.8	6.782511	-0.98251
48	5.5	4.34023	1.15977
49	5.9	8.703921	-2.80392
51	10.4	3.626927	6.773073
53	8.3	-6.79116	15.09116
54	7	2.21726	4.78274
55	4.9	5.629857	-0.72986
56	9.9	5.019504	4.880496

57	6.4	9.177672	-2.77767
58	6.5	2.938102	3.561898
59	5.3	4.584518	0.715482
60	5.5	8.435322	-2.93532
61	7.7	10.94341	-3.24341
62	8.7	7.932825	0.767175
63	15.8	6.319107	9.480894
64	6.9	1.842776	5.057224
65	6.8	10.80278	-4.00278
66	5.7	-7.1456	12.8456
67	5.3	10.40804	-5.10804
68	5.4	4.871236	0.528764
69	4.7	10.8369	-6.1369
70	5.8	2.646418	3.153582
72	6.5	2.296332	4.203669
73	5.5	-2.26594	7.765937
75	5.2	-1.97524	7.175238
76	6.2	-7.89888	14.09888
77	6.3	1.27435	5.025651
79	5	-3.42596	8.425963
80	5	-4.93389	9.933892
82	4.7	1.131491	3.568509
83	5.3	-7.35699	12.65699
84	6.2	-0.37314	6.573142
85	5.3	1.994294	3.305707
86	5.7	4.736275	0.963725
87	4.8	-1.10554	5.905538
90	6.2	-2.95377	9.153765
91	5.4	-3.0388	8.438799
92	5.7	-0.81684	6.516841
93	6.2	9.287184	-3.08718
94	5.6	1.166429	4.433571
96	5.5	-1.70751	7.207509
97	5.7	2.657034	3.042966
98	4.8	-1.41548	6.215475
99	7.5	-2.40736	9.907361
103	4.9	3.233985	1.666015
104	5.8	-5.09804	10.89804
106	6.2	1.060405	5.139595
107	5	-1.62452	6.624518
108	5.7	-6.88361	12.58361

109	5.2	-4.48864	9.688639
110	4.9	-1.74712	6.647117
111	7.7	2.103272	5.596728
114	6.9	-3.51743	10.41743
115	5.7	-6.52081	12.22081
116	5.3	-1.45917	6.759169
118	6.5	-1.66904	8.169038
119	7.6	-6.08068	13.68068
120	4.9	2.799721	2.100279
121	5.4	3.524574	1.875426
122	6.9	0.498465	6.401535
124	12.7	2.970418	9.729582
125	11.8	5.728376	6.071624
126	12.2	5.450469	6.749531
127	9	7.45681	1.54319
128	8.8	3.569619	5.230381
129	5.2	8.434336	-3.23434
131	8.7	4.979725	3.720275
132	6.8	4.789803	2.010198
133	16.4	7.462984	8.937016
135	8.9	1.334294	7.565705
138	10.3	0.755617	9.544383
139	10.3	0.116781	10.18322
140	5.7	10.41292	-4.71292
141	5.5	5.673945	-0.17395
143	4.2	2.767315	1.432685
145	6.1	3.145175	2.954824
146	11.6	9.81858	1.781421
147	12.4	0.027609	12.37239
149	8	4.02923	3.97077
150	13.5	5.816921	7.683079
151	7.3	3.342795	3.957205
153	13	-0.30041	13.30041
154	8	-1.19776	9.197762
155	13.2	1.33515	11.86485
156	13	2.016494	10.98351
157	5	3.034596	1.965404
158	14	5.61311	8.38689
159	12.8	7.210057	5.589943
160	9.3	5.425469	3.874531
161	7.8	-2.19186	9.991857

162	6.3	4.769243	1.530757
163	5.5	7.288028	-1.78803
164	6.3	0.845179	5.454821
165	16.6	5.979293	10.62071
166	9.6	5.347791	4.25221
167	11.8	3.828416	7.971584
168	15.7	3.872477	11.82752
169	15.9	1.274322	14.62568
170	5.9	-3.10059	9.000589
171	11.5	3.284802	8.215199
172	16.4	5.064853	11.33515
173	9.6	4.572748	5.027253
174	8.7	-1.29471	9.994713
175	4.6	1.037167	3.562833
176	5.9	0.995507	4.904493
177	4.2	3.275864	0.924136
178	8.9	1.005199	7.8948
179	15.4	1.612659	13.78734
180	7.7	5.272504	2.427495
181	5.4	4.986707	0.413293
182	5.2	-2.76459	7.96459
183	9.5	3.781373	5.718627
184	11.6	2.464331	9.13567
185	5.7	3.08051	2.61949
186	6.4	3.502635	2.897365
189	6.3	2.407659	3.892342
190	6.2	4.791355	1.408645
191	6.1	9.298287	-3.19829
192	4.7	6.689458	-1.98946
193	11.3	6.500632	4.799368
195	5	-5.60135	10.60135
196	15.1	4.344277	10.75572
198	6.5	0.452755	6.047245
199	12.2	2.366739	9.833261
200	6.5	-1.90553	8.405529
201	9.5	2.871751	6.628249
202	4.2	3.532812	0.667187
203	5.5	5.244525	0.255475
204	6.4	4.432674	1.967326
205	6.1	4.273649	1.826351
206	12.9	6.913264	5.986736

207	5.3	3.001051	2.298949
208	6	-0.12468	6.124674
209	4.7	-1.45054	6.150536
210	10.5	-1.76311	12.26311
211	8	10.2605	-2.2605
212	5.6	-4.0757	9.675697

4.5.3. Резултати обраде за спектре крвног суда

Табела 41. Разлике између измерене вредности концентрације глукозе и вредности концентрације предвиђене моделом за опто-магнетне спектре крвног суда сниманих под Брустеровим углом од 60°.

Испитаник	Измерена концентрација глукозе у ммол/л	Предвиђена концентрација глукозе у ммол/л	Остатак у ммол/л
1	11.8	9.238221	2.561779
2	13.3	8.002913	5.297087
3	12.2	7.636811	4.563189
4	11.4	9.23583	2.164169
5	10.8	11.02368	-0.22368
6	12	8.853229	3.146771
7	12	8.9501	3.0499
8	8.4	6.329357	2.070643
9	8.6	12.30854	-3.70854
10	5.1	8.482827	-3.38283
11	10.5	7.915371	2.584629
12	15.4	9.009581	6.390419
13	8.1	8.123241	-0.02324
14	5.4	9.058772	-3.65877
15	7	8.562916	-1.56292
16	10.3	8.538454	1.761546
17	13.9	7.854109	6.045891
18	6	8.043962	-2.04396
19	13	7.533074	5.466926
20	5.3	10.15734	-4.85734
21	4.9	8.588933	-3.68893
22	5	8.696081	-3.69608
23	4.9	8.381728	-3.48173
24	4.9	9.38029	-4.48029
25	5.2	9.172329	-3.97233
26	4.9	6.134353	-1.23435
27	4.3	4.702934	-0.40293
28	4.7	8.819848	-4.11985

29	4	7.776483	-3.77648
30	4.6	8.098617	-3.49862
31	4.5	7.683574	-3.18357
32	4.9	5.189476	-0.28948
33	4.7	9.744151	-5.04415
34	5	9.031195	-4.0312
35	4.2	7.646001	-3.446
36	13.3	7.406362	5.893638
37	9.3	9.194753	0.105247
38	6.7	7.77921	-1.07921
39	18.9	7.519292	11.38071
40	5.3	9.290773	-3.99077
41	4.7	8.953855	-4.25386
42	8.8	8.128212	0.671788
43	7.5	8.428935	-0.92894
45	5.9	7.345987	-1.44599
46	15.6	7.720129	7.879872
47	5.8	7.752394	-1.95239
48	5.5	7.447745	-1.94775
49	5.9	7.544158	-1.64416
50	13	7.484126	5.515874
51	10.4	7.262954	3.137045
52	12.5	8.765354	3.734646
53	8.3	9.01413	-0.71413
54	7	9.316397	-2.3164
55	4.9	8.610366	-3.71037
56	9.9	8.623756	1.276243
57	6.4	7.660093	-1.26009
58	6.5	7.346642	-0.84664
59	5.3	8.536355	-3.23636
60	5.5	7.143187	-1.64319
61	7.7	7.576016	0.123983
62	8.7	8.770948	-0.07095
63	15.8	7.896981	7.903019
64	6.9	7.53267	-0.63267
65	6.8	6.905492	-0.10549
66	5.7	7.428792	-1.72879
67	5.3	7.968412	-2.66841
68	5.4	7.971453	-2.57145
69	4.7	7.832771	-3.13277
70	5.8	7.853986	-2.05399

71	6.5	8.803754	-2.30375
72	6.5	7.775324	-1.27532
73	5.5	6.789889	-1.28989
74	5.3	5.904174	-0.60417
75	5.2	8.408756	-3.20876
76	6.2	8.173538	-1.97354
77	6.3	6.81998	-0.51998
78	4.7	8.532229	-3.83223
79	5	6.442518	-1.44252
80	5	8.428156	-3.42816
81	5.2	6.821047	-1.62105
82	4.7	7.061944	-2.36194
83	5.3	9.044724	-3.74472
84	6.2	7.101803	-0.9018
85	5.3	8.922496	-3.6225
86	5.7	7.28153	-1.58153
87	4.8	7.555495	-2.7555
88	9.1	7.176188	1.923813
89	14	8.602352	5.397648
90	6.2	8.963142	-2.76314
91	5.4	7.059238	-1.65924
92	5.7	7.236368	-1.53637
93	6.2	7.990745	-1.79075
94	5.6	6.587653	-0.98765
95	6.7	7.076149	-0.37615
96	5.5	7.198877	-1.69888
97	5.7	7.137122	-1.43712
98	4.8	8.082788	-3.28279
99	7.5	7.807056	-0.30706
100	7.5	7.695458	-0.19546
101	5.3	6.79211	-1.49211
102	4.8	7.81376	-3.01376
103	4.9	6.821451	-1.92145
104	5.8	7.628294	-1.82829
105	6	6.889413	-0.88941
106	6.2	7.077787	-0.87779
107	5	7.701219	-2.70122
108	5.7	8.169772	-2.46977
109	5.2	7.418319	-2.21832
110	4.9	8.06671	-3.16671
111	7.7	8.377337	-0.67734

112	5.2	8.119275	-2.91928
113	6.5	6.09	0.41
114	6.9	6.725377	0.174623
115	5.7	7.989469	-2.28947
116	5.3	7.153333	-1.85333
117	9.9	7.809742	2.090258
118	6.5	8.121602	-1.6216
119	7.6	8.782307	-1.18231
120	4.9	7.92463	-3.02463
121	5.4	6.929332	-1.52933
122	6.9	7.883177	-0.98318
123	6.7	6.320061	0.379939
124	12.7	8.048571	4.651429
125	11.8	9.127312	2.672688
126	12.2	8.073313	4.126687
127	9	7.917193	1.082807
128	8.8	7.977026	0.822974
129	5.2	8.001122	-2.80112
130	10.7	10.30461	0.395392
131	8.7	7.978963	0.721037
132	6.8	7.725768	-0.92577
133	16.4	8.150614	8.249386
134	7.6	10.3745	-2.7745
135	8.9	7.282507	1.617493
136	15.7	8.650933	7.049067
137	22.6	7.743638	14.85636
138	10.3	6.896804	3.403196
139	10.3	5.815631	4.484369
140	5.7	8.835154	-3.13515
141	5.5	6.983699	-1.4837
142	5.3	8.463558	-3.16356
143	4.2	9.138298	-4.9383
144	7.5	7.580081	-0.08008
145	6.1	7.542091	-1.44209
146	11.6	7.497386	4.102614
147	12.4	7.258227	5.141772
148	6.8	9.261221	-2.46122
149	8	8.875128	-0.87513
150	13.5	8.09882	5.40118
151	7.3	7.905639	-0.60564
152	18.5	7.530602	10.9694

153	13	7.904826	5.095174
154	8	7.26032	0.73968
155	13.2	7.807618	5.392382
156	13	9.274448	3.725552
157	5	7.990896	-2.9909
158	14	6.28671	7.71329
159	12.8	8.146033	4.653967
160	9.3	8.900416	0.399584
161	7.8	8.856502	-1.0565
162	6.3	8.255373	-1.95537
163	5.5	7.095279	-1.59528
164	6.3	8.912971	-2.61297
165	16.6	7.111571	9.488429
166	9.6	5.855615	3.744385
167	11.8	8.439441	3.360559
168	15.7	9.261043	6.438957
169	15.9	7.552524	8.347476
170	5.9	7.003825	-1.10383
171	11.5	8.041221	3.458779
172	16.4	8.795742	7.604258
173	9.6	7.289233	2.310767
174	8.7	7.876116	0.823884
175	4.6	6.030914	-1.43091
176	5.9	8.68821	-2.78821
177	4.2	7.569086	-3.36909
178	8.9	6.826651	2.073349
179	15.4	7.574814	7.825185
180	7.7	7.372108	0.327892
181	5.4	7.007813	-1.60781
182	5.2	9.21915	-4.01915
183	9.5	7.832648	1.667352
184	11.6	8.578502	3.021499
185	5.7	8.198325	-2.49833
186	6.4	7.713755	-1.31376
187	6	7.484838	-1.48484
188	6.9	6.288668	0.611332
189	6.3	7.592143	-1.29214
190	6.2	7.880086	-1.68009
191	6.1	7.485764	-1.38576
192	4.7	7.889108	-3.18911
193	11.3	8.709857	2.590143

194	6	8.518374	-2.51837
195	5	9.325871	-4.32587
196	15.1	7.539276	7.560724
197	5	7.498755	-2.49876
198	6.5	8.035048	-1.53505
199	12.2	8.531517	3.668483
200	6.5	7.248831	-0.74883
201	9.5	8.631111	0.868889
202	4.2	7.968173	-3.76817
203	5.5	8.191536	-2.69154
204	6.4	9.450562	-3.05056
205	6.1	8.763205	-2.66321
206	12.9	8.165427	4.734572
207	5.3	7.678729	-2.37873
208	6	8.37349	-2.37349
209	4.7	7.97206	-3.27206
210	10.5	7.230324	3.269676
211	8	8.888147	-0.88815
212	5.6	7.473391	-1.87339
213	5.8	6.429211	-0.62921

Прилог 2

Табеларни преглед пријављених патената у последњих 10 година у области неинвазивног мерења концентрације глукозе у крви

Табела 1. Пријављени патенти у области неинвазивног мерења концентрације глукозе у последњој деценији

No.	Patent No.	Name	Method	Description	Publication Date
1	US 2004/0162470 A1	Non - invasive blood glucose monitor	IR	A micro-optical-mechanical-electro-system (MOMES) comprises a micromachined infrared spectrometer array, a micromachined infrared mechanical modulator array, at least one micromachined infrared tunable filter, and at least one infrared detector. The aligned mechanical modulator turns the monochromatic infrared light into an alternating monochromatic infrared light. The tunable filter selects the back-diffused alternating monochromatic infrared light emitted from a measured blood subject that is illuminated by the alternating monochromatic infrared light. The infrared detector converts the backdiffused alternating monochromatic infrared light into an alternating electronic signal.	19.08. 2004
2	US 2005/0010090 A1	Compact apparatus for noninvasive measurment of glucose through near -infrared spectroscopy	NIR	The preferred apparatus is a spectrometer based system that is attached continuously or semi-continuously to a human subject and collects spectral measurements that are used to determine a biological parameter in the sampled tissue. The preferred analyzer is a near-IR based glucose analyzer.	13.01. 2005

3	US 2006/0092418A1	Optical detection method for separating surface and deepnes	VIS	This invention relates to an optical detection method. A light beam that irradiates on the object from an incident unit is received by a receiving unit and detected by a detector. The separation of the surface and deep information of the medium can be achieved by a measuring system. The incident unit and receiving unit can be configured according to polarization method, optical baffle method, space imaging method and Brewster angle method etc.	04.05. 2006
4	US 2004/0106163 A1	Non invasive measurment of analytes	VIS, Fluorescence	This invention provides materials, apparatus, and methods for several non-invasive techniques for the determination of in vivo blood glucose concentration levels based upon the in vivo measurement of one or more analytes or parameters found in skin.	03.06. 2004
5	US 2005/0124869 A1	Non-invasive, in vivo substance measurment systems	Photoacoustic spectroscopy, MIR	This system comprises a quantum cascade lasers are high power semiconductor lasers which are tiny in size and highly tunable with respect to wavelength. Systems may be formed of a plurality of quantum cascade laser in an optical source, mechanism to couple light into tissue, an acoustic detector and a signal processor.	09.06. 2005
6	US 2006/0063993 A1	Method and apparatus for non-invasive measurment of blood analytes	Raman spectroscopy	This invention discloses a method and apparatus and method for achieving non-invasive measurement ol analytes from human and animal blood through the skin using Raman lightwave technology.	23.03. 2006
7	US 2006/0195023 A1	Compact apparatus for noninvasive measurment of glucose through near -infrared spectroscopy	NIR	The preferred apparatus is a spectrometer based system that is attached continuously or semi-continuously to a human subject and collects spectral measurements that are used to determine a biological parameter in the sampled tissue. The preferred analyzer is a near-IR based glucose analyzer.	31.08. 2006

8	US 2007/0255141 A1	Noninvasive glucose sensing methods and systems	UV	This methods and systems for noninvasive glucose monitoring and sensing with electromagnetic waves or ultrasound are disclosed.The methods are based on absolute or relative measurement of tissue dimensions including, but not limited to: thickness, length, width, diameter, curvature, roughness as well as time of flight of ultrasound and optical pulses and optical thickness, which change with changing blood glucose concentrations.	01.11.2007
9	US 2008/0269580 A1	System for non-invasive measurment of blood glucose concentration	Thermal emission spectroscopy, optical coherent tomography, NIR diffuse reflectance	A system and method for non-invasive measurement of glucose concentration in a live subject including a thermal emission spectroscopy (TES) device, an optical coherence tomography (OCT) device or near infrared diffuse reflectance (NIDR) device. The signals generated by the TES and OCT devices along with signals generated by sensors for measuring the body heat and surface temperature of the subject are used in the metabolic heat conformation (MHC) method of determining blood glucose concentration.	30.10. 2008
10	5,028,787	Non-invasive measurment of blood glucose	NIR transmission	A near-infrared quantitative analysis instrument and method non-invasively measures blood glucose by analyzing near-infrared energy following interactance with venous or arterial blood, or transmission through a blood containing body part.	02.07. 1991
11	5,398,681	Pocket type instrument for non-invasive measurment of blood glucose concentration	Laser radiation and polarization	A pocket-type apparatus for non-invasive measurement of blood glucose concentration based on producing a polarized-modulated laser beam via an optical phase shifter, measuring a phase difference introduced, e.g., by a finger or a ear lobule of a subject, measuring phase difference between a reference signal and a measurement	21. 03.1995

				signal, and processing the obtained data which are then presented as blood glucose concentration. The optical phase shifter comprises a pair of fiber-optic arms.	
12	5,687,721	Measurement device for non-invasively determining the concentration of polarising substances	VIS	The method includes generating a beam of monochromatic light, confining the light beam to a predetermined optical path to impinge on a preselected portion of the body of the subject, polarizing the light beam, and performing both a static extinction measurement using the monochromatic light and a dynamic polarization measurement using the polarized light to obtain a measurement of the concentration of sugar in the blood in the preselected body portion.	18.11.1997
13	5,823,966	Non invasive continuous blood glucose monitoring	IR radiation of the human body	The instrument remote sensor assembly mounted in subject's ear canal continuously measures analyte concentration by detecting the infrared radiation naturally emitted by a human body. Spectral emissivity of human infrared radiation from the tympanic membrane consists of spectral information of the tissue (e.g. blood) analyte (e.g. glucose).	20.10. 1998
14	5,941,821	Method and apparatus for non-invasive measurement of blood glucose by photoacoustics	Photoacoustic spectroscopy	An excitation source provides electromagnetic energy which is utilized to irradiate the tissue, such as skin. The output of the radiation of the excitation source at the desired wavelength is coupled through a transmission device, such as a fiber optic bundle, which irradiates the electromagnetic energy onto the body surface. Absorption of the light beam results in periodic heating of the tissue, at and near the tissue surface. The air in contact with the tissue surface in the measuring	24.08.1999

				cell is in turn heated, and produces an acoustic emission in the measuring cell. This acoustic emission is detected with the differential microphone, one end of which is positioned in the measuring cell and the other end of which is positioned in the reference cell. A processor determines the concentration of the substance based upon the detected acoustic signal.	
15	US 6,188,477 B1	Optical polarization apparatus and method	Laser radiation and polarization	The detection scheme is implemented by splitting a polarized laser beam with a polarization beam splitter into a P wave component and an S wave component, phase modulating the P wave component and recombining the two components. The polarization of the combined optical beam is then rotated slightly by the variable to be monitored, such as by passing the beam through a glucose solution. At the end, the beam is passed onto a photodetector that generates a signal that is proportional to the polarization rotation angle.	13.02.2001
16	US 6, 477, 393 B1	Non-invasive blood glucose measurment techniques	VIS	Non-invasive measurement of blood glucose is achieved by transmitting a ring of electromagnetic radiation to the surface of a subject by a ring illuminator. The radiation diffuses into the subject illuminated and emits a portion of the radiation in area displaced from the illuminated area. A CCD camera collects at least a portion of the emitted radiation and generates detection signals which are processed by a processor in order to measure blood glucose concentration.	05.11. 2002
17	US 6,949,070 B2	Non-invasive blood glucose monitoring system	Thermal emission	A non-invasive blood glucose monitoring system wherein sensors in contact with separate locations on the ear and calibrated to be accurate to at least ± 0.035 degrees	27.09. 2005

				Centigrade take the ear temperatures at these locations up to four times per minute continuously to calculate the temperature differential, and using this temperature differential in conjunction with a value determined by taking the square root of the product of the fasting blood glucose and HbA1c that becomes the base line glucose reference level, it can be determined that if the temperature differential decreases, then the blood glucose has increased 1 mg/dl per approximately 0.024 C, while if the temperature differential increases, the blood glucose has decreased 1 mg/dl per approximately 0.024 C.	
18	US 6,990,364 B2	Noninvasive measurment of glucose through the optical properties of tissue	NIR	Methods and apparatus for noninvasive determination of blood analytes, such as glucose, through NIR spectroscopy utilize optical properties of tissue as reflected in key spectroscopic features to improve measurement accuracy and precision. Changes in the optical properties of tissue are detected by identifying key features responsive to physiological variations.	24. 01.2006
19	US 6,853,854 B1	Noninvasive measurment system	VIS	The noninvasive measurement system provides a technique for manipulating wave data. In particular, wave data reflected from a biological entity is received, and the reflected wave data is correlated to a substance in the biological entity. Furthermore, the wave data is used to form a matrix of pixels with the received wave data. Then, the pixels may be integrated to obtain an integration value that is correlated to a glucose level. Moreover, an amplitude and phase angle may be calculated for the reflected wave data and used to identify a glucose level in the biological entity. The glucose level may be displayed on a monitor attached to the computer.	08.02. 2005

20	US 7,884,933	Apparatus and method for determining analyte concentrations	NIR	The apparatus may comprise an emitter, close proximity detectors laterally located less than about 2 mm away from the emitter, and far away detectors laterally located greater than about 0.5 cm away from the emitter. A plurality of wavelengths may be sent from the emitter to the sample, reflected off of the sample, and received by the detectors. The reflectance value measured by the far away detectors may be compared with a reflectance value calculated using the scattering coefficients in a numerical inversion of a diffusion model to determine the analyte concentration of the sample.	08.02. 2011
21	7,914,460	Condensate glucose analyzer	Electro chemical	The present invention provides systems and methods for analyzing glucose present in exhaled breath condensate (EBC). In certain embodiments of the invention, electrochemical- or coulometric-based sensing technologies are used to analyze EBC for the presence and/or concentration of glucose.	29.03.2011
22	6,097,975	Apparatus and method for noninvasive glucose measurement	VIS	The apparatus disclosed uses light pulses directed onto a patient's skin and reflected back from the patient to measure blood glucose. Reflected light is passed through light filters that transmit a narrow bandwidth of light within a range of wavelengths that is absorbed by glucose and then measured. Unreflected light is passed through identical light filters and also measured. The two measurements are then compared and used to calculate the patient's blood glucose concentration.	01.08. 2000
23	US 7,635,331 B2	Non-invasive blood glucose sensor using a magneto-resonance absorption method and measurement methods thereof	Magneto-resonance	A blood glucose concentration in a human body is determined from a correlation between a pre-determined blood glucose concentration in the human body and the determined magneto-resonance spin-lattice relaxation	22.12. 2009

				time.	
24	US 6,723,048 B2	Method and apparatus for non-invasive analysis of blood glucose	Magnetic method	An apparatus for non-invasive detection and quantitation of analytes in a sample, such as blood glucose, employs a novel amplifier that uses high-gauss permanent magnets to permit an Rf signal to be transmitted through the sample. The concentration of the analyte can be determined from the magnitude of the reduction in the amplitude of the Rf signal at a characteristic frequency.	20.04.2004
25	US 5,827,181	Noninvasive blood chemistry measurement and system	Mechanical pressure + electric, acoustic, optical, magnetic, etc. transcutaneous method	In accordance with a first preferred embodiment of the present invention a noninvasive blood chemistry measurement method decreases the blood volume within a patient's body part relative to the normal blood volume in the body part and performs a baseline measurement. Blood volume is then increased and a second measurement is performed. Comparison of the second measurement to the baseline measurement isolates the measurement attributes of the patient's blood. In accordance with a second preferred embodiment of the present invention a noninvasive blood chemistry measurement system decreases blood volume by applying mechanical pressure to a body part. In accordance with a third preferred embodiment of the present invention, blood volume in the body part is decreased using a pressure cuff. In a fourth embodiment, a noninvasive probe accurately measures blood chemistry and uses a suction cup to increase blood volume at the blood chemistry measurement site.	27.10.1998

26	US 2010/0049016 A1	Noninvasive Transdermal Systems for Detecting an Analyte in a Biological Fluid and Methods	Chemical-optical methods	The present invention relates to noninvasive transdermal systems comprised of a noninvasive transdermal patch and a reflectometer. The noninvasive transdermal patches are comprised of a wet chemistry component and a dry chemistry component. The reflectometers include a modulated light source for emitting light to illuminate a target surface which possesses a certain color and shade of color for detection by an optical detector. The output signal is processed for determining a corresponding quantity of quality measurement.	25.02.2010
27	7486976	Optical non-invasive blood monitoring system and method	Optical method	Fluctuation in the levels of glucose and other analytes affect the refractive index of blood and extra cellular fluid in biological tissue. Given that the propagation speed of light through a medium depends on its refractive index, continuous monitoring of analyte levels in tissue is achieved by measuring characteristics of the tissue that can be correlated to the refractive index of the tissue.	03.02.2009
28	7774037	Non-invasive measurement of blood analytes	Optical method	An apparatus for the measurement of at least one analyte in the blood of a patient, which includes a light source generating broadband light and a light-transmission arrangement having a plurality of transmitting fibers is positioned for simultaneously transmitting multiple wavelengths of the broadband light from the light source to the blood of the patient. The measurement apparatus utilizes a non-pulsatile element of the patient's blood for determining the measurement of at least one analyte in the blood as a function of the amplitudes of the selected wavelengths.	10.08.2010

29	US 2010/0113901 A1 (USA)	Contact lens integrated with a biosensor for the detection of glucose and other components in tears	Fluorescence	This inventio provides contact lens with integrated biosensor for the continuous, non-invasive monitoring of glucos by employing biocomplatable nano-structure-laden lens materials. This sensing device provides an efficient and non-invasive solution for monitoring blood glucose.	06.05. 2010
30	US 2008/0218696 A1 (USA)	Non-invasive monitoring system	Optical method	This monitoring system includes a light source that illuminates at least a portion of a subject's eye with an incident light beam, and a contact lens with a coupler. The coupler couples the incident light beam into the eye and also couples the light beam out of the eye creating an output light beam. The monitoring system also includes a sensor that measures at least one spectral characteristic of the output light beam.	11.09.2008
31	US 2006/0155179 A1 (USA)	Apparatus for measuring an analyte concentration from an ocular fluid	Fluorescence	The present invention relates to a hand-held fluorescence photometer and method for measuring an analyte level from an ocular fluid. The photometer is based on a dual beams measuring system.	13.07. 2006
32	US 2006/0224057 A1 (USA)	Methods for non-invasive analyte measurement	Electromagnetic	This is a method of non-invasively measuring concentration of one or more analytes in a tissue includes exposing at least a portion of a tissue of the subject to electromagnetic radiation; obtaining a measurement of electromagnetic radiation from the tissue; and determining the presence, absence, or concentration of one or more analytes by determining a radiation signature of the electromagnetic radiation.	05.10. 2006
33	4,014,321 (USA)	Non-invasive glucose sensor system	Polarized radiation	A unique glucose sensor to determine the glucose level in patients. The patient's eye is automatically scanned using a dual source of polarized radiation, each transmitting at a different wavelength at one side of the cornea of the patient. A sensor located at the other side of the cornea detects the optical rotation of the radiation that passed	29.03.1977

				through the cornea. The result is transmitted to a remote receiver.	
34	5,209,231 (USA)	Optical glucose sensor apparatus and method	Optical method	An optical based apparatus for non-invasively determining the concentration of optically active substances in a specimen comprises, a source of a beam of spatially coherent light which is acted upon to produce a rotating linear polarized vector therein. The detector beam is received upon exiting the specimen and compared with the reference beam to determine the amount of phase shift produced by passage through the specimen.	11.05.1993
35	US 6,188,477 B1 (USA)	Optical polarization sensing apparatus and method	Laser radiation and polarization	An integrated polarization sensing apparatus and method uses a sekf-homodyne detection scheme to provide required sensitivity for numerous applications. The detection scheme is implemented by splitting a polarized laser beam with a polarization beam splitter into a P wave component and an S wave component. Then the polarization of the combined optical beam is rotated slightly by the variable to be monitored. Then the beam is passed onto a photodetector that generates a signal that is proportional to the polarization rotation angle.	13.02. 2001
36	US 6,442,410 B1 (USA)	Non-invasive blood glucose measurement system and method using optical refractometry	Optical method	A method for determining blood glucose levels using optical refractometry by passing laser light the aqueous ocular humor, measuring the laser light's optical refractivity, and comparing the refractivity with known data.	27.08. 2002
37	US 6,704,588 B2 (USA)	Method and apparatus for the non-invasive measurement of blood glucose levels in humans	Polymerization	This method includes a light source that produces collimated light at a selected wavelength. The collimated light is arranged such that it passes through a portion of an eye of the subject and reflects off an eye lens at a	09.03. 2004

				selected angle as reflected light. A polarization analyzer measures a polarization of the reflected light that exits the eye.	
38	US 6,885,882 B2 (USA)	Method and apparatus for non-invasive glucose sensing through the eye	Optical method	The present invention employs a plurality of wavelengths of light (for example, more than three) to measure blood glucose level of a patient. The plurality of wavelengths of light may be directed into the aqueous humor of the eye and the reflected light is detected and analyzed to provide information.	26.04. 2005
39	US 7,403,805 B2 (USA)	Apparatus and method for noninvasive measurement of analytes from the conjunctiva using MID-infrared radiation	MIR	A transensor mounted in the contact device laying on the cornea of the surface of the eye is capable of evaluating and measuring physical and chemical parameters in the eye. The system utilizes eye lid motion and/or closure of the eye lid to activate a microminiature radio frequency sensitive transensor mounted in the contact device. The signal can be communicated by wires or radio telemetered to an externally placed receiver. The signal can then be processed, analyzed and stored.	22.07. 2008
40	US 2004/0257585 A1 (USA)	Apparatus and method for aligning an eye with a device	Interferometry	Variation in the glucose concentration in the aqueous humor will cause like variation in its index of refraction. This refractive index can be measured by interferometry. Two beams may be directed onto the eye and caused to interfere, thereby producing a fringe pattern, that can be analyzed to determine the index of refraction of the aqueous humor in the eye and the glucose level.	23.12.2004
41	US 2011/0105868 A1 (USA)	Method and device for measuring dissolved substances in human or animal intraocular fluid	Optical method	This method takes advantage of the fact that the wave dependence of optical activity is fundamentally different from cornea birefringence. The optical activity of substances dissolved in the intraocular fluid, such as glucose, is scaled as a first approximation with the reciprocal value of the wavelength square.	05.05. 2011

42	5,713,353 (USA)	Optical method and device for determining blood glucose levels	Optical method	Blood glucose levels are determined by a device which provides a changing light pattern which changes in regard to one or several parameters defining its luminance, color, rate of flicker, spatial contrast, detail content, speed or otherwise provided that the change gradually stimulates one retinal system more than another retinal system.	03.02.1998
43	US 7,167,736 B2 (USA)	Non-invasive measurement system and method for measuring the concentration of an optically-active substance	Optical method	This system includes a light source adapted to transmit light towards a subject or object having a concentration of an optically-active substance, a polarizer positioned between the light source and the subject, an image capturing device, and a processor. The image capturing device is positioned to receive light reflected from the subject and create a measured image therefrom.	23.01. 2007
44	US 2007/0030443 A1 (USA)	Ophthalmic sensor	Optical method	This invention is generally related to a biocompatible sensor for detecting/measuring sugar, that comprises, consists essentially, or consists of an ophthalmic device comprising a molecular sensing moiety which interacts or, reacts with sugar to provide an optical signal which is indicative of sugar level in an ocular fluid.	08.02. 2007
45	5,433,197 (USA)	Non-invasive glucose measurement method and apparatus	Infrared radiation	The patient's eye is illuminated with near-infrared radiation which passes into the eye through the cornea and the aqueous humor, is reflected from the iris and/or lens surface, and then passes out through the aqueous humor and cornea. The reflected radiation is collected and detected by a near-infrared sensor which measures the reflected energy in one or more wavelength bands. Comparison of the reflected energy with the source energy provides a measure of the spectral absorption by the eye. The level of glucose in the aqueous humor is a function of the level of glucose in the blood so that non-invasive determinations of blood glucose may be obtained	18.07. 1995

				by suitable calibration relating the measured spectral absorption of the aqueous humor to the measured blood glucose level.	
46	US 2006/0203194 A1 (USA)	Apparatus for measuring fundus fluorescence	Fluorescence	Exciting light from a strobe light source is projected onto the fundus of the subject eye to excite a fluorescence substance in a subject eye fundus. Natural fluorescence emitted in the fundus is received by a photodiode. The output of the photodiode is used to calculate the intensity of the fluorescence from the measurement location.	14.09. 2006
47	6,152,875 (USA)	Glucose concentration measuring method and apparatus	Optical method	A refractive index of the aqueous humor, is calculated from the intensity values of the first and second backward scattered light beams. A concentration of glucose in the aqueous humor is calculated in accordance with correlation between the refractive index of the aqueous humor and the concentration of glucose in the aqueous humor, which correlation has been found previously.	28.11. 2000
48	US 6,975,892 B2 (USA)	Methods for non-invasive analyte measurement from the conjunctiva	MIR	This invention is related to non-invasive methods and instruments to detect the level of analyte concentrations in the tissue of a subject by measuring electromagnetic radiation signatures from the subject's conjunctiva. In one aspect of the invention, an instrument floods the conjunctiva of the subject with electromagnetic radiation in the mid-infrared range and measures analyte concentrations based on mid-infrared radiation reflected back to the instrument.	13.12. 2005

Референце прилога

- [1] Tuchin, V.V., (ed.) Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues Series in Medical Physics and Biomedical Engineering, ed. John G Webster, et al. 2009, CRC Press Taylor & Francis Group: USA, 2009
- [2] World Health Organization:: <http://www.who.int/en/>.
- [3] Waugh A., Grant A., Anatomy and Physiology in Health and Illness, 9th ed. Churchill Livingstone, Elsevier Ltd., Spain, 2004
- [4] Tsenkova, R., Introduction: Aquaphotomics: Dynamic spectroscopy of aqueous and biological systems describes peculiarities of water, Journal of Near Infrared Spectroscopy 17(1),2009, 303-315

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Мунџан

број индекса 05/08

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Оптичко неинвазивно транскутано мерење концентрације
ГЛУКОЗЕ У КРВИ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 27.08.2013

Јелена Мунџан

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Мунџан
Број индекса 05/08
Студијски програм Биомедицинско инжењерство
Наслов рада Оптичко неинвазивно транскутано мерење
концентрације глукозе у крви
Ментор др Ђуро Коруга

Потписани/а Јелена Мунџан

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 27.08. 2013

Јелена Мунџан

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Оптичко неинвазивно транскутано мерење концентрације
глукозе у крви

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 27.08.2013

Јелена Милић