

ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
DIPARTIMENTO DI  
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E  
DELL'INFORMAZIONE  
“GUGLIELMO MARCONI”

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

BIOINCHIOSTRI PER IL MONITORAGGIO  
CONTINUO E NON INVASIVO DELLA  
GLICEMIA

Elaborato in  
Biomateriali

Relatore  
PROF. JOSEPH LOVECCHIO

Presentata da  
FEDERICA MARCHETTI

ANNO ACCADEMICO 2020/2021



# INDICE

INDICE.....	3
ABSTRACT.....	6
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE .....	8
1.1 Definizione, classificazione e stime legate al diabete.....	8
1.2 Complicazioni secondarie legate al diabete e prevenzione .....	11
1.2.1 Prevenzione .....	11
1.2.2 Ipoglicemia.....	12
1.3 Metodi di monitoraggio del glucosio.....	13
CAPITOLO 2 RICERCA DELLA LETTERATURA .....	15
CAPITOLO 3 METODI DI CONTROLLO CON AGO .....	17
3.1 Automonitoraggio del livello di glucosio sanguigno.....	17
3.1.1 Benefici dell'automonitoraggio e approccio al metodo SMBG.....	18
3.1.2 Aspetti pratici .....	20
3.1.3 Riduzione del dolore .....	21
3.1.4 Aspetti critici.....	23
3.2 Monitoraggio continuo del glucosio .....	25
3.2.1 Introduzione ai dispositivi CGM e principio di funzionamento .....	25
3.2.2 Aspetti positivi di un monitoraggio continuo dei parametri .....	27
3.2.3 Classificazione dei dispositivi.....	29
3.2.4 Approccio alla tecnologia e al mercato.....	33
3.2.5 Limiti del metodo CGM con ago .....	36
3.3 Alcuni dispositivi innovativi CGM di tipo invasivo.....	37
3.3.1 FreeStyle Libre subcutaneous continuous glucose monitoring system ...	37
3.3.2 Biosensore per il glucosio ad ago basato su nanofibre .....	39
3.3.3 Eversense Continuous Glucose Monitoring System.....	42
CAPITOLO 4 METODI DI MONITORAGGIO NON INVASIVI E MINIMAMENTE INVASIVI.....	45

4.1 Descrizione, tipologie e aspetti di interesse.....	45
4.2 Controllo del glucosio con liquidi alternativi .....	46
4.2.1 Glucosio dalle lacrime.....	46
4.2.2 Sensori salivari.....	48
4.2.3 Sensori indossabili e sudore .....	49
4.2.4 Monitoraggio dal liquido interstiziale nei sensori ottici .....	51
4.2.5 Sensori colorimetrici .....	52
4.2.6 Monitoraggio del glucosio attraverso l'urina.....	53
CAPITOLO 5 TATUAGGI COME BIOSENSORI.....	55
5.1 Biosensori .....	55
5.2 Cenni sull'arte del tatuaggio .....	57
5.3 Normative .....	58
5.4 Qualche informazione sulla pratica del tatuaggio.....	59
5.5 Tatuaggi come biosensori: stato dell'arte .....	61
5.5.1 Insieme dei parametri osservabili.....	64
5.5.2 Formulazione dei bioinchiostri per il glucosio .....	65
5.6 Microneedles Patches .....	67
5.7 Utilizzo di Smartphones come dispositivi POC .....	69
CONCLUSIONI.....	72
REFERENZE .....	74



## ABSTRACT

Il diabete mellito è una delle malattie più diffuse al mondo ed i casi accertati aumentano ogni anno. Dai primi metodi di monitoraggio della glicemia attraverso ripetute punture, oggi si punta maggiormente su un monitoraggio continuo dei parametri di interesse. Sebbene le innovazioni tecnologiche legate al controllo del diabete si siano largamente fatte strada negli ultimi anni, spesso la praticità, i costi e la manutenzione di tali dispositivi non sono aspetti ottimali per gli individui che ne devono fare uso. L'obiettivo tecnologico dei giorni d'oggi è quello di aumentare l'autonomia degli individui nell'utilizzo di dispositivi professionali per il miglioramento del proprio stile di vita, a maggior ragione in ambito medico-biologico. Questo elaborato analizza l'evoluzione dei metodi di rilevazione dei parametri legati alla malattia del diabete, con particolare attenzione sulle recenti proposte di innovazione tecnologica. Inoltre, si ripropone di evidenziare il metodo più efficace tra quelli esaminati: l'utilizzo di bioinchiostri come reagenti sottocutanei. Questa tecnica innovativa si ripromette di diminuire fortemente i costi e gli sprechi legati ai dispositivi monouso. Inoltre, permette una maggiore raccolta di informazioni continuative, attraverso la proposta di un accoppiamento con dispositivi mobili, largamente diffusi ai giorni d'oggi, da poter condividere facilmente e comodamente con il proprio gruppo di medici.



# Capitolo 1

## INTRODUZIONE

### 1.1 Definizione, classificazione e stime legate al diabete

Una delle fonti di sostentamento per l'organismo è il glucosio, esso è il fattore che permette il funzionamento delle cellule essendo la molecola più facile da cui ricavare ATP ("moneta energetica di scambio" delle cellule). Il glucosio, una volta inserito nel nostro corpo, viene regolato finemente da due ormoni: insulina e glucagone.

L'insulina è la molecola che permette l'ingresso del glucosio disperso nel sangue all'interno delle cellule (che altrimenti andrebbero in sofferenza) e la creazione di riserve energetiche per il futuro, andando a trasformare il glucosio in glicogeno e stoccandolo all'interno di specifici tessuti. In quest'ottica l'insulina influenza il metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e delle proteine, promuovendo la conservazione dell'energia che viene introdotta nell'organismo con l'alimentazione [1].

Quando si parla di diabete, ci si riferisce principalmente al diabete mellito (DM), ossia alla patologia legata all'iperglicemia. Essa è causata solitamente da un deficit assoluto di insulina o da un deficit parziale relativo alla resistenza dei tessuti periferici all'azione dell'ormone stesso [1].

Le alterazioni legate al metabolismo che colpiscono i soggetti diabetici sono la diretta conseguenza del deficit parziale o assoluto di insulina e vengono amplificate dalla concomitante inappropriata secrezione di glucagone (ormone antagonista dell'insulina). Di conseguenza l'iperglicemia è dovuta all'effetto combinato dell'aumentata produzione epatica di glucosio (richiesta dall'organismo) e della sua ridotta utilizzazione da parte dei tessuti periferici insulino-dipendenti (principalmente fegato, muscoli e tessuto adiposo) [1].

Un altro tipo di diabete che invece non ha niente a che fare con il glucosio è il diabete insipido; esso è caratterizzato dalla incapacità di trattenere accettabili livelli di acqua nell'organismo e quindi comporta un'eccessiva eliminazione di urina fortemente diluita. Questo comportamento è causato da una insufficiente secrezione

dell'ormone antidiuretico ADH (prodotto dalla neuroipofisi) o da una risposta renale inadeguata all'ormone stesso, la distinzione della tipologia porta a due diversi trattamenti della malattia [2].

La *German Diabetes Association* definisce il termine diabete mellito come un concetto che racchiude disturbi eterogenei del metabolismo per i quali il risultato principale è iperglicemia cronica [3]. La causa dell'iperglicemia è, come già riportato in precedenza, una ridotta secrezione di insulina o una ridotta azione dell'insulina o entrambe. La classificazione secondo la guida clinica americana rilasciata nel 2021 è la seguente [4]:

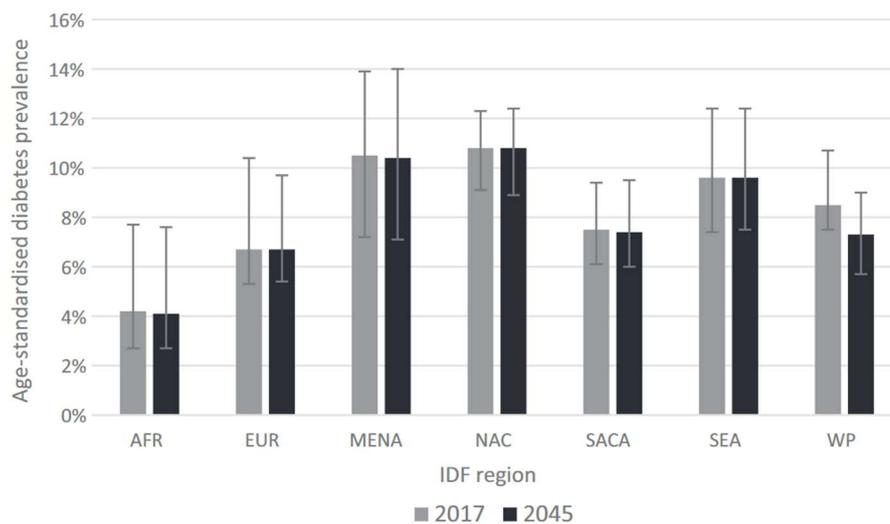
- Diabete di tipo 1: mancanza totale di insulina causata dalla distruzione delle cellule  $\beta$  pancreatiche, solitamente mediato da meccanismi autoimmuni;
- Diabete di tipo 2: concomitanza di resistenza all'insulina e perdita di funzionalità nella produzione di insulina da parte delle cellule  $\beta$  in modo progressivo;
- Tipi specifici di diabete dati da cause secondarie: malattie del pancreas esocrino, diabete farmaco-indotto, difetti genetici della funzionalità delle cellule  $\beta$ , diabete indotto per sostanze chimiche;
- Diabete gestazionale: viene diagnosticato durante il secondo o terzo trimestre di gravidanza in soggetti che non avevano manifestato chiari segni di diabete in precedenza.

**Tabella 1 - Criteri diagnostici per il diabete di tipo 1 e di tipo 2 [3]**

	Type 1 Diabetes*	Type 2 Diabetes
Manifestation age	Mostly children, adolescents and young adults	Mostly middle and old age
Onset	Acute to subacute	Usually gradual
Symptoms	Frequently polyuria, polydipsia, weight loss, fatigue	Frequently no complaints
Body weight	Usually normal	Usually overweight
Predisposition to ketosis	Pronounced	None or only slight
Insulin secretion	Reduced or none	Below normal to high, qualitatively always impaired
Insulin resistance	None (or only low)	Often pronounced
Frequency in patient's family history	Usually negative	Typically positive
Concordance with identical twins	30 to 50 %	Over 50 %
Heredity	Multifactorial (polygenetic)	Multifactorial (most likely polygenetic, but genetic heterogeneity is possible)
Associated with HLA (leukocyte antigen) system	Present	Not present
Antibodies associated with diabetes	Approx. 90-95 % at onset (GAD, ICA, IA-2, IAA)	None
Metabolism	Unstable	Stable
Response to insulin secretion stimulating antidiabetics	Usually none	Usually good at first
Insulin therapy	Required	Usually not required until insulin secretion has decreased after years of disease

\* The LADA (latent autoimmune diabetes of adults) is associated with slower loss of beta cell function. Rapid failure of oral antidiabetics is to be expected. Analysis of GAD antibodies is recommended for cases of suspicion of LADA.

La prevalenza di persone che manifestano livelli di glucosio sopra la media è in aumento ogni anno, la stima legata alle persone affette da diabete nel 2017 era di 451 milioni di persone, con aspettativa di incremento a 693 milioni entro il 2045 [5]. L'aumento di obesità, sedentarietà e invecchiamento nella popolazione ha portato la prevalenza del diabete di tipo 2 ad essere quadruplicata tra gli anni '80 e il 2004; questo ha fatto sì che il diabete si aggiudicasse la sesta posizione come causa di disabilità nel 2015 [6].



**Figura 1 - Prevalenza del diabete standardizzata per età nelle regioni facenti parte dell'IDF (International Diabetes Federation) per il 2017 e il 2045 (18-99 anni) [5]**

Nella guida alla cura del diabete rilasciata dall'ADA (*American Diabetes Association*) nel 2021 viene specificata anche un'altra patologia chiamata prediabete [4]: il termine prediabete viene utilizzato per indicare individui nei quali il livello di glucosio non rientra nei livelli tipo di definizione del diabete, ma che comunque è troppo alto per essere definito normale. Una buona percentuale di pazienti che riscontrano DM ogni anno presentano una storia di prediabete [7], inoltre si prospetta che la percentuale di persone diagnosticate con prediabete aumenti a 470 milioni o più entro il 2030 [8].

## 1.2 Complicazioni secondarie legate al diabete e prevenzione

Il DM è caratterizzato da complicanze a lungo termine per l'interessamento dei grossi vasi (macroangiopatia), dei piccoli vasi (microangiopatia) e del sistema nervoso (neuropatia) [1].

Esiste però anche il rischio di risultare diabetici a seguito di un'altra malattia primaria: ad esempio il diabete relazionato alla fibrosi cistica è la patologia secondaria sviluppabile più comune, viene riscontrata nel 20% degli adolescenti e nel 40-50% degli adulti affetti da fibrosi cistica [9]. Diversi studi riportano anche la presenza di diabete mellito a seguito di trapianto di organi [10] [11].

Anche per il diabete di tipo 2 il controllo e la gestione dei livelli di glucosio sono un aspetto fondamentale per la salvaguardia della salute del paziente, infatti questa malattia porta a complicazioni microvascolari e macrovascolari secondarie che possono facilmente sfociare in retinopatie, nefropatie e neuropatie [12].

### 1.2.1 Prevenzione

È noto già da anni che il diabete di tipo 1 e 2 sono dovuti ad una combinazione di fattori genetici, fattori ambientali e stile di vita, i quali forniscono quindi una base per la diagnosi e per la eventuale prevenzione della malattia [13] [14] [15]. Sono stati tentati nell'ultimo ventennio diversi esperimenti per verificare se fosse possibile prevenire il diabete di tipo 1, ma nessuno di questi ha mostrato una tendenza a rallentare la malattia [16]. Alcuni tra i più recenti sono stati l'ENDIT (European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial), che testava la somministrazione di un'elevata dose di nicotinamide in parenti di persone aventi DM di tipo 1, e il DTP-1 (Diabetes Prevention Trial – type 1), che ha studiato l'efficacia della somministrazione di una bassa dose di insulina in parenti di primo grado di pazienti affetti da DM di tipo 1 diagnosticati con un elevato rischio di contrazione del diabete [17]. Il primo *trial* si è rivelato avere un impatto positivo sugli animali ma non ha dato nessun riscontro sugli umani nel periodo di studio di 5 anni [18]; il secondo non ha avuto effetto in generale sulla popolazione studiata, ma è stato notato un ritardo e forse anche una riduzione dell'incidenza del diabete di tipo 1 nella porzione di soggetti a cui veniva somministrata insulina per via orale [19] [20].

Per quanto riguarda il diabete di tipo 2 è stato portato alla luce che esistono diversi comportamenti da poter mettere in atto per prevenire l'avanzamento di questa patologia e anche per prevenire lo sviluppo della malattia stessa in soggetti prediabetici. La gestione di uno stile di vita sano accompagnato da dieta, esercizio fisico e controllo dei valori legati al glucosio portano ad una prevenzione della malattia e anche ad un minore utilizzo di terapie farmacologiche [15] [21].

### 1.2.2 Ipoglicemia

Una delle complicanze più gravi a cui può andare incontro un diabetico è l'ipoglicemia: è definita per livelli di glucosio inferiori a 70 mg/dL secondo le guide dell'*American Diabetes Association* [22]. Essa è il risultato di una mancata corrispondenza tra dose di insulina somministrata, cibo consumato ed esercizio fisico [23].

**Tabella 2 - Segni e sintomi manifestati in ipoglicemia [23]**

Segni e sintomi dati dal sistema nervoso autonomo	Tremore
	Palpitazioni
	Sudori freddi
	Pallore
	Segni e sintomi di neuroglicopenia
	Difficoltà di concentrazione
Visione disturbata o visione doppia	Visione disturbata dei colori
	Difficoltà ad udire
	Biascicamento
	Difficoltà di giudizio e confusione
	Problemi con la memoria a breve
	Vertigini e andatura instabile
	Perdita di conoscenza
	Morte
Segni e sintomi comportamentali	Irritabilità
	Comportamento irregolare
	Incubi
	Pianto inconsolabile
Sintomi non specifici (associati a livelli di glucosio sanguigno alti, bassi o normali)	Fame
	Mal di testa
	Nausea
	Stanchezza

Ha una maggiore prevalenza sui soggetti diabetici di tipo 1 e può portare a molteplici complicazioni secondarie come: aumento della mortalità, patologie cardiovascolari, patologie cerebrovascolari e aumento dell'ospedalizzazione [24]. Una delle cause principali che portano a ipoglicemia è un monitoraggio inadeguato del glucosio ed è stato dimostrato che avere un dispositivo che esegue un monitoraggio continuo ha effetti benefici sulla pratica clinica: nell'istruzione dei pazienti riguardo al monitoraggio stesso dei parametri e nella somministrazione della terapia (e anche la valutazione di cambiamenti) [25].

### 1.3 Metodi di monitoraggio del glucosio

Come riportato sopra, la patologia del diabete porta con sé l'onere di dover verificare periodicamente alcuni parametri di interesse come la glicemia e i livelli di emoglobina glicata (HbA1C test) [26]; questi controlli sono obbligatori soprattutto se si fa uso di una terapia quotidiana di insulina. L'automonitoraggio ha un'importanza fondamentale nella determinazione di episodi asintomatici di ipoglicemia e anche nel raggiungimento quotidiano dei livelli corretti di glucosio senza avere escursioni significative da livelli molto bassi a molto alti [27] [28].

Negli anni si è puntato ad offrire dei metodi meno invasivi di analisi dei parametri, e anche che potessero offrire un monitoraggio continuo (*CGM continuous glucose monitoring*) per poter agire in modo più efficace nella gestione della malattia. I benefici di una rilevazione continua del glucosio in adolescenti, giovani adulti e anche in adulti di età avanzata è stato riportato da diversi studi [29] [30] e verrà trattato più specificatamente nei capitoli 3 e 4. Nonostante il miglioramento dal classico metodo di puntura con ago, al monitoraggio continuo, sempre tramite ago, questa tipologia di verifica si è rivelata non poco scomoda negli anni, soprattutto durante la pandemia di Covid-19 che in molti casi ha impossibilitato i pazienti ad avere un rapporto fisico con il proprio medico [31] (e quindi a non poter eseguire controlli sull'inserimento del dispositivo CGM e sulla sua calibrazione). Per questo ed altri motivi le innovazioni scientifiche riguardanti i dispositivi legati al diabete si sono ampiamente fatte strada nell'ultimo ventennio. Molte sono state le proposte per portare alla produzione di strumentazione che meglio si approcciasse alla vita giornaliera dei pazienti e alla loro comunicazione dei risultati con il proprio team di medici. In questo elaborato verranno

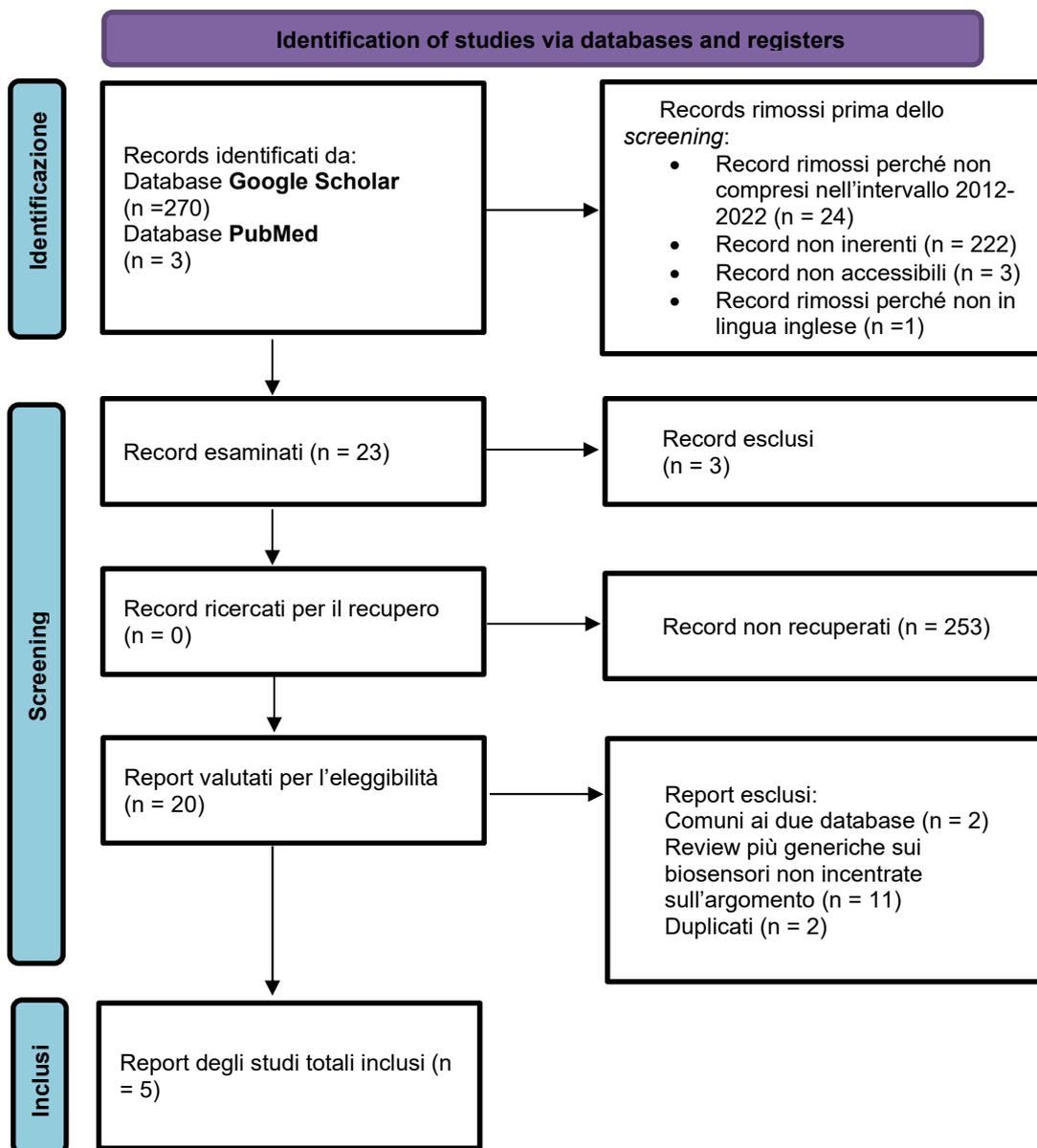
riportati alcuni metodi di CGM che utilizzano ago e altri che invece adottano tecniche meno invasive.

Il metodo più innovativo che la tesi propone è quello attualmente portato avanti da alcuni progetti, tra cui quello dell'Università di Harvard: l'utilizzo di bioinchiostri come biosensori [32]. L'obiettivo principale dello sviluppo di questi biosensori è quello di minimizzare l'invasività delle rilevazioni di marcatori biologici di interesse, nel caso specifico per il diabete, e quello di garantire una rilevazione continua dei parametri.

## Capitolo 2

### RICERCA DELLA LETTERATURA

Il materiale riguardante prettamente i bioinchiostrici è stato trovato svolgendo una ricerca della letteratura presente in Google Scholar e PubMed. Di sotto riportato il diagramma di flusso che ha guidato la scelta degli articoli principali.



Le parole chiave utilizzate per la ricerca in Google Scholar sono: “colorimetric”, “dermal”, “tattoo”, “biosensors” e “diabetes”; mentre per la ricerca in PubMed sono: “colorimetric”, “dermal” e “tattoos”. Le parole chiave sono differenti per permettere una ricerca in linea con il database utilizzato. Google Scholar necessita di una selezione di parole focalizzate sull’argomento che restringano il campo dei risultati a causa della vastità del materiale proposto; mentre, PubMed, necessita di un campo di ricerca meno stringente poiché esiste già una preselezione restrittiva del materiale presente all’interno del database. La ricerca si è incentrata sugli articoli di tipo scientifico pubblicati dal 2012 al 2022 in lingua inglese. I principali motivi di eliminazione sono stati i seguenti: tecnologia che necessita di essere indossata continuamente e non iniettabile, utilizzo di dispositivi sofisticati di analisi, informazioni non comprese nello spettro visibile, impossibilità di scaricamento dell’articolo per le credenziali fornite, articoli comuni ai due database, non focus sull’argomento bioinchiostri ma revisioni più ampie sui biosensori, duplicati, altre tecnologie che non si basano sulla colorimetria, bioinchiostri utilizzati per la stampa 3D e non iniettabili e articoli incentrati sull’analisi con smartphones e non sui biosensori in sé. Alcuni degli articoli non considerati per l’argomento specifico *bioinchiostri* sono comunque stati utilizzati all’interno della tesi perché inerenti alla trattazione macroscopica dell’argomento.

## Capitolo 3

### METODI DI CONTROLLO CON AGO

#### 3.1 Automonitoraggio del livello di glucosio sanguigno

Il primo metodo di monitoraggio che permetteva di essere usato autonomamente dai pazienti affetti da diabete è stato il glucometro: esso permetteva di misurare la concentrazione di glucosio sanguigno dalla propria abitazione; questo lo ha reso il primo dispositivo diagnostico POC (*point of care*) in ambito diabetico. I dispositivi POC sono degli strumenti diagnostici che permettono di effettuare analisi *in vitro*, non hanno la necessità di essere utilizzati in laboratorio o da esperti del settore e forniscono i risultati del test per cui sono progettati in poco tempo [33].

Storicamente si dice che il primo elettrodo sensibile al glucosio sia stato sviluppato negli anni '60 [34], ma è solo dagli anni '80 che si è iniziato a capire realmente l'importanza di questo metodo di rilevazione e a proporlo nelle guide di educazione al diabete.

Il principio su cui si basano i glucometri è la quantificazione dell'ossidazione del glucosio (reazione enzimatica), la quale si instaura accoppiando il campione di sangue (prelevato tramite puntura) con un'apposita striscia rilevatrice; la reazione avviene quando il plasma si diffonde nei pori della striscia, andando a reagire con degli enzimi depositati su di essa che replicano quelli implicati nell'ossidazione del glucosio (glucosio ossidasi e deidrogenasi e perossidasi) [34]. A questo punto l'informazione utile viene ottenuta tramite tecnica riflettometrica, grazie alla colorazione della striscia a seguito della reazione enzimatica, oppure tramite una misurazione impedenziometrica, ricavata dalla conduttività del sangue indotta dalla corrente generata grazie all'ossidazione del glucosio [34].

Già alla fine degli anni '90 l'ADA (*American Diabetes Association*) aveva rilasciato una guida che riportava i consigli sull'uso di dispositivi per l'automonitoraggio del glucosio (SMBG *self-monitoring of blood glucose*); nonostante non ci fossero ancora molti studi che giustificavano i benefici di questa pratica nelle

diverse casistiche in cui si può presentare il diabete e i soggetti fossero abbastanza scettici all'introduzione di questa tecnologia. In uno studio svolto tra il 1994 e il 1997 e pubblicato nel 2000 [35] viene riportato che solo il 40% della popolazione studiata con diabete di tipo 1 e il 33% con diabete di tipo 2, svolgeva l'automonitoraggio con la frequenza indicata dalla guida clinica. Sono stati evidenziati diversi fattori, di cui si parlerà meglio in seguito, che hanno contribuito ad avere queste basse percentuali.

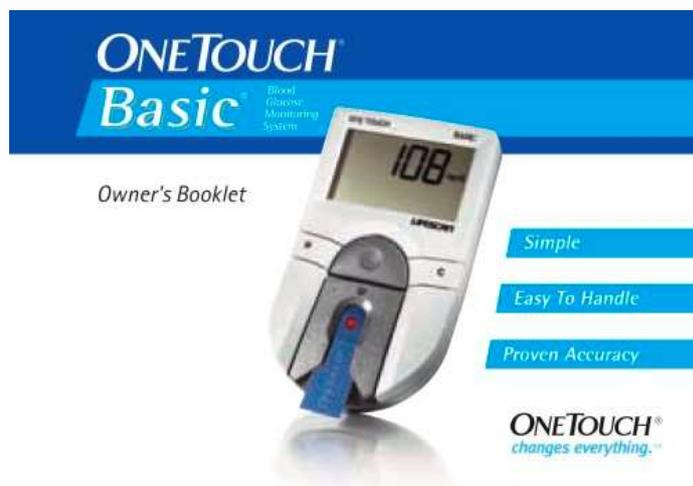
### 3.1.1 *Benefici dell'automonitoraggio e approccio al metodo SMBG*

Il metodo SMBG di monitoraggio fu l'innovazione più significativa per la sfera medica che ruotava intorno al diabete all'inizio del nuovo millennio. La pratica clinica iniziò ad affidarsi sempre di più all'educazione e alla responsabilizzazione dei pazienti per la gestione della malattia. Lo scopo di questa pratica era quello di poter raccogliere informazioni sulla concentrazione del glucosio nel sangue in diversi momenti significativi della giornata, in modo da aggiustare la terapia per mantenere dei livelli di glucosio sanguigno costanti [36]. I benefici riportati dallo studio di Benjamin Evan M. erano i seguenti:

- Implementazione di un profilo personale che descriva le fluttuazioni del glucosio, messo a disposizione del personale medico per creare un piano di terapia paziente-specifico;
- Dare la possibilità alle persone affette da diabete e alle loro famiglie di aggiustare in modo più consapevole la routine quotidiana per quanto riguardava la dieta e l'esercizio fisico;
- Creare delle basi più solide per il riconoscimento di episodi di iperglicemia o ipoglicemia, che prima si basavano principalmente su sensazioni del paziente;
- Aumentare e rafforzare la conoscenza dei pazienti sugli aspetti del loro stile di vita che potevano andare ad intaccare la corretta gestione della malattia, così come l'effetto che hanno diversi farmaci sui parametri di interesse.

Sia i clinici dell'epoca, sia le organizzazioni maggiori di guida clinica al diabete, erano inclini a promuovere questo metodo e anche le aziende di tecnologia accolsero l'aumento di richieste producendo diversi modelli di dispositivi SMBG. All'inizio degli anni 2000 esistevano già sette case produttrici che proponevano

complessivamente più di 20 tipologie di glucometri sul mercato [36], in modo da venire in contro ai diversi bisogni paziente-specifici.



**Figura 2 - Glucometro OneTouch Basic proposto da LifeScan**

Già alcuni *trial* all'inizio degli anni 2000 avevano identificato una correlazione tra l'aumentato utilizzo di automonitoraggio e la riduzione nei valori di emoglobina glicata per i pazienti affetti da diabete di tipo 1 [37], e un rallentamento delle complicazioni secondarie legate al diabete [38]. Per quanto riguarda i benefici legati al diabete di tipo 2 sono sempre esistite opinioni controverse; alcuni studi dimostravano un generico beneficio nel controllo del glucosio e un miglior aggiustamento dei parametri [39], nonché un abbassamento dell'emoglobina glicata e una diminuzione di complicazioni microvascolari legate ai rischi secondari associati al diabete [12]. Pareri contrastanti invece sostenevano che la correlazione tra il monitoraggio con il metodo SMBG e il controllo del glucosio per i pazienti con diabete di tipo 2 era alquanto bassa [36]. In generale il mancato utilizzo (o un utilizzo improprio) di automonitoraggio del glucosio era stato riportato essere associato a complicanze legate al diabete e ad ospedalizzazione a causa di queste [38].

Sapendo ad oggi come si è evoluta la questione riguardante il monitoraggio del glucosio per pazienti diabetici, possiamo dire che già all'epoca la comunità clinica si fosse accorta dell'importanza di questa innovazione tecnologica e che nonostante l'iniziale scetticismo, anche le evidenze scientifiche hanno portato ad un'inclusione sempre maggiore di questa pratica nella quotidianità dei pazienti. Molte associazioni e programmi come l'American Diabetes Association, l'Healthy People Program e

l'Organizzazione Mondiale della Sanità hanno fatto in modo di sensibilizzare l'approccio a questa tecnica, fornendo manuali e guide a cui rivolgersi con evidenze scientifiche a cui affidarsi, portando addirittura all'istituzione della Giornata Mondiale del Diabete nel 1992.

### 3.1.2 *Aspetti pratici*

Il test viene svolto andando a prelevare un piccolo quantitativo di sangue, solitamente dai polpastrelli della mano non dominante, tramite un oggetto appuntito come un ago. Si applica poi il campione di sangue (il quantitativo di sangue necessario viene segnalato dal produttore del dispositivo) su una striscia rivelatrice che viene poi inserita nel dispositivo che svolge la lettura automatica [36]. È stato riportato da diversi studi che la corretta riuscita dei test, e quindi anche il beneficio proveniente dall'utilizzo di questa tecnica, è strettamente dipendente dall'educazione e dall'addestramento che ricevono i pazienti sull'utilizzo del dispositivo e sulla comprensione dei risultati [38] [34]. Informazioni aggiuntive come gli alimenti che si assumono, i farmaci di cui si fa uso e l'esercizio fisico che si svolge possono diventare fondamentali per interpretare correttamente i risultati visualizzati sul glucometro [38].

Un altro aspetto di cui i pazienti devono essere a conoscenza è che l'accuratezza del dispositivo SMBG può variare in presenza di diverse sostanze e potrebbe rendersi necessario lo svolgimento di un altro test di controllo [34]; ad esempio i valori di ematocrito hanno un impatto significativo sul risultato visualizzato: la presenza di un numero elevato di globuli rossi ostacola la diffusione del plasma nei pori della striscia e porta ad una diminuzione del volume di plasma utile alla reazione enzimatica [40]. Anche le strisce rilevatrici possono venire alterate e provocare dei risultati errati, ad esempio se vengono esposte a luce intensa, all'umidità o al calore [41].

Prima di utilizzare il glucometro (e anche nei casi di risultati dubbi) l'utilizzatore deve effettuare una calibrazione del dispositivo, essa consiste nell'inserimento di un codice o nell'inserimento di una striscia di calibrazione, la calibrazione è specifica per ogni dispositivo [34]. Inoltre, l'FDA (*Food and Drug Administration*) consiglia di svolgere dei controlli dei risultati ottenuti dal dispositivo periodicamente, usando dei

test forniti dal produttore o confrontando i risultati del dispositivo con quelli prodotti da un laboratorio di analisi [34].

### 3.1.3 *Riduzione del dolore*

Già durante i primi anni del XXI secolo si iniziava a parlare di metodi per ridurre il dolore provocato dalle numerose punture richieste per monitorare il diabete, soprattutto in soggetti affetti da diabete di tipo 1. Il primo miglioramento è stato nella riduzione del quantitativo di sangue necessario per la produzione di un risultato accettabile, questo ha portato a non dover più effettuare ferite profonde [36]. Un'altra proposta avanzata grazie ai risultati ottenuti da diversi studi è stata quella di poter svolgere il prelievo del sangue da altre aree che non fossero i polpastrelli delle mani, come i palmi, l'addome, le cosce, ecc.; zone quindi meno innervate e con minore capillarizzazione rispetto ai polpastrelli [42]. La prova che queste aree fossero meno dolorose dava la possibilità ai pazienti di essere incentivati ad aderire alla routine di monitoraggio [43]; di seguito sono riportati alcuni esempi per discutere i risultati.

Uno studio svolto nel 2001 (e basato su evidenze già presentate nel 1991) ha verificato la possibilità di svolgere il prelievo del sangue dal tessuto addominale in un campione di popolazione formato da soggetti diabetici e non [44]. È stato chiesto ai partecipanti di effettuare molteplici prelievi giornalieri sia dalla zona addominale sia dai polpastrelli per valutare alcuni parametri qualitativi come il livello di dolore, il numero di punture necessarie per prelevare un campione di sangue sufficiente, il sanguinamento a seguito della puntura e il numero di strisce utilizzate per produrre un singolo risultato. Inoltre, sono stati analizzati i risultati anche da un laboratorio per produrre un confronto quantitativo con i valori visualizzati dal glucometro quando la misurazione avveniva dal tessuto addominale. In questo senso è stato calcolato l'indice di correlazione di Pearson, grafici di Bland Altman e altri parametri significativi. I risultati ottenuti sono stati in generale molto positivi, i valori prelevati dalla zona addominale erano in elevata correlazione con quelli prodotti dal laboratorio e inoltre i pazienti non hanno manifestato grandi differenze nella valutazione dei parametri qualitativi e in aggiunta hanno riportato un livello di dolore inferiore rispetto alla zona del polpastrello. Purtroppo, in alcuni pazienti affetti da obesità non è stato possibile effettuare le rilevazioni dalla zona addominale; questo evidenzia un potenziale limite

di questa pratica. In più la maggior parte dei partecipanti ha manifestato imbarazzo a dover effettuare questa misurazione in pubblico e per questo principale motivo ha affermato di non voler continuare ad utilizzare questi prelievi nella pratica giornaliera ma a prenderli in considerazione come temporanei sostituti per far “riposare” l’area dei polpastrelli. Lo studio ha quindi confermato la possibilità di utilizzare questa nuova zona non solo come area utile in cui fare le iniezioni di insulina (dichiarato dai partecipanti), ma anche come area in cui poter prelevare i campioni di sangue per le rilevazioni. Nonostante ciò, la pratica non ha evidenziato un chiaro cambiamento e miglioramento nello stile di vita dei pazienti.

Per discutere i risultati di uno studio molto più recente, si riporta di seguito quello svolto da Pavithran A.A, et al. [43]. In questo caso la popolazione studiata era interamente composta da diabetici e il sito alternativo analizzato era il palmo della mano. Ciò che veniva indagato era sia il livello di dolore percepito nelle due zone a confronto, sia la verifica delle variazioni di glucosio rilevate nelle medesime. I risultati sono stati simili a quelli dello studio precedentemente citato: effettivamente il livello di dolore percepito nel palmo era inferiore a quello dei polpastrelli nella maggior parte della popolazione studiata ed inoltre la correlazione tra i risultati di glucosio sanguigno ottenuto con i due metodi era superiore al 90%. Inoltre, quest’area non ha riportato limitazioni legate all’indice di massa corporea (e quindi all’eventuale obesità) dei pazienti come il precedente. Nonostante il numero di studi che sostenevano queste pratiche alternative fosse in numero sempre crescente nel primo ventennio degli anni 2000, all’inizio dell’articolo di Pavithran A.A, et al. viene specificato che ancora oggi la zona principalmente scelta dai pazienti (e consigliato dalla pratica clinica) rimane sempre quella dei polpastrelli.



**Figura 3 – Area alternativa zona addominale**

[44]



**Figura 4 – Area alternativa palmo della mano**

[43]

### 3.1.4 *Aspetti critici*

Una delle questioni da valutare quando si parla di dispositivi SMBG è la spesa che ruota attorno all'utilizzo quotidiano di dispositivi monouso, spesso necessari anche per molteplici test giornalieri. Riguardo a questo aspetto gli studi hanno valutato principalmente la situazione americana, dove la sanità è principalmente privata e spesso gli individui di ceto medio-basso non dispongono di un'assicurazione sulla salute.

La peculiarità di avere molti dispositivi sul mercato per incentivare le persone a trovare la tipologia che meglio si inserisca nel loro stile di vita, diventa inutile quando i pazienti si devono affidare ad assicurazioni che spesso coprono i costi solo per una tipologia specifica di sensore [38]. Accoppiato a questo problema c'è quello della spesa legata alle strisce rilevatrici, le quali sono spesso specifiche per il singolo dispositivo e, in molti casi, le opzioni più generali a basso prezzo non sono compatibili [34]. Alcune ricerche hanno evidenziato che fornire i dispositivi di SMBG a costo zero incentivava l'utilizzo dei dispositivi POC secondo le specifiche rilasciate dall'ADA [45].

Come già nominato, è stato svolto uno studio tra il 1994 e il 1997 che si riprometteva di rilevare ed esaminare i modelli di pratica dell'automonitoraggio e le barriere che ne impedivano il corretto svolgimento [35]. Nella sperimentazione venivano evidenziati i benefici della pratica SMBG (nonostante all'epoca non ci fosse ancora una quantità di studi sufficienti per poter definire solo in modo positivo i risultati) e anche il costo della pratica, già visto come un problema. Un risultato significativo per i dati forniti di quegli anni è che per un paziente affetto da diabete di tipo 1, che seguisse la frequenza di prelievi consigliati dall'ADA, la spesa delle sole strisce per i test poteva superare gli 850 dollari annui. Le barriere che secondo lo studio potevano interferire con il conseguimento degli obiettivi di automonitoraggio erano: elevato costo delle strisce, differenze linguistiche, educazione mancante o inadeguata riguardante la pratica e i suoi benefici e disagi del paziente. Questi sono stati gli aspetti indagati per verificare se esistesse una correlazione tra esse e la bassa percentuale di persone che seguivano le norme cliniche.

I risultati più importanti si sono rivelati nella difficoltà di comunicazione causata dalla differenza etnica (e quindi di lingua madre) e nell'aspetto finanziario. Molti dei

pazienti che mostravano problemi a comunicare in lingua inglese praticavano anche un minor controllo dei parametri a confronto con i pazienti che erano fluenti nella lingua [35]. Un altro dei fattori indipendenti che portava ad un minor controllo era l'elevata spesa sostenuta personalmente per le strisce reagenti. È stato possibile anche verificare che in generale la percentuale di incidenza dei fattori sul monitoraggio variava in funzione del tipo di diabete riscontrato nei soggetti. Ad esempio, l'aspetto linguistico è stato riscontrato maggiormente tra i soggetti affetti da diabete di tipo 2, mentre l'aspetto finanziario sia nel tipo 1, ma in correlazione bassa, sia nel tipo 2 [35]. Questo dimostrava già come fossero innumerevoli gli aspetti da valutare quando si prendevano in considerazione i problemi sociali (oltre che clinici) che ruotavano intorno ad una patologia così diffusa come il diabete.

Uno degli aspetti più critici nell'utilizzo di questo metodo è la mancanza di informazione continua; quindi, la mancata possibilità di ottenere informazioni anche in momenti della giornata in cui il paziente non sarebbe in grado o disposto a svolgere un test. Un monitoraggio continuo permette di implementare un profilo di variazione del glucosio dettagliato e di meglio visualizzare le escursioni di ipoglicemia ed iperglicemia che potrebbero portare ad una manifestazione cronica di questi episodi [46].

Nel 2001 è stato proposto uno studio da Boland E., et al. [46] che si è interrogato se il controllo tramite metodo SMBG su bambini, con frequenza come consigliato dalle guide, quindi prima dei pasti e prima di andare a dormire, fosse sufficiente per una corretta e completa gestione della malattia. Un controllo dei parametri costante ed efficiente è più difficile da ottenere sui bambini rispetto che sugli adulti. È stato infatti verificato da altri studi che i bambini possono andare incontro a molti più episodi di ipoglicemia [47]. Nell'esperimento è stato chiesto ai pazienti di portare un dispositivo di tipo CGM per tre giorni, i genitori invece si occupavano di effettuare le calibrazioni necessarie per il dispositivo tramite risultati ottenuti con il glucometro e di tenere traccia del cibo consumato, dell'esercizio fisico e di eventuali sintomi di ipoglicemia dei bambini. I risultati hanno confermato quanto insinuato nelle premesse dello studio, sono stati identificati dei profili di escursione del glucosio non predicibili tramite il dispositivo SMBG. È stato possibile visualizzare degli episodi di ipoglicemia notturna e di iperglicemia dopo i pasti durante la digestione (ipoglicemia postprandiale). Queste

osservazioni hanno degli importanti risvolti clinici, è stato verificato infatti che episodi di iperglicemia postprandiale ricoprono un ruolo importante nell'avanzamento di complicazioni vascolari [48].

Un'altra problematica che è apparsa nei bambini affetti da diabete è la paura degli aghi e le limitazioni nell'effettuare il corretto monitoraggio che ne derivavano. Lo studio svolto da Cemeroglu A.P. et al. nel 2014 analizzava la relazione tra la paura degli aghi e il controllo del glucosio in bambini e adolescenti con diabete di tipo 1 [49]. Alcuni dei risultati riscontrati sono stati: paura di fare il test tramite puntura rilevato nel 10% dei pazienti, i pazienti più piccoli sottoposti ad infusione continua sottocutanea di insulina hanno mostrato una maggiore paura nel cambiamento del sito di infusione dell'insulina rispetto ai soggetti che praticavano autonomamente le infusioni, è stata trovata una proporzionalità inversa tra la paura di svolgere il test e il numero di controlli giornalieri del glucosio. In generale i pazienti che presentavano paura delle iniezioni di insulina, paura nel cambiamento del metodo di iniezione e paura dell'automonitoraggio avevano valori di emoglobina glicata più alti rispetto ai pazienti che non manifestavano queste paure.

I problemi sopra indicati sono solamente alcuni dei limiti che presenta il metodo di automonitoraggio del glucosio attraverso ripetute punture quotidiane. Per risolvere molti degli aspetti critici legati a questa pratica, la tecnologia è venuta in aiuto proponendo i dispositivi di monitoraggio continuo, chiamati dispositivi CGM.

## **3.2 Monitoraggio continuo del glucosio**

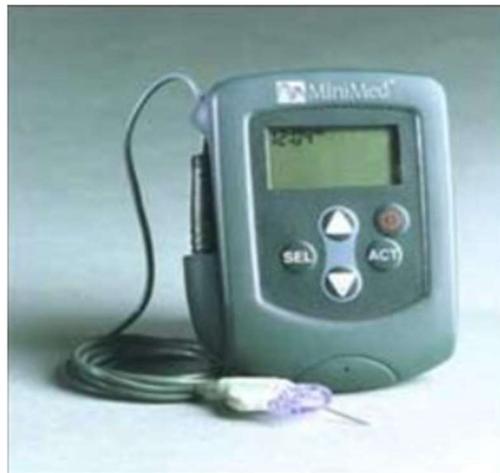
### *3.2.1 Introduzione ai dispositivi CGM e principio di funzionamento*

I dispositivi di tipo CGM (*continuous glucose monitoring*) consentono un monitoraggio semi-continuo (a distanza di brevissimi intervalli di tempo) del glucosio presente nel liquido interstiziale [50]; questo permette di indentificare fluttuazioni dei parametri che non sarebbero visibili con un automonitoraggio [46]. I valori di glucosio extracellulare sono in buona correlazione con i livelli di glucosio plasmatico, anche se nei casi di crescita o decrescita rapida dei livelli può esserci un discostamento momentaneo [51].

Nella guida dell'ADA (*American Diabetes Association*) per il 2021 viene specificato che la prescrizione di un dispositivo di tipo CGM deve essere

accompagnato da una robusta educazione, allenamento all'utilizzo e supporto medico per uno sfruttamento ottimale della strumentazione [51].

Il primo dispositivo continuo per il monitoraggio del glucosio approvato dalla *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* nel 1999 è stato sviluppato dalla MedTronic e si chiamava MiniMed. Questo sensore sfruttava la reazione di ossidazione del glucosio (la stessa su cui si basano i dispositivi SMBG) per misurare la concentrazione di glucosio extracellulare nel tessuto sottocutaneo tramite un elettrodo; era approvato per essere un dispositivo di tipo Holter; quindi, non mostrava i valori al paziente ma li potevano scaricare la clinica e i medici a cui il paziente si affidava [46].



**Figura 5 – Il CGM System Gold prodotto dalla MedTronic è il successore di MiniMed**

L'elettrodo era inserito nella punta di un ago molto sottile, il quale veniva posizionato nel tessuto sottocutaneo addominale del paziente [50].

Il principio di funzionamento di questo sensore si basa sul catabolismo del glucosio attraverso la sua ossidazione; questa reazione ha tra i prodotti il perossido di idrogeno, il quale è elettroattivo. La reazione di ossidazione del glucosio si riesce a riprodurre grazie alla mediazione dell'ossigeno, il consumo di ossigeno utile per creare nuovamente le basi per fare avvenire la reazione di ossidazione è ciò che viene realmente sentito dall'elettrodo. Si crea quindi una corrente elettrica proporzionale alla concentrazione di glucosio [52] che viene rilevata dall'elettrodo e viene poi trasmessa, attraverso un cavo, ad un dispositivo di elaborazione che analizza il segnale ogni 10 secondi e riporta i risultati ogni 5 minuti [46]. Il sensore veniva calibrato

periodicamente attraverso i risultati ottenuti con il metodo SMBG; quindi comunque richiedeva la necessità di effettuare prelievi di sangue tramite puntura.

Tutt'ora alcuni dispositivi continui hanno necessità di essere calibrati tramite i test svolti in autonomia con la puntura, questi vengono chiamati con il termine “aggiuntivi” mentre quelli che non ne necessitano sono chiamati “non aggiuntivi” [51].

I dispositivi invasivi moderni si basano anch'essi principalmente sull'impiego di un elettrodo inserito all'interno di un ago, che si è notevolmente ridotto di dimensione, sensibile a reazioni di ossido-riduzione mediate da enzimi che producono una corrente (sensori elettrochimici) [53]. Le innovazioni riguardanti i sistemi di tipo invasivo sono state principalmente riguardanti la trasmissione dei dati, che ora avviene via wireless, nei materiali impiegati e nella forma di utilizzo delle reazioni; infatti, si è cercato di trovare sempre dei principi reattivi più veloci su cui basarsi [52].

### *3.2.2 Aspetti positivi di un monitoraggio continuo dei parametri*

Si è iniziato ad indagare questo aspetto già all'inizio degli anni 2000, come presentato da alcuni studi nei paragrafi precedenti, ma l'utilizzo dei dispositivi CGM ha effettivamente preso piede solo decine di anni dopo e al giorno d'oggi ci sono ancora pazienti che non ne conoscono la pratica clinica e i benefici.

Uno studio svolto del 2012 ha analizzato la letteratura presente fino a quel momento sul confronto del metodo di monitoraggio continuo e del metodo SMBG, comprendente pazienti affetti sia da diabete di tipo 1 sia di tipo 2 e di diverse fasce di età, per verificare i risultati ottenuti riguardanti il controllo glicemico, la qualità della vita e anche aspetti secondari come le complicazioni, i costi e gli eventi avversi [50]. I risultati ottenuti utili per la trattazione della tesi sono i seguenti: è stato dimostrato un calo dell'emoglobina glicata dopo sei mesi dall'inizio dell'utilizzo del dispositivo CGM rispetto ai valori riscontrati nei pazienti che continuavano ad utilizzare un automonitoraggio tramite puntura, non sono stati mostrati rischi maggiori di sviluppare ipoglicemia o chetoacidosi<sup>1</sup> rispetto a quelli dimostrati con il metodo SMBG, un controllo con dispositivo continuo risulta particolarmente di aiuto nei bambini (per

---

<sup>1</sup> La chetoacidosi da diabete deriva da una diminuzione dei livelli di insulina circolante in relazione ad un incremento dei livelli di ormoni controregolatori. La risposta biologica a questo sbilanciamento può esprimersi con iperglicemia acuta, iperosmolarità, chetosi e acidosi [78].

ridurre principalmente il numero di punture), per persone con scarso monitoraggio dei parametri, nelle donne in gravidanza (se è stata verificata una necessità del controllo del glucosio per l'esito della gravidanza) e per pazienti con inconsapevolezza riguardo all'ipoglicemia e infine, forse il risultato più importante, che non ci fossero ancora sufficienti studi basati su soggetti con scarso controllo del glucosio per dare altri pareri clinici a beneficio di questo metodo [50].

Un aspetto da valutare riguardo alle innovazioni che riguardano il diabete, è che con gli anni i parametri per il corretto controllo della malattia si sono modificati.

Il test per l'emoglobina glicata stima (HbA1C) la media dei valori di glucosio di circa 3 mesi ed è consigliato svolgerlo da 2 a 4 volte all'anno in funzione del controllo glicemico che vuole raggiungere il paziente [54]. L'emoglobina glicata, che è sempre stata il valore di riferimento per la valutazione della concentrazione di glucosio sanguigno, si è rivelata non sufficientemente rappresentativa della situazione clinica dei pazienti [55]. Viene riportato infatti, dall'articolo precedentemente citato, che in generale questo valore non riflette le escursioni che portano ad ipoglicemia ed iperglicemia, non mostra la variabilità del glucosio come profilo giornaliero e inoltre il valore di HbA1c può essere falsato dalla condizione del paziente nel caso in cui si trovi in gravidanza o in una condizione medica di anemia o emoglobinopatia. Per questi motivi sono stati prodotti altri parametri su cui basare una migliore descrizione del quadro clinico, per implementare una gestione ottimale della malattia, da affiancare al test dell'emoglobina glicata. Questi nuovi valori su cui basarsi sono ad esempio il tempo passato in ipoglicemia, intervalli di valori in cui si è presentata l'ipoglicemia, frequenza degli episodi ipoglicemici e la variabilità glicemica; tutti questi parametri sono misurabili solo con un dispositivo continuo [55].

Ad oggi sono noti i benefici di questo metodo in adulti e bambini, sia che facciano uso di terapia dell'insulina attraverso auto-infusione, sia che siano muniti di una pompa per l'insulina. Questo è stato provato sia su persone affette da diabete di tipo 1 sia da persone affette dal tipo 2 (anche se i dati riguardanti il tipo 2 sono principalmente ricavati da studi svolti su adulti) [51].

Questo metodo risolve parzialmente anche il problema del dolore manifestato maggiormente dai bambini proveniente dalle ripetute punture giornaliere, che provocava una maggiore avversione verso il controllo dei parametri [49], pur

rimanendo una pratica affidabile ed informativa. È stato infatti provato che per bambini di età inferiore agli 8 anni il metodo *real-time* CGM permetteva di avere una migliore visione del profilo del glucosio. Mentre per bambini più piccoli non ha dimostrato avere un impatto sui miglioramenti del controllo del glucosio, ma è stato riscontrato dai genitori un elevato grado di soddisfazione e un uso continuativo del dispositivo, nonostante non portasse cambiamenti al controllo del glucosio [51].

Un altro punto a favore della tecnologia continua è la possibilità di poter impostare degli allarmi nel dispositivo che segnalano dei valori critici di glucosio; questo risulta molto importante nei casi in cui il paziente abbia degli episodi emergenziali durante la notte o nel caso di pazienti con poca consapevolezza e conoscenza degli episodi di iperglicemia [55].

### 3.2.3 *Classificazione dei dispositivi*

Lo studio svolto da Langendam M., et al. [50] considera due tipologie di sistemi di tipo CGM:

- Sistemi retrospettivi: viene misurata dal dispositivo la concentrazione di glucosio nell'arco di un certo intervallo di tempo; l'informazione viene salvata in un monitor e può essere scaricata consecutivamente, ma non è visibile dall'utente (dispositivo professionale detto anche mascherato);
- Sistemi in tempo reale (*Real-Time*): il sistema misura la concentrazione e la rende disponibile sempre per la visualizzazione su uno schermo.

Queste erano le uniche due tipologie di strumentazione di tipo CGM presenti sul mercato fino a circa il 2014.

Gli esperimenti considerati nello studio, per l'investigazione del metodo continuo e dei suoi benefici, caratterizzavano i risultati ottenuti dall'utilizzo di entrambi i tipi di sistemi in bambini, adolescenti e adulti. Il sistema di tipo retrospettivo non ha riscontrato molti benefici aggiuntivi nei valori misurati per quanto riguardava il confronto con l'automonitoraggio nei bambini; sempre in questa categoria anche i dispositivi di tipo continuo non hanno ottenuto valore aggiuntivo. Negli adolescenti invece erano presenti solo studi sui sistemi *real-time* e anche in questo caso non sono stati dimostrati forti miglioramenti nel metodo continuo rispetto a quello SMBG. Nella classe degli adulti gli unici risultati che avevano potuto differenziare i dispositivi

continui di tipo retrospettivo rispetto ai dispositivi di automonitoraggio erano quelli riguardanti la durata degli episodi ipoglicemici e iperglicemici; la durata degli episodi di ipoglicemia risultava minore nei soggetti che utilizzavano dispositivi CGM, mentre la durata degli episodi di iperglicemia era minore per i pazienti sottoposti ad automonitoraggio. Un risultato invece abbastanza significativo riguarda i sistemi real-time, in cui dopo un tempo di rilevazione di 12 mesi è stato possibile notare un decremento di emoglobina glicata maggiore nei soggetti che facevano uso di monitoraggio continuo; d'altro canto però è stato rilevato che il rischio di ipoglicemia acuta era aumentata nel gruppo che faceva uso di strumentazione CGM, rispetto al gruppo di controllo, nell'arco di 6 e 12 mesi, anche se il risultato non era statisticamente significativo.

Negli anni sono stati fatti molti altri studi e sperimentazioni per verificare i vantaggi di questo metodo rispetto all'automonitoraggio con puntura, grazie soprattutto alla spinta della comunità medica che ha iniziato a credere nel beneficio dell'innovazione e a fornire sempre più materiale per incentivare i pazienti.

Nel 2021 la classificazione dei dispositivi è stata fatta sulla base del fatto che la strumentazione fosse destinata ad un uso personale del paziente (ricadono in questa categoria i dispositivi di tipo *real-time* e a scansione intermittente) o se fosse destinata ad un uso non personale, in cui i risultati non sono visualizzabili dall'utente ma solo dalla clinica [51], detto CGM professionale o retrospettivo.

**Tabella 3 – Categorie di dispositivi CGM secondo l'ADA nel 2021 [51]**

Type of CGM	Description
Real-time CGM (rtCGM)	CGM systems that measure and display glucose levels continuously
Intermittently scanned CGM (isCGM)	CGM systems that measure glucose levels continuously but only display glucose values when swiped by a reader or a smartphone
Professional CGM	CGM devices that are placed on the patient in the provider's office (or with remote instruction) and worn for a discrete period of time (generally 7–14 days). Data may be blinded or visible to the person wearing the device. The data are used to assess glycemic patterns and trends. These devices are not fully owned by the patient—they are a clinic-based device, as opposed to the patient-owned rtCGM/isCGM devices.

Ad oggi i CGM retrospettivi (o ad uso professionale) possono essere in grado sia di comunicare direttamente l'informazione senza che l'utente lo veda, sia di poterlo visualizzare dal paziente stesso. In questo modo si offre la possibilità di avere un dispositivo di monitoraggio continuo anche a quelle persone che non possono avere un CGM personale (siccome rimane di proprietà dell'azienda sanitaria e a spese

dell'azienda) o che semplicemente preferiscono non visualizzare i risultati del test [51].

Uno studio pubblicato nel 2018 ha svolto un confronto tra i due metodi di monitoraggio ad uso personale, valutando sempre il metodo real-time (rtCGM), già presente sul mercato da molti anni, e una nuova tecnologia, proposta sul mercato nel 2014, un sistema a scansione intermittente (isCGM) chiamato anche monitoraggio *flash*. Questo tipo di sensore misura continuamente (ogni pochi minuti) il valore di glucosio extracellulare, ma i risultati sono disponibili solamente quando si scansiona il sensore attraverso un apposito dispositivo di visualizzazione. In questo modo si può vedere e scaricare i risultati dei test svolti nelle ultime  $n$  ore (in funzione delle specifiche del sensore  $n$  varierà) solamente quando si sincronizza il sensore con il lettore; se non si scannerizzano i risultati, essi vengono sovrascritti e non sono più recuperabili [55]. In questo articolo venivano riportati i risultati ottenuti dagli studi più recenti svolti su alcuni specifici dispositivi presenti sul mercato, due di tipo rtCGM (Dexcom G5 e Medtronic Enlite) e uno, effettivamente l'unico in commercio fino a quel momento, implementato con il metodo isCGM (Abbott Freestyle Libre Flash Glucose Monitoring System):

- Per quanto riguarda il sistema in tempo reale sono state riportate le evidenze cliniche riguardo al beneficio dell'utilizzo di questo metodo sia in bambini, sia in adulti con diabete di tipo 1. I risultati ottenuti sono stati: abbassamento del livello di HbA1C, diminuzione del tempo di durata degli episodi ipoglicemici e iperglicemici e riduzione della frequenza di casi di ipoglicemia. È stato anche suggerito come metodo di monitoraggio per tutte le donne in gravidanza sottoposte ad una terapia di insulina intensa. Viene riportato che i benefici dell'utilizzo di questo metodo sono stati dimostrati anche in pazienti affetti da diabete di tipo 2 che fanno uso di terapia di insulina;
- I sistemi a scansione intermittente hanno mostrato miglioramenti significativi riguardo agli episodi di ipoglicemia, negli intervalli di tempo passati in ipoglicemia, variabilità glicemica e soddisfazione dimostrata da pazienti affetti da diabete di tipo 1 e pazienti con diabete di tipo 2 sottoposti ad una forte terapia di insulina. Ciò che non è stato riscontrato è una

riduzione dei livelli di emoglobina glicata ed è stato sollevato un quesito sull'accuratezza dei dispositivi nei casi in cui si ricada nei range di ipoglicemia o iperglicemia.

In uno studio svolto da Reddy M., et al. è stato dimostrato che l'utilizzo dei metodi *real-time* riduce più efficacemente i periodi di ipoglicemia rispetto ai metodi a scansione intermittente; questo è stato provato in pazienti con diabete di tipo 1 con bassa consapevolezza degli episodi di ipoglicemia [56]. Inoltre, per adesso, i sistemi isCGM non prevedono la possibilità di avere degli allarmi che comunicano la presenza di un valore fuori dal normale *range* accettato di glicemia e neanche la possibilità di essere integrati con altri sistemi come una pompa infusiva di insulina.

Nella guida dell'ADA [51] viene riportato che se usato correttamente un dispositivo di monitoraggio *real-time* (accompagnato dall'uso di una terapia consistente a base di insulina) permette di abbassare, o mantenere, i livelli di HbA1C e di ridurre l'ipoglicemia riscontrata in adulti e giovani. Riguardo ai dispositivi a scansione intermittente (sempre utilizzati in tandem alla terapia di insulina) viene riportata la possibilità di ridurre i livelli di emoglobina glicata e di ipoglicemia in adulti e bambini anche se le evidenze scientifiche sono minori essendo una tipologia più nuova rispetto al metodo di monitoraggio in tempo reale.

**Tabella 4 – Caratteristiche ottenute dallo studio di alcuni dispositivi di tipo rtCGM e isCGM [55]**

Feature	isCGM	rtCGM
Indicated wear life	14 days (in EU) 10 days (in US)	6 days (Medtronic) 7 days (Dexcom)
Calibration	No	2x/day
Allows optional calibration	No	Yes
Immediate access to glucose values	Only when scanned	Button push
Trend arrows	Yes	Yes
Alerts/alarms	No	Yes
Insulin dosing without confirmatory fingerstick testing	No (in EU) Yes (in US)	No (Medtronic) Yes (Dexcom)
Real-time remote monitoring (sharing)	No	Yes
Direct integration with insulin pump	No	Yes
Applicable for closed-loop systems	No	Yes
Interoperability with other devices	No	Yes

### 3.2.4 *Approccio alla tecnologia e al mercato*

Esistono molti articoli su cui i clinici possono basarsi per indirizzare i pazienti nella scelta del dispositivo di monitoraggio continuo. In particolare, ogni anno l'ADA si occupa di rilasciare una guida medica con la raccolta di tutte le informazioni utili per quanto riguarda la tecnologia che ruota intorno alla gestione del diabete e le pratiche cliniche in uso. Le innovazioni tecnologiche, accompagnate dalla giusta conoscenza e controlli, possono migliorare la vita e la salute delle persone affette da diabete. Nonostante ciò, la complessità e la rapidità con cui la tecnologia si evolve può diventare una barriera (questo è ciò che si legge nell'incipit della guida dell'ADA [51]). Aggiungo personalmente che la barriera si innalza se non vengono forniti i giusti strumenti di informazione per comprendere le nuove scoperte tecnologiche e per investigare i benefici che ne derivano.

L'utilizzo della tecnologia deve essere valutato sul singolo individuo, non esiste un approccio che vada bene per tutti i soggetti. La scelta dei dispositivi deve essere tarata sui bisogni del paziente, sulle sue capacità e sulla disponibilità dei prodotti [51].

Le case produttrici solitamente forniscono anche delle guide online e scritte da poter consultare e anche dei video in cui viene spiegata la pratica di utilizzo. Ad oggi le aziende principali coinvolte nel mercato dei dispositivi CGM sono Medtronic, Dexcom e Abbott [52].

Nonostante ci siano moltissime variabili da considerare quando un team medico prescrive la tecnologia, la terapia e gli accorgimenti da far seguire al paziente per la gestione autonoma della malattia, esistono articoli che, avendo raccolto le informazioni necessarie riguardo alle varie tipologie di dispositivi, possono fornire dei binari tramite cui indirizzarsi per la scelta di ogni aspetto. Ad esempio, è stato pubblicato un articolo nel 2018 che riportava gli aspetti da valutare per la scelta tra un dispositivo di tipo rtCGM e isCGM, riuscendo, inoltre, ad indentificare quelli che potrebbero essere considerati dei "pazienti tipo" candidati per una tipologia piuttosto che per l'altra [55].

**Tabella 5 - Suggerimenti per la scelta della tipologia di paziente [55]**

rtCGM	isCGM
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pazienti trattati con terapia insulinica intensa (pompe e MDI)</li> <li>• Pazienti con elevato rischio di ipoglicemia               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ridotta consapevolezza dell'ipoglicemia</li> <li>○ Episodi notturni frequenti</li> <li>○ Episodi frequenti di ipoglicemia acuta</li> <li>○ Variabilità glicemica importante</li> </ul> </li> <li>• Pazienti con paura dell'ipoglicemia</li> <li>• Pazienti con uno stile di vita molto attivo e/o che sono athleticamente attivi</li> <li>• Pazienti che non riescono a raggiungere un controllo del glucosio adeguato con il metodo isCGM</li> <li>• Pazienti che desiderano un elevato controllo del glucosio</li> <li>• Pazienti giovani con T1D gestiti da un adulto</li> <li>• Pazienti che richiedono l'uso delle funzioni LGS e/o PLGS per ridurre gli episodi di ipoglicemia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pazienti ai quali è appena stato diagnosticato T2D per essere utilizzato come strumento educativo ad uso episodico</li> <li>• Pazienti con T2D non sottoposti a terapia insulinica con uso episodico a scopo educativo</li> <li>• Pazienti con T2D non sottoposti a terapia acuta di insulina, sono seguiti ottimamente e richiedono l'uso di isCGM per essere sostituito (anche solo periodicamente) al dispositivo SMBG</li> <li>• Pazienti con T1D o T2D sottoposti a trattamento con insulina che richiedono un monitoraggio senza allarmi e con la possibilità di passare al metodo rtCGM in futuro</li> <li>• Pazienti motivati a scansionare il proprio dispositivi diverse volte al giorno (pratica necessaria per il giusto controllo del glucosio)</li> <li>• Pazienti non a rischio di ipoglicemia ma che desiderano avere maggiori informazioni</li> <li>• Pazienti che non si possono permettere dispositivi rtCGM ma richiedono un controllo elevato del glucosio oppure nella cui nazione il metodo isCGM è preferito rispetto al rtCGM</li> </ul>

isCGM = dispositivi continui a scansione intermittente; LGS = funzione di mantenimento di valori bassi del glucosio sospesa; MDI = infusioni multiple giornaliere di insulina; PLGS = funzione di predizione di livelli bassi del glucosio sospesa; rtCGM = dispositivi continui con sistema tempo-reale; SMBG = automonitoraggio del glucosio sanguigno; T1D = diabete di tipo 1; T2D = diabete di tipo 2

Alcuni degli aspetti fondamentali da valutare per l'immissione sul mercato di un dispositivo continuo sono: sensibilità, specificità, selettività, linearità nell'intervallo di rilevanza biologica e la durata di vita del sensore. Le ricerche svolte per migliorare questi aspetti, insieme a quelle per produrre degli algoritmi di compensazione più affidabili, hanno prodotto gli standard delle performance a cui devono stare i dispositivi CGM di questi giorni [52]. L'indice di accuratezza utilizzato per i dispositivi è solitamente il MARD, *mean absolute relative difference* (media assoluta delle differenze relative dei valori); essa è calcolata come la percentuale della media degli errori tra ogni valore dato dal dispositivo CGM e il valore di riferimento [55] (solitamente quello di un laboratorio). La commercializzazione del dispositivo può avvenire se la media degli scarti è al massimo  $\pm 20\%$  sopra a tutti gli intervalli di valori del glucosio considerati biologicamente rilevanti [52]; questo valore è stato sicuramente uno degli aspetti principali su cui le compagnie hanno puntato per il miglioramento dei dispositivi.

Ciò su cui si è iniziato a puntare nell'ultimo decennio è l'intercomunicabilità tra i dispositivi: dal momento che è stato possibile creare dei collegamenti wireless per far avvenire gli scambi di dati, si è pensato a maggiori possibilità per collegare in modo intelligente le varie stazioni. Perciò si è passati al lettore di dati che si connetteva con il sensore, poi al telefono che poteva essere messo in comunicazione con il lettore ed infine alle reti di telemedicina che mettono in comunicazione i pazienti con gli istituti clinici. La direzione in cui il mercato e gli studi sperimentali guardano è senz'altro quella di poter creare un pancreas artificiale con l'interconnessione di un sensore efficace ed efficiente, di un dispositivo di elaborazione delle informazioni accurato e di una pompa per l'insulina programmabile dal sistema stesso [50].

### 3.2.5 Limiti del metodo CGM con ago

Alcuni degli aspetti negativi del metodo di monitoraggio continuo sono stati riportati nella revisione della letteratura di Langendam M., et al., che però essendo stata pubblicata nel 2012 porta l'esperienza di utilizzo di sistemi di monitoraggio abbastanza arretrati per una valutazione moderna. Gli aspetti critici nominati erano:

- Il tempo che intercorre tra la rilevazione del valore da parte del sensore e la fruibilità dell'informazione è maggiore rispetto al tempo richiesto nei dispositivi SMBG;
- La precisione dei dispositivi è variabile, erano ritenuti accettabili valori con deviazione inferiore al  $\pm 20\%$  del valore ritenuto vero (*gold-standard*);
- Siccome i sensori CGM necessitano di essere sostituiti ogni 5 giorni circa, le spese da sostenere sono più alte rispetto alla strumentazione per l'automonitoraggio.

Nuove valutazioni sui dispositivi hanno comunque confermato che questi tre aspetti possono essere migliorati, ma non eliminati. Riguardo al tempo di ritardo è stato anche dimostrato che bisogna considerare il tempo necessario al trasporto del glucosio dal sangue al liquido interstiziale. Questo ritardo potrebbe portare a problemi di affidabilità dei risultati nel caso in cui il paziente si trovi in una situazione di ipoglicemia [53].

È stata riscontrata la possibilità di riportare delle dermatiti da contatto con tutti i dispositivi moderni che devono essere attaccati alla pelle, questo potrebbe essere dato dagli allergeni presenti nell'adesivo utilizzato [51]. Una possibilità per gli individui con cute sensibile è quella di utilizzare un dispositivo impiantabile, ma in questo caso l'attenzione viene spostata sulla biocompatibilità del corpo estraneo inserito nell'organismo che potrebbe anch'essa provocare dei problemi [52]. È stato dimostrato anche l'effetto indesiderato di un possibile incapsulamento degli elettrodi impiantati, che porta ad una diminuzione dell'accuratezza delle misurazioni (e fastidio del paziente) [53], o anche di un distacco del sensore con conseguente perdita della trasmissione dei dati [55].

Riguardo alla trasmissione dei dati, viene riportata la necessità di segnalare al paziente che uno dei motivi per cui potrebbe presentarsi un'interruzione del segnale è

una forza pressoria acuta esercitata sul sensore. Questa forza pressoria si potrebbe manifestare ad esempio durante il sonno [55]; questo potrebbe diventare un grande problema nel caso di pazienti che siano maggiormente soggetti ad ipoglicemia notturna come è stato studiato nel caso dei bambini [46].

Uno degli aspetti negativi che porta avanti questo metodo è la necessità di effettuare comunque delle calibrazioni o delle misurazioni di conferma tramite metodo SMBG. La frequenza di queste calibrazioni varia in funzione al tipo di sensore di cui si fa uso; perciò, un utente che viene diagnosticato con questa patologia e a cui viene prescritto un metodo di monitoraggio continuo, deve essere istruito ad utilizzare sia il dispositivo CGM, sia a praticare un automonitoraggio dei parametri [51]. Al momento esistono solamente due dispositivi approvati dall’FDA che non necessitano di calibrazione o periodica conferma con i valori provenienti dall’automonitoraggio [51].

### 3.3 Alcuni dispositivi innovativi CGM di tipo invasivo

In questo sotto capitolo verranno presentati tre dispositivi invasivi di monitoraggio continuo del glucosio. Questa trattazione viene fatta a titolo di esempio per rappresentare l’innovazione tecnologica che ha accompagnato questo tipo di studi; i dispositivi sono stati ritenuti innovativi per i materiali impiegati, il grado di invasività e portabilità e inoltre la durata di vita.

#### 3.3.1 *FreeStyle Libre subcutaneous continuous glucose monitoring system*

Questo dispositivo è stato presentato dall’azienda Abbott e approvato nel 2016 dalla FDA per l’uso clinico professionale (in cui i dati non erano visibili al paziente) e nel 2017 per uso personale [57], è un dispositivo di tipo flash (isCGM) [58].



**Figura 6 – Kit sensore e lettore fornito dalla Abbott**



**Figura 7 – Sensore indossato e lettore**

Il dispositivo è formato da un piccolo sensore (circa 2 cm di diametro) che viene posizionato sopra alla cute e da un lettore che scansiona i risultati quando posto ad una distanza consona dal sensore (1-4 cm) [59]. Il sensore può essere utilizzato fino a 10 giorni consecutivi nel caso della versione personale e fino a 14 giorni nella versione professionale ed è applicato nel retro dal braccio del paziente [57].

La misurazione viene eseguita grazie al sensore sottocutaneo (di tipo ad ago) sensibile alla reazione enzimatica del glucosio, questo permette di determinare i valori glicemici nel liquido interstiziale. Le rilevazioni avvengono ogni minuto ma il salvataggio delle informazioni nel dispositivo avviene ad intervalli di 15 minuti [57]. Per scansionare i dati sul dispositivo di lettura è necessario avvicinare il lettore al sensore, sono poi disponibili per la visualizzazione i dati ottenuti nelle 8 ore precedenti. Vengono visualizzati i dati relativi al livello di glucosio, un grafico che mostra il profilo di tendenza e una freccia di tendenza [57].

Il dispositivo non era stato approvato nei pazienti con età inferiore ai 18 anni, per donne in gravidanza o per pazienti sottoposti a dialisi o malati gravi [57].

Questo dispositivo è stato il primo approvato dall'FDA a non necessitare di calibrazioni da parte dei pazienti, la calibrazione, infatti, viene fatta dall'azienda prima che il dispositivo venga commercializzato [57] [60]; questo aspetto può sicuramente essere ritenuto un vantaggio per il risparmio di materiale monouso e anche dolore da parte del paziente ma in alcuni casi è stato ritenuto un limite [59].

Sono stati evidenziati diversi aspetti positivi per la versione professionale del dispositivo ma non verranno riportati in quanto l'interesse della tesi verte sui dispositivi ad uso personale. Uno dei vantaggi di questa strumentazione rispetto ad altri dispositivi CGM è che non necessita di autorizzazioni tramite distributori specializzati per la vendita ma è disponibile nelle farmacie [57]. A differenza dei dispositivi proposti da Dexcom e Medtronic, il FreeStyle Libre non dà livelli del glucosio falsamente elevati nel caso di assunzione di acetaminofene (paracetamolo) da parte del paziente [57].

Una delle mancanze attribuite al sensore, però, è stata quella di presentare una perdita di accuratezza maggiore rispetto ai precedenti dispositivi CGM approvati nei range di misurazione bassi del glucosio. Un'altra mancanza è quella dell'impossibilità

di impostare un allarme per segnalare valori troppo elevati o troppo bassi di glucosio. È stato dimostrato in uno studio, che questo aspetto è risultato addizionale nella decisione dei soggetti partecipanti alla dismissione di utilizzo del dispositivo per paura di andare in contro ad ipoglicemia [58]. Questo dispositivo CGM non presenta neanche la possibilità di condividere i dati con altri dispositivi non essendo provvisto di un'applicazione mobile con cui poter interfacciare il lettore [57]. D'altro canto, però, è stata riportata anche la preferenza di alcuni soggetti a cambiare il proprio dispositivo con quello a modalità isCGM proposta da Abbott perché trovavano fastidiosi gli allarmi presenti sugli altri dispositivi e opprimente la continua disponibilità di visualizzare i valori di glucosio [58].

### 3.3.2 Biosensore per il glucosio ad ago basato su nanofibre

Una ricerca svolta nel 2017 ha sviluppato un sensore ad invasività minima capace di monitorare continuamente il glucosio sottocutaneo [61]. Il sensore è realizzato con nanofibre conduttive polimeriche di polianilina (PANI) ottenute per elettropolimerizzazione, utilizzate come materiale immobilizzatore per gli enzimi (GOx) e ricoperto poi da un doppio strato protettivo di poliuretano/poliuretano rinforzato con resina epossidica. Fino alla pubblicazione dello studio, il sensore era stato testato *in vivo* solo su topi, ma i risultati hanno dimostrato che il sensore poteva essere impiegato come dispositivo impiantabile di tipo invasivo nelle persone, in futuro.

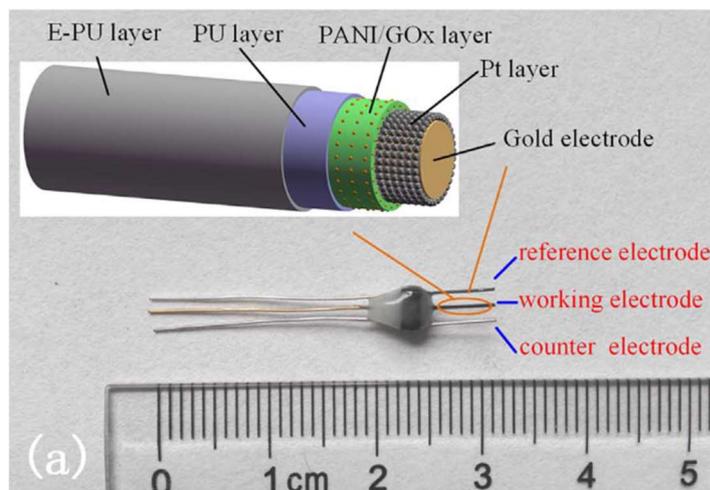


Figura 8 – Schematizzazione del biosensore [61]

L'elettrodo sensibile al glucosio (sensore di tipo ad ago) è formato da quattro strati come è visibile in figura 8: uno strato di platino elettrodepositato, uno strato di fibre PANI e glucosio ossidasi (GOx), uno strato di poliuretano (PU) e uno strato di poliuretano rinforzato con resina epossidica (E-PU). In questo studio è stata posta grande attenzione sull'importanza della membrana protettiva che ricopriva il sensore, considerando la durata della stabilità di questo strato come l'aspetto principale che determina la vita del sensore. Infatti, viene riportato che tutti i sensori impiantabili (che vengono in qualche modo a contatto con l'ambiente interno del corpo per un tempo prolungato) sono soggetti ad una risposta infiammatoria acuta che potrebbe danneggiare lo strato protettivo e rendere inaffidabile la stabilità del sensore. Se la risposta infiammatoria diventa poi cronica inizia un processo biologico che crea un incapsulamento fibroso del corpo estraneo nel tessuto a contatto con il sensore; questa resistenza potrebbe far scaturire delle reazioni metaboliche che altererebbero l'ambiente biologico circostante [61].

I principali materiali usati come rivestimenti nei sensori impiantabili sono stati i polimeri e le biomolecole. Le biomolecole (come collagene, chitosano, cellulosa ed eparina) si sono rivelate utili nella mitigazione della risposta avversa al corpo estraneo, con il problema di essere però biodegradabili ed in alcuni casi di sollecitare una risposta immunitaria; non sono quindi il giusto materiale candidato per la mancata stabilità. I polimeri sintetici, invece, come il poliuretano, l'acido polilattico o il politetrafluoretilene espanso si sono rivelati avere ottima stabilità chimica e meccanica, oltre ad essere particolarmente resistenti agli attacchi biologici [61]. Visto l'uso estensivo del PU, e dei suoi derivati (come membrane esterne di rivestimento) e considerata la sua biocompatibilità [61], si è utilizzato anche nel sensore descritto dallo studio.

Di seguito viene riportata una breve descrizione della fabbricazione dell'elettrodo (sensore elettrochimico) che si può trovare nell'articolo di Fang L., et al. in modo da chiarire maggiormente il compito di ogni strato. La parte più interna è formata dall'elettrodo di oro e ricoperto di platino per la trasmissione della corrente, un elettrofilatura di fibre PANI è poi stata depositata sopra al corpo dell'elettrodo e immersa in una soluzione enzimatica in modo da far assorbire gli enzimi alle fibre. In seguito, gli elettrodi di glucosio ossidasi (enzima che promuove la reazione di

ossidazione del glucosio) sono stati fissati con la gluteraldeide e cross-linkati per un periodo di 3 ore (questo permette la fissazione dell'enzima sull'elettrodo in modo da garantire stabilità a lungo termine [54]). È stato poi svolto 2-3 volte lo step di rivestimento dell'elettrodo con il poliuretano e infine è stato applicato per due volte lo strato di E-PU. Il sensore è stato poi assemblato utilizzando anche un contro-elettrodo di platino ed un elettrodo di riferimento di argento/cloruro di argento (Ag/AgCl), come si può vedere in figura 8.

Il sensore è stato testato *in vitro* in una soluzione di siero bovino stoccata a 37°C (per imitare la condizione biologica) e *in vivo* con l'impianto tramite chirurgia su dei ratti. Il test *in vitro* è durato 66 giorni con i seguenti risultati: il tempo di risposta è risultato di 50 s, la sensibilità del sensore ha avuto un continuo aumento per i primi 13 giorni per poi arrivare ad un valore stabile oltre al 120%, la stabilità del sensore è sembrata dipendere fortemente dalle variazioni di permeabilità della membrana esterna piuttosto che dalla porzione di proteine assorbite (che in altri esperimenti aveva impattato sulla sensibilità del sensore). Gli ottimi risultati ottenuti riguardo alla stabilità sono stati principalmente assegnati alla membrana esterna di E-PU che offre un'ottima biocompatibilità e allo strato di nanofibre PANI che crea un ambiente confortevole per preservare la reattività degli enzimi. I risultati ottenuti da entrambi gli esperimenti, *in vitro* e *in vivo*, sono stati ricavati stimolando i capi degli elettrodi con una tensione di 0,6 V.

Negli esperimenti *in vivo*, si è vista una risposta molto più lenta del sensore prima di essere stabile; questo è dato dall'innescarsi della risposta infiammatoria che fa sì che ci sia una maggiore deposizione di proteine sugli elettrodi. La concentrazione di glucosio misurata rispecchiava bene i risultati ottenuti da campioni di sangue ed è stato riscontrato un ritardo di 8 minuti nella visualizzazione dei corrispettivi valori. La stabilità del sensore *in vivo* è risultata affidabile e complessivamente è stato riscontrato che le performance degli elettrodi possono essere garantite per almeno 26 giorni.

Vista la stabilità ottenuta grazie ai miglioramenti apportati al sensore rispetto a studi precedentemente svolti, questo elettrodo a quattro strati per impianto transcutaneo potrebbe essere potenzialmente sviluppato per svolgere un monitoraggio continuo del glucosio sanguigno.

### 3.3.3 Eversense Continuous Glucose Monitoring System

Il sensore Eversense è un prodotto rilasciato dalla Senseonics, è stato approvato nel 2018 dalla FDA ed è il primo sensore per il monitoraggio continuo del glucosio con una vita garantita di 90 giorni [62]. Le seguenti informazioni sono state prese dall'articolo pubblicato da Sanchez P., et al. nel 2019 [62].

Il sensore è stato approvato per le persone con età  $\geq$  a 18 anni e ha dimostrato nei *trials* un ottimo valore del MARD (confrontato con i valori di glucosio ottenuti con gli esami da laboratorio) e buone *performance* per quanto riguarda le allerte di iperglicemia ed ipoglicemia.

L'elemento sensibile (sensore elettrochimico) viene impiantato con un breve intervento e permette di valutare il glucosio interstiziale tramite l'utilizzo di una tecnica a fluorescenza che si attiva ogni cinque minuti, quando il sensore viene sollecitato da un impulso a radiofrequenza. Il dispositivo si compone di un altro elemento che funge da lettore di valori e da trasmettitore, permettendo di inviare i dati al telefono cellulare del paziente (che deve essere munito dell'applicazione Eversense); questo dispositivo viene portato sopra alla pelle esattamente all'altezza del sensore ed è fissato tramite un adesivo. Il sensore è stato classificato come non aggiuntivo ma necessita di due calibrazioni al giorno per determinare la dose di insulina per la terapia, i risultati ottenuti tramite metodo SMBG devono essere caricati sull'applicazione.



**Figura 9 – Elemento sensibile, trasmettitore con adesivo forniti dalla Senseonics e dispositivo con applicazione su cui visualizzare i risultati**

Il profilo di sicurezza del sensore ha dimostrato essere molto promettente negli studi fatti per la commercializzazione, ci sono stati pochissimi eventi di irritazione della pelle, a causa della composizione chimica dell'adesivo utilizzato per posizionare il dispositivo trasmettitore, infezioni cutanee rare e solamente un episodio di rigetto del sensore che ha portato alla rimozione del dispositivo. Il sensore presenta anche la possibilità di impostare degli allarmi basati sui valori presenti e futuri (predetti tramite gli algoritmi di elaborazione presenti sul sensore), inoltre, il dispositivo di trasmissione vibra per avvertire il paziente di questi episodi.

La Senseonics ha creato un vero e proprio sistema, l'*Eversense Data Management System*, su cui vengono caricati i valori di glucosio ottenuti dal dispositivo e su cui il paziente può anche caricare informazioni riguardanti i pasti, il regime di esercizio e la terapia di insulina a cui è sottoposto.

Il primo studio svolto sull'esperienza personale di soggetti che utilizzavano il dispositivo quotidianamente è stato pubblicato nel 2019, in questo studio sono stati valutati molti parametri quantitativi per poter confrontare il dispositivo con quelli proposti fino a quel momento. I dati provenienti da una sperimentazione del genere forniscono una visione più realistica delle caratteristiche del sensore [62]. I valori più significativi ottenuti dalla sperimentazione per quanto riguarda i dati inerenti alle misurazioni di glucosio sono riassunti in tabella 6.

**Tabella 6 – Dati ottenuti dai primi 205 pazienti a provare Eversense, registrati per un tempo di 24 ore e durante la notte [62]**

<i>Glucometric</i>	<i>24-H time period, mean (SD), median (IQR)</i>		<i>Nighttime 00:00–06:00, mean (SD), median (IQR)</i>	
SG, mg/dL	161.8 (33.3),	157.2 (138.4–178.9)	161.8 (36.9),	155.2 (136.6–184.0)
SD, mg/dL	57.4 (14.8),	58.5 (46.8–69.8)	56.5 (16.4),	57.2 (45.0–69.5)
CV	0.35 (0.06),	0.35 (0.32–0.39)	0.35 (0.08),	0.35 (0.31–0.40)
GMI%	7.18 (0.80),	7.07 (6.62–7.59)	7.18 (0.88),	7.02 (6.58–7.71)
	<i>% SG, mean (SD), median (IQR)</i>		<i>Time in minutes 24-h time period</i>	<i>%SG, mean (SD), median (IQR)</i>
<54 mg/dL	1.2 (1.8),	0.6 (0.1–1.6)	18.0	1.7 (2.9), 0.6 (0.1–1.9)
54 to <70 mg/dL	2.9 (2.5),	2.3 (1.0–4.2)	41.8	3.0 (3.1), 2.3 (0.8–3.9)
<70 mg/dL	4.1 (4.1),	2.9 (1.2–5.7)	59.7	4.7 (5.5), 2.9 (1.0–5.8)
70–180 mg/dL (TIR)	62.3 (19.0),	63.3 (50.2–76.0)	897.7	61.8 (20.8), 61.9 (48.4–77.1)
>180 mg/dL	33.5 (20.3),	31.0 (17.9–45.1)	482.6	33.5 (22.0), 29.8 (16.3–47.5)
>180–250 mg/dL	21.9 (9.7),	22.6 (15.5–29.4)	315.8	21.5 (10.9), 22.2 (14.0–30.0)
>250 mg/dL	11.6 (12.8),	6.9 (2.2–16.5)	166.7	12.1 (14.5), 6.8 (1.8–16.9)

CV, coefficient of variation; GMI, glucose measurement index; IQR, interquartile range; SD, standard deviation; SG, sensor glucose TIR, time in range.

Ciò che è stato notato confrontando i risultati con quelli presentati per la commercializzazione, è che il MARD è risultato maggiore nella sperimentazione reale

(quotidiana); questo però non è un dato allarmante in quanto i controlli per la commercializzazione vengono svolti in un ambiente controllato mentre nello studio del 2019 i pazienti usavano il dispositivo nella propria vita quotidiana e inoltre i valori venivano confrontati con i valori provenienti dai dispositivi SMBG dei pazienti e non dai dati di laboratorio. I risultati riguardanti la portabilità del sensore sono stati i seguenti: 10 pazienti hanno riportato irritazione della cute, rossore e/o gonfiore dopo la procedura di inserimento o rimozione del sensore, 4 soggetti hanno avuto una piccola infezione nel sito di impianto, 5 hanno segnalato un'irritazione della cute dovuta all'adesivo/trasmittitore, nel caso di 4 pazienti è stata necessaria la rimozione del dispositivo. In due studi precedentemente svolti è stato possibile confermare tramite un questionario, che più dell'80% della popolazione partecipante era disposta a ripartire con l'uso di Eversense dopo il periodo di prova, confermando la versatilità e facilità di utilizzo del dispositivo [62].

Complessivamente, Eversense è stato valutato ottimamente da una porzione di popolazione che non è detto sia del tutto rappresentativa, per il basso numero di soggetti valutati, ha ottenuto performance del tutto valide anche dal punto di vista glucometrico e per questo è stato considerato come appropriato da Sanchez P., et al. per il miglioramento del controllo del glucosio.

## Capitolo 4

### METODI DI MONITORAGGIO NON INVASIVI E MINIMAMENTE INVASIVI

#### 4.1 Descrizione, tipologie e aspetti di interesse

Le tecniche a minor grado di invasività sono state fortemente implementate in questi anni; l'interesse suscitato dalla ricerca è dovuto all'elevata sensibilità presentata e al gradimento dei pazienti (nonostante la necessità in alcuni casi di eseguire un numero elevato di calibrazioni) [53]. Sono stati trovati altri liquidi biologici da cui poter ricavare la concentrazione di glucosio che fossero ben correlati con il plasma, in modo da diminuire sempre di più l'invasività dei sensori e promuovere l'importanza della continuità della rilevazione dei valori [60]. Rispetto alla saliva, al liquido lacrimale e al sudore, il livello di glucosio determinato dal liquido interstiziale (ISF) ha mostrato il maggior grado di correlazione con il glucosio sanguigno [60]. Le principali peculiarità del liquido interstiziale, oltre ad avere corrispondenza con il plasma per la misurazione della glicemia, sono le seguenti: è facilmente accessibile attraverso la cute (questo permette lo sviluppo di sensori minimamente invasivi) ed è in quantità elevata all'interno del nostro corpo (circa il 60% dei liquidi biologici del corpo è ISF) [60].

Le diverse tipologie, differenziate dai vari principi di funzionamento, sono principalmente le seguenti: sensori elettrochimici enzimatici e non-enzimatici (iontoforesi inversa), sensori ottici (risonanza plasmonica di superficie, spettroscopia visibile o quasi-infrarossa NIR, spettroscopia Raman, polarimetria, sonde foto-acustiche, metodi di fluorescenza) e sensori colorimetrici [53] [54].

La possibilità dei dispositivi di monitoraggio continui, di essere connessi con dei dispositivi wireless è stata fondamentale durante la recente pandemia di Covid-19. Uno studio svolto in Australia ha investigato il livello di gradimento del servizio di assistenza telematica per i pazienti affetti da diabete durante la pandemia, quindi impossibilitati a vedere fisicamente il proprio gruppo medico [31]. I soggetti valutati

erano pazienti con età compresa tra i 12 e i 16 anni diagnosticati con diabete di tipo 1 (già in cura presso la struttura studiata) e i loro genitori; i risultati dello studio sono stati ottenuti svolgendo delle interviste a distanza. I pazienti potevano condividere i dati scaricabili dai loro dispositivi CGM (*continuous glucose monitoring*) e dalle loro pompe per l'infusione dell'insulina e avevano a disposizione dei colloqui tramite telefonata o videochiamata con gli specialisti della struttura dedicati alla gestione del reparto a distanza. Uno degli aspetti emersi dai colloqui era lo stato di maggiore vulnerabilità in cui si sentivano i soggetti, essendo diagnosticati con diabete, nel caso in cui avessero contratto il Covid-19; questa era la principale causa personale di annullamento delle visite fisiche, oltre alle restrizioni imposte dallo Stato. In generale l'assistenza telematica si è rivelata gradita dai pazienti e dai genitori, confermando le grandi potenzialità dei sensori CGM invasivi e della possibilità di interconnessione con altri dispositivi mobili in modo da poter facilmente trasmettere i dati [31].

Nonostante ciò, un aspetto negativo valutato (che porta in luce un altro punto a favore della ricerca per sensori mini-invasivi) era l'impossibilità di far controllare fisicamente ai medici il sito di inserimento del dispositivo CGM e altri parametri vitali legati alla gestione generale della malattia.

Un'altra peculiarità dei dispositivi continui non invasivi (o minimamente invasivi) è l'accesso più economico ad un monitoraggio solido dei parametri; questo è permesso dalla minor necessità di utilizzare materiale monouso. In generale, per il puro fatto di non essere invasivi, questi sensori permettono una maggiore accettazione da parte dei pazienti e quindi una migliore gestione della patologia [63].

## **4.2 Controllo del glucosio con liquidi alternativi**

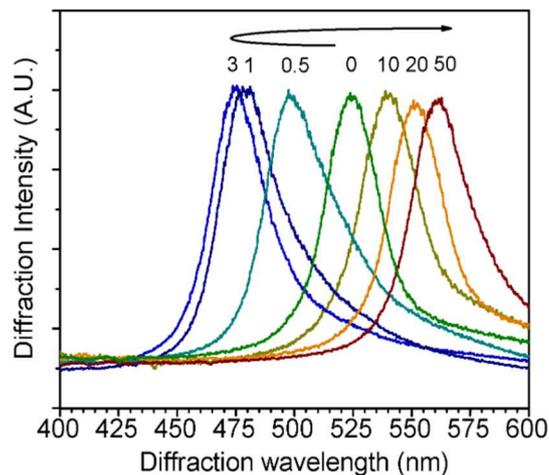
### *4.2.1 Glucosio dalle lacrime*

Le normali lenti a contatto sono in commercio ormai da anni, ma è solo recentemente che questo dispositivo personale è entrato a far parte anche del mondo del diabete. Negli ultimi 20 anni è infatti emersa la possibilità di misurare in modo continuo il glucosio presente nelle lacrime facendo uso di apposite lenti ingegnerizzate *ad hoc* [53]. Essendo a diretto contatto con l'occhio questo tipo di sensore deve soddisfare delle particolari caratteristiche: il materiale di cui devono essere fatte le lenti deve essere deformabile, confortevole e deve mantenere le sue proprietà

meccaniche per resistere ai movimenti dell'occhio, non devono ovviamente essere tossiche e devono permettere un certo scambio di ossigeno tra occhio e ambiente, così come devono permettere il passaggio del liquido lacrimale [53].

Sono stati proposti diversi principi per la rilevazione del glucosio, tra questi compaiono i classici, ma reinventati, sensori elettrochimici, oltre che a tecniche di cromatografia, spettrometria di massa, fluorescenza, spettroscopia Raman, ecc. [54] [64]. Uno dei limiti di queste proposte alternative è il metodo con cui fornire l'energia necessaria per il funzionamento dei sensori e per l'interconnessione con un dispositivo che ne permetta la fruibilità dei dati [54] e la necessità di utilizzare tecnologia di analisi precisa (e quindi costosa) e personale altamente specializzato [64]. Lo scoglio principale che deve superare questa tecnica è la bassa quantità di liquido lacrimale che non permette la copertura degli elettrodi; questo porta ad una minore accuratezza [53], inoltre è stato verificato che in generale la concentrazione lacrimale di glucosio ha una bassa correlazione con quella plasmatica [60], rispetto ad altri liquidi alternativi.

Una delle proposte alternative ai sensori elettrochimici è stata una lente permeabile ai gas con un *array* colloidale cristallino incorporato in una matrice di *hydrogel*. Questa lente permetteva di diffrangere selettivamente la luce compresa nello spettro visibile, in base alla concentrazione di glucosio con un conseguente cambiamento di colore tra un giallo rossastro, un verde e un blu [64].



**Figura 10 – Cambiamento di colore della lente in funzione della concentrazione di glucosio con relativa misurazione della lunghezza d'onda diffratta**

La combinazione con una normale lente a contatto rende il dispositivo altamente biocompatibile e portatile [64].

La tecnica colorimetrica si è rivelata una delle più papabili per lo sviluppo di dispositivi POC (*point of care*) grazie alla immediata comprensione delle informazioni e la mancata necessità di strumentazione professionale per l'analisi dei risultati.

#### 4.2.2 *Sensori salivari*

La saliva offre molte opportunità diagnostiche, il liquido salivare e i livelli di glucosio sanguigno sono stati trovati avere una buona correlazione intra-individuo; per questo negli ultimi anni ci sono state diverse ricerche per proporre un metodo realistico di misurazione utilizzando questo fluido alternativo [53]. Inoltre, è molto facile prelevare campioni di liquido salivare rispetto ai campioni di sangue, questo la rende una tecnica di monitoraggio potenzialmente adatta per bambini e anziani [54].

Però, un aspetto riscontrato in molti studi che hanno testato questo metodo, è l'elevata concentrazione di glucosio salivare rispetto ai valori di controllo (*gold standard*) di glicemia [65].

Il glucosio è una molecola piccola che può facilmente diffondere attraverso le membrane selettivamente permeabili; nei pazienti con diabete avviene un'alterazione della membrana basale dei vasi sanguigni che porta a un'incrementata diffusione del glucosio dal sangue alla saliva; questo potrebbe spiegare gli elevati valori di glucosio salivare in pazienti diabetici riscontrati in molti studi [65]. Un altro degli aspetti negativi da valutare è che sono presenti diverse impurità nel liquido salivare (date dal cibo e dalla digestione) che possono falsare la misurazione del glucosio [54].

Una delle proposte più interessanti è stata studiata da Arakawa T, et al. [66] in cui un elettrodo è posto su un supporto fatto di materiale odontoiatrico con una membrana enzimatica. Questo sensore è invisibile esternamente ed è integrato con un dispositivo *wireless* per la rilevazione dei dati. Una limitazione di questa tecnica proposta è che dispositivi ancorati esternamente ai denti possono risultare scomodi se indossati per lungo tempo e possono portare ad effetti negativi sui denti stessi [54].

Senza altro la tecnica enzimatica per misurare il glucosio attraverso la glucosio-ossidasi/perossidasi rimane anche in questo ambito uno dei metodi più utilizzati [65].

Altri studi sono necessari alla valutazione quantitativa (soprattutto in termini di sensibilità e specificità) di questa tecnica, per permettere di produrre ulteriori opinioni scientifiche [65].

#### 4.2.3 *Sensori indossabili e sudore*

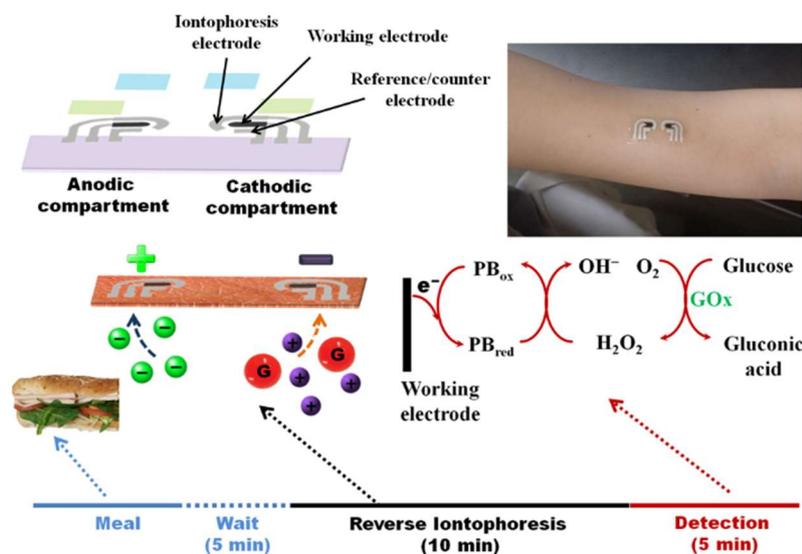
Ormai sono diversi anni che i sensori indossabili si sono fatti strada nei più svariati ambiti, dalla vita di tutti i giorni, allo sport, al mondo militare; questi sensori vengono tenuti a volte anche 24h su 24 dal soggetto che ne fa uso e sono in grado di monitorare tantissimi parametri fisiologici. Recentemente questi dispositivi sono stati approcciati anche alla determinazione di biomarcatori presenti nei liquidi biologici per sviluppare dei sensori non-invasivi [53].

Uno dei liquidi alternativi trovati per la misurazione del glucosio è il sudore; questo si sposerebbe bene con l'idea di sensori indossabili. Tuttavia, la concentrazione di glucosio calcolata dal sudore ha mostrato un basso coefficiente di correlazione con la concentrazione plasmatica; inoltre, il sudore non è sempre reperibile dal corpo, si presenta in determinate condizioni, questo quindi porta alla necessità di avere dei dispositivi (o delle condizioni esterne) che siano in grado di stimolare la sudorazione [60].

Il primo dispositivo a misurare il glucosio estratto dal sudore approvato dalla FDA fu il GlucoWatch G2 Biographer nel 2001; questo dispositivo utilizzava il principio della iontoforesi inversa e un elettrodo enzimatico per misurare la concentrazione della glicemia. Fu però tolto dal commercio a seguito di evidenze che riportavano irritazioni della cute e scarsa affidabilità [60]. La iontoforesi inversa si basa sulla somministrazione di una corrente grazie ad un anodo e ad un catodo; questa corrente causa una migrazione di ioni e di glucosio verso la superficie; il glucosio attratto verso il catodo è proporzionale alla sua concentrazione e alla corrente iontoforetica applicata [54]. Il problema di questa tecnica rimane l'irritazione provocata dall'applicazione prolungata di corrente iontoforetica sulla cute; un problema antagonista, allo stesso tempo, è che è richiesto un tempo minimo di somministrazione per raccogliere abbastanza glucosio per permettere la misurazione [54]. Inoltre, il sudore è un liquido soggetto ad una forte variabilità di composizione e risente di molti fattori interni (come variazioni nell'ambiente biologico farmaco-indotte) ed esterni che ne possono alterare

l'affidabilità, contribuendo anche ad una possibile deformazione del sensore indotta dalla superficie irregolare della pelle [54].

Una proposta alternativa ai sensori concettualmente simili al GlucoWatch è quella di sensori flessibili con circuiti elettrici, simili a delle specie di adesivi. Questi sensori hanno dimostrato grandi promesse in merito di biocompatibilità, flessibilità e rapporto costo-efficacia. Nonostante ciò, la necessità di prelevare sudore per far avvenire la misurazione (anch'essi si basano sulla iontoforesi) rimane un aspetto poco pratico che, al momento, ne limita le potenzialità [54]. Senza dubbio due aspetti che devono essere considerati nello sviluppo di questo tipo di tecnologia sono: il sensore deve avere proprietà meccaniche simili alla pelle e deve essere in grado di svolgere velocemente l'analisi delle molecole di interesse (in quanto il sudore evapora velocemente ed è molto facile che avvenga una contaminazione a contatto con l'ambiente esterno) [67].



**Figura 11 – Come appare il sensore proposto da Bandodkar A.J, et al. [79] e schematizzazione degli elettrodi per la iontoforesi e del principio di funzionamento**

Un altro limite dato dalla natura del liquido alternativo su cui si basano questi sensori, è la presenza di molteplici biomolecole attive nel sudore; ciò porta ad un evidente problema di selettività a cui devono fare capo questi sensori [67]. La selettività di questi sensori dipende fortemente dal tipo di enzimi utilizzati e anche dell'eventuale uso di membrane selettivamente permeabili [67]. Sono state proposte

diverse tecniche per aumentare la selettività, come ad esempio l'aggiunta di strati protettivi o l'utilizzo di una membrana nano-porosa selettivamente permeabile [67].

L'ingegnerizzazione di sensori elettrochimici inseriti nei tessuti è stata l'ultima innovazione aggiunta alla categoria di sensori indossabili elettrochimici, sommandosi ai già presenti orologi e adesivi flessibili. La peculiarità dei tessuti indossabili è che sono sempre a stretto contatto con la pelle (e quindi potenzialmente con il sudore) e sono già facilmente realizzabili industrialmente [67].

#### 4.2.4 *Monitoraggio dal liquido interstiziale nei sensori ottici*

Come detto in precedenza, i liquidi alternativi dell'organismo più valutati per la misurazione di molecole di interesse (presenti nel sangue) sono il sudore, le lacrime, la saliva e il liquido interstiziale. Grazie a diversi studi scientifici (tra cui quelli citati sopra) si è potuto verificare che, ad oggi, il liquido alternativo più affidabile per le misurazioni del glucosio è il liquido interstiziale [60].

Il liquido interstiziale è il fluido che riempie lo spazio intorno alle cellule, ai capillari linfatici e vascolari e permette il passaggio di molecole e nutrienti dai vasi sanguigni alla pelle [68].

L'accuratezza dei dispositivi basati su misurazioni del ISF ha grandi opportunità di miglioramento grazie alla calibrazione fatta attraverso parametri vitali e informazioni esterne aggiuntive; d'altro canto, però, è necessario valutare il tempo di ritardo dato dalla diffusione delle molecole dal plasma all' ISF che accompagna inevitabilmente le misurazioni [60].

I sensori ottici per la misurazione del glucosio basano il loro funzionamento sulla variazione di frequenza della luce; la luce interagisce in modo differente con le molecole di glucosio in funzione della concentrazione delle stesse; questo permette di legare la frequenza della lunghezza d'onda al livello di glucosio [53]. Le peculiarità dei sensori ottici sono molteplici: sono facilmente miniaturizzabili, sono realizzabili a costi bassi e non risentono di interferenze elettromagnetiche [53] (a differenza dei sensori elettrochimici). Alcune tecniche basate sulla tecnologia ottica su cui si stanno sviluppando diversi sensori di glucosio, sono le tecniche a fluorescenza, la spettroscopia infrarossa e la spettroscopia Raman [53].

La spettroscopia quasi-infrarossa (NIR *near-infrared radiation*) utilizza un raggio di luce appartenente alle frequenze quasi-infrarosse; quando la radiazione colpisce una molecola di pelle del paziente, essa rilascia energia producendo un campo magnetico oscillatorio. Il glucosio viene quindi misurato grazie alla spettroscopia NIR sfruttando la variazione di intensità nel raggio di luce trasmesso e riflesso dal tessuto [54]. Un'altra alternativa proposta, ma non ancora dimostrata, adatta per la commercializzazione, è la spettroscopia Raman; essa è stata testata in diversi tessuti e liquidi biologici come l'ISF e l'umor acqueo [54].

La tecnica foto-acustica si avvale di una luce prodotta da un laser e la corrispondente risposta acustica prodotta, misura quindi la variazione dell'onda pressoria dovuta all'assorbimento. Questo tipo di dispositivo ha riportato un'elevata sensibilità nei test *in vivo* grazie alla scarsa risposta fotoacustica dell'acqua, che permette l'individuazione di alcune molecole [54].

I sensori a fluorescenza, invece, si basano sulla generazione di luce fluorescente dalle molecole di glucosio quando vengono eccitate da particolari frequenze di luce; in questo modo l'intensità della luce prodotta è legata alla concentrazione di glucosio. Sono in atto diversi studi *in vivo* delle varie proposte fatte, ma al momento nessuna ha raggiunto l'approvazione per la commercializzazione [54].

#### 4.2.5 Sensori colorimetrici

L'utilizzo di sensori colorimetrici basati sul materiale cartaceo è ormai nelle nostre vite da moltissimo tempo (test di gravidanza) e si è rivelato particolarmente utile nella pandemia di Covid-19 con lo sviluppo di tamponi rapidi salivari e naso-faringei [33]. I sensori colorimetrici permettono un utilizzo autonomo con la chiara visualizzazione di un'informazione "Si" o "No" (come nei casi citati precedentemente) [33] o con un contenuto informativo più complesso da meglio interpretare con un dispositivo di quantificazione (come si vedrà in seguito con le proposte per il glucosio). Il principale vantaggio dei sensori colorimetrici come elemento di rivelazione è la facile identificazione dei risultati; la possibilità di vedere ad occhio nudo le variazioni sentite dal sensore ne ha creato l'interesse scientifico che ormai orbita attorno a questo tipo di sensore da qualche anno [68].

Se la trasduzione del segnale avviene grazie al principio ottico dell'assorbimento (quindi grazie alla quantificazione del cambiamento della lunghezza d'onda della luce) e l'informazione ricade nello spettro visibile della luce, si è in presenza di un sensore colorimetrico [69]. Un trasduttore ottico è in grado di convertire questa variazione in un segnale elettrico proporzionale alla concentrazione della molecola di interesse [70].

La maggior parte dei sensori colorimetrici per il monitoraggio del glucosio sviluppati al momento, sono basati principalmente sugli enzimi glucosio ossidasi (GOx) e perossidasi (POD) [68]; gli enzimi servono ad innescare la reazione di interesse per far avvenire la misurazione ma possono essere sfruttati in vario modo.

L'utilizzo di sensori colorimetrici permette di eliminare i problemi legati ai sensori elettrochimici come la necessità di numerose calibrazioni, le derive presenti nei segnali e i complessi circuiti elettrici da realizzare [67], nonché la necessità di una forma di energia per il funzionamento stesso del sensore.

Inoltre, un problema emerso dall'accoppiamento dei sensori con il corpo umano, è la struttura stessa del corpo e i materiali che fanno parte; l'accoppiamento di materiale rigido con i tessuti corporei ha spesso avuto come risultato quello di ottenere una minor qualità nella rilevazione dei segnali (o anche proprio di fallimento della rilevazione), a irritazione della cute e infiammazione [67]. L'utilizzo di biosensori iniettabili, perfettamente adattabili alla conformazione cutanea e studiati *ad hoc* per essere biocompatibili, risolve questo tipo di problema. L'epidermide offre, infatti, il vantaggio di essere facilmente accessibile e sufficientemente resistente per ospitare dei sensori sotto forma di tatuaggi [71], nonché di contenere il liquido principe per la rilevazione alternativa di molte molecole, l'ISF. L'accoppiamento della tecnica colorimetrica e dei biosensori iniettabili potrebbe essere un'ottima soluzione a molti problemi portati da altri tipi di sensori; per questo è il metodo di monitoraggio che la tesi propone come dispositivo continuo di maggior interesse per sviluppi futuri.

#### 4.2.6 Monitoraggio del glucosio attraverso l'urina

Il metodo più arcaico di determinazione del diabete avveniva attraverso l'urina e quindi risulta naturale la valutazione di questo liquido alternativo per il monitoraggio del glucosio. Tuttavia, questa tecnica presenta alcune difficoltà dal momento che viene proposta per un monitoraggio continuo dei parametri: non è possibile identificare

condizioni limite dei valori di glucosio (come ipoglicemia e principi di iperglicemia), in quanto il glucosio circolante viene riassorbito dai reni [54]. La condizione di glicosuria (che indica la presenza di glucosio nelle urine) viene evidenziata quando la soglia di riassorbimento dei reni è superata (circa  $>180$  mg/dl) [54]. Per questo motivo non esiste un'effettiva correlazione tra la condizione di glicosuria ed eventuali picchi significativi nella determinazione del glucosio; è comunque di utilità per la valutazione glicemica di pazienti con scarso livello di controllo e nella valutazione delle performance di alcuni farmaci [54].

Al momento la maggior parte dei sensori per urina sono di tipo colorimetrico e utilizzano principalmente metodi enzimatici e a reagenti cromogenici, ma è stata recentemente proposta anche un'alternativa basata sulla spettroscopia Raman [54].

## Capitolo 5

### TATUAGGI COME BIOSENSORI

#### 5.1 Biosensori

Un biosensore è un dispositivo di identificazione di un biomarcatore (molecola biologica di interesse), questa determinazione avviene in maniera selettiva e in breve tempo [69]. La IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) definisce un biosensore come “un dispositivo che utilizza specifiche reazioni biochimiche mediate da enzimi, dal sistema immunitario, da tessuti, organelli o cellule intere, per rilevare la presenza di composti chimici, solitamente attraverso segnali elettrici, termici o ottici” [69].

Alcune molecole sono di forte interesse clinico perché sono in grado di identificare la presenza di una patologia e anche di monitorare il suo avanzamento; storicamente l'analisi di sostanze per l'identificazione di biomarcatori era svolta solamente in laboratori specializzati [69]. L'avanzamento tecnologico dei materiali, degli algoritmi di analisi e dell'elettronica ha permesso l'identificazione di molecole di interesse anche attraverso dispositivi portatili.

Negli ultimi anni sono stati studiati molti biosensori in grado di reagire con certi tipi di molecole nei vari fluidi biologici; sono state impiegate molte risorse per produrre dei biosensori interfacciabili con i tessuti biologici in grado di presentare selettività, sensibilità e stabilità adeguate [67]. I biosensori che si stanno sviluppando sono adatti a misurazioni *in situ*, in tempo continuo e che possono essere facilmente analizzate da dispositivi POC (*point of care*). Lo scopo principe di questi biosensori è quello di eliminare la necessità di strumentazione professionale e di un'equipe di persone altamente specializzate per compiere il riconoscimento di una certa molecola, quantificabile attraverso la reazione chimica biologica per cui sono progettati [67] [69]. Il riconoscimento dell'evento di interesse avviene tramite tecnica ottica, elettrochimica, termica e piezoelettrica [67]; in questa parte della tesi verrà trattata solamente la tecnica ottica.

Il biosensore è solitamente formato da tre componenti principali: un elemento sensibile primario bioriconoscitore, un trasduttore e un processore con a seguito un amplificatore. Il bioriconoscitore individua la presenza della molecola di interesse, il trasduttore converte l'informazione in un segnale misurabile e il processore si occupa di analizzare il segnale [69]. Il biosensore deve essere quindi in grado di identificare i composti desiderati rispetto alla restante parte di molecole non specifiche; le prestazioni di un sensore di questo tipo si misurano in termini di sensibilità, selettività, limiti di rilevamento, intervallo di rilevamento, capacità di essere riutilizzato, ecc. [69].

I biosensori sono progettati in funzione della molecola di interesse e del tipo di meccanismo sfruttato per convertire l'informazione; in particolare, i biosensori marcati sfruttano un marcatore per individuare la molecola come, ad esempio, lo sfruttamento di enzimi, composti elettroattivi o fluorescenti [69]. L'utilizzo di questo tipo di dispositivi aiuta l'amplificazione del segnale e anche la selettività del sensore; d'altro canto, però, i costi associati e il tempo di rilevamento aumentano. I biosensori non marcati, invece, sono basati sull'utilizzo del solo bioriconoscitore; questo ha permesso di mantenere un design del sensore semplice che ne favorisce lo sviluppo portatile [69].

Alcuni dei bioriconoscitori più utilizzati sono [69]:

- Enzimi: sono dei catalizzatori biologici, i biosensori enzimatici convertono l'analita in un prodotto che può essere misurato attraverso un cambiamento di colore, di carica o di capacità;
- Anticorpi: come gli enzimi, anch'essi sono basati sulle proteine, sono in grado di evidenziare la presenza di una molecola di interesse grazie alla formazione di un complesso antigene-anticorpo. Questo immunocomplesso può essere monitorato grazie ad un sensore piezoelettrico, ottico o elettrochimico;
- Aptameri: sono acidi nucleici riproducibili sinteticamente, sono altamente selettivi e rispondono in modo amplificato a cambiamenti nel pH, nella temperatura e anche alla valenza ionica; per questo motivo sono spesso preferiti rispetto agli anticorpi.

I biosensori sono pensati per agire senza la necessità di calibrazioni. Questo li rende adatti anche a persone non particolarmente allenate all'utilizzo di questa tecnologia

[69]. La mancata necessità di calibrazioni deve essere giustificata da un errore nella generazione dei segnali sempre minimo [69], molte sono le ricerche in atto per migliorare gli algoritmi di quantificazione dell'informazione senza la necessità di ripetute calibrazioni.

## 5.2 Cenni sull'arte del tatuaggio

Il tatuaggio è una pratica di abbellimento del corpo che risale a migliaia di anni fa; questa forma d'arte è stata ritrovata come usanza in molte culture antiche provenienti da popoli di tutto il mondo: Greci, Cretesi, Celti, Giapponesi, Cinesi, Egiziani, Arabi, ecc. [71]. L'origine della parola deriva dal termine Tahitiano *ta tatau*, ovvero "appropriato, equilibrato e adatto"; la definizione fisica di tatuaggio, invece, è la seguente: "inserimento sottocutaneo di agenti coloranti progettati per lasciare un segno semipermanente o permanente" [72].

Il periodo storico che viviamo pone la pratica del tatuaggio come una consuetudine; ad oggi sono tantissime le persone che hanno almeno un tatuaggio sul loro corpo: attori, musicisti e atleti (ma anche persone comuni) sfoggiano i loro "pezzi d'arte" senza vergogna, rendendo visibile mondialmente ormai da decenni la normalità di questa pratica. Un sondaggio svolto nel 2018 ha cercato di calcolare, tramite la compilazione di un questionario, la percentuale di popolazione tatuata per 18 nazioni. Nonostante i numeri ottenuti dallo studio siano stati ritenuti abbastanza elevati rispetto ad altre indagini simili condotte, quello che è emerso è che il 38% della popolazione mondiale ha dichiarato di avere almeno un tatuaggio; la nazione che ha collezionato la percentuale più alta di persone tatuate è stata l'Italia con il 48%, seguita poi dalla Svezia e dagli USA [71].

Negli anni il suo significato e il ruolo sociale che ha ricoperto si sono evoluti con l'evoluzione della società stessa e degli stigmi che ne hanno caratterizzato i vari periodi storici. Ad oggi, le principali motivazioni per le quali una persona sceglie di farsi un tatuaggio sono le seguenti: come simbolo/rappresentazione di un evento passato importante, di un amore o un'amicizia, di un'appartenenza ad un gruppo o come simbolo di individualità [72].

Il tatuaggio, però, non ha solo un ruolo di abbellimento, ormai è consuetudine vedere anche tatuaggi per la comunicazione di una condizione medica importante. Questi simboli riuscirebbero a indentificare, in caso di incoscienza del soggetto, le patologie di cui l'individuo soffre, per agire con consapevolezza nel caso in cui sia necessario iniettare dei farmaci o si debba svolgere una rianimazione.



**Figura 12 – Tatuaggio rappresentante la presenza di un defibrillatore cardiaco interno**



**Figura 13 – Tatuaggio rappresentante la condizione di diabete di tipo 1**

Il grande aumento di persone inclini ad adornarsi il corpo (in modo momentaneamente doloroso) e l'impatto visivo e informativo che caratterizzano la pratica del tatuaggio, lo rendono un ottimo possibile mezzo di comunicazione per informazioni mediche. Il tatuaggio rende possibile lo sposalizio tra l'esteticità e la praticità di un metodo di monitoraggio, spesso ricercati dai pazienti e non sempre forniti dalle case produttrici. Questi sono solo alcuni dei motivi per i quali la tesi proposta ritiene particolarmente ottimistico il futuro delle ricerche in questo ambito.

### 5.3 Normative

Al momento non esiste una normativa unificata per l'Unione Europea che regola i vari tipi di prodotti chimici coinvolti nel mondo dei tatuaggi (permanenti e non), tantomeno a livello globale [71]. Ultimamente, però, ci sono stati dei movimenti provenienti da diverse organizzazioni europee per meglio regolare le sostanze utilizzate e garantire una maggiore sicurezza dei soggetti che si sottopongono alla pratica. Nel 2016 il Joint Research Centre (il servizio scientifico interno della Commissione Europea) ha pubblicato un documento riguardante la sicurezza dei tatuaggi, al momento è la fonte più completa per le informazioni scientifiche che

riguardano i tatuaggi e il make-up permanente (PMU) [71]. Ciò che è stato evidenziato mancare in questo documento, è una valutazione completa dei rischi nell'uso di alcune sostanze presenti nei tatuaggi/PMU; un'altra pedina mancante nella regolamentazione è una lista aggiornata di tutti i coloranti utilizzabili per le due pratiche e l'armonizzazione dei metodi analitici utilizzati per l'identificazione [71]. Alcune nazioni hanno provveduto a stilare degli elenchi di sostanze utilizzabili all'interno dei loro confini territoriali.

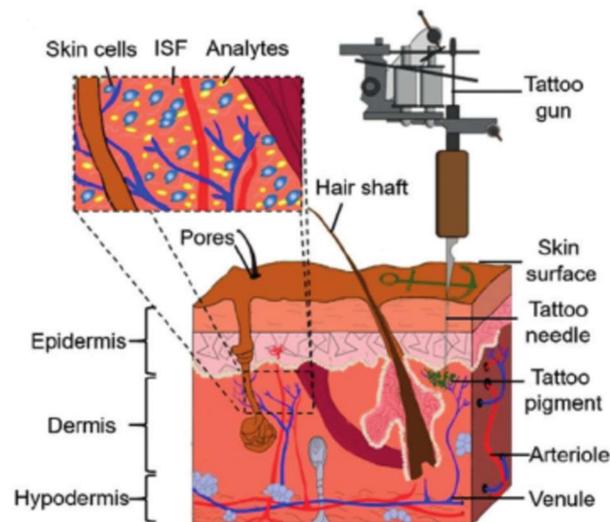
Ai sensi dell'aumento della sicurezza nella pratica del tatuaggio, è stata proposta una restrizione dal Comitato per l'analisi socioeconomica dell'Agenzia europea per le sostanze chimiche; questa proposta include i limiti di concentrazione per oltre 100 composti e anche per le singole sostanze (come alcuni coloranti azoici e ammine aromatiche cancerogene, metalli, ecc.). Con l'adozione di questa restrizione avverrà un'armonizzazione delle regole in Europa, garantendo una maggiore protezione dei cittadini europei e della pratica del tatuaggio, indipendentemente dalla nazione nella quale si andrà a svolgerla [73]. Le nuove regole saranno adottate dopo un periodo di transizione di durata 12 mesi, che consentirà l'adattamento alle nuove formulazioni da parte delle aziende fornitrici di prodotti per tatuaggi e make-up permanente. La restrizione, però, copre solamente tatuaggi decorativi, tradizionali, medici e il make-up permanente, lasciando fuori i tatuaggi temporanei e accidentali [71]. Ulteriore regolamentazione unificata è necessaria per rendere sempre più sicura e uniforme questa pratica di modificazione corporea.

#### **5.4 Qualche informazione sulla pratica del tatuaggio**

Le cellule maggiormente presenti nel derma sono: fibroblasti, macrofagi e adipociti, inoltre, questa porzione, ospita vasi sanguigni e linfatici e nervi [74]. Le cellule della pelle sono immerse in un liquido matriciale chiamato liquido extracellulare (ECF), del quale le maggiori componenti sono il plasma e il liquido interstiziale (ISF).

La prima macchina per tatuaggi è stata sviluppata da Thomas Edison nel 1877, il quale cercava in realtà di creare una penna elettrica [70].

Nella normale pratica del tatuaggio, avviene l'iniezione di un pigmento (dotato di un trasportatore come alcol etilico, acqua, glicole propilenico o glicerina) grazie ad una macchinetta dotata di un ago che oscilla con frequenza compresa tra gli 80 e i 150 Hz. A seguito dell'iniezione, il pigmento viene rilasciato nell'epidermide e nella parte superiore del derma, dove viene incorporato dalle cellule dei fibroblasti (questo permette al colore di rimanere stabile per decenni) [32].



**Figura 14 – Sezione della cute in cui è visibile la penetrazione dell'ago fino al derma superiore [74]**

La profondità di penetrazione dell'ago varia tra i 0.4 e i 2.2 mm; la profondità ottimale è circa quella di 2.0 mm, in quanto l'inchiostro troppo superficiale tende a svanire facilmente mentre la penetrazione profonda causa un danneggiamento del tessuto sottocutaneo [70]. Il posizionamento, l'inclinazione e la profondità con cui viene rilasciato il pigmento sono gestiti tramite la scelta dell'ago [70].

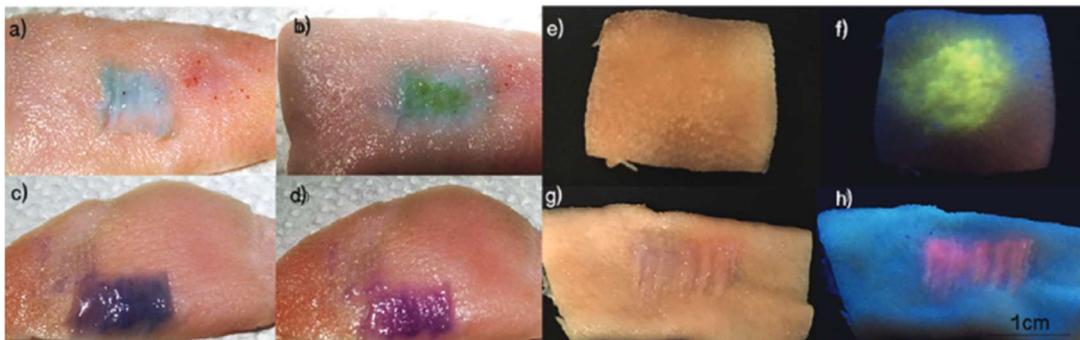
La generica composizione degli inchiostri convenzionali è descrivibile tramite una dispersione di molecole insolubili (pigmenti), all'interno di un composto liquido di additivi e solventi. Gli inchiostri adatti qualitativamente per l'utilizzo, sono quelli formati da particelle che non sedimentano troppo rapidamente e da solventi che non sono troppo volatili, ma le regolamentazioni quantitative sulla composizione dei tatuaggi sono molteplici e in continua modifica [70]. La caratterizzazione della grandezza delle particelle presenti nei bioinchiostri è fondamentale per l'utilizzo a scopi funzionali dei tatuaggi [70].

Ai giorni d'oggi i tatuaggi hanno trovato posto anche nella pratica medica, oltre che in quella decorativa. Si stanno infatti sviluppando tecniche per renderli dei biosensori non invasivi per il monitoraggio di sostanze chimiche di interesse [71]. È stato sperimentato da diversi studi che iniettare degli inchiostri ingegnerizzati come biosensori nell'epidermide, permette ai bioriconoscitori di reagire con le molecole di interesse, producendo un'informazione ottica. Idealmente i tatuaggi come biosensori potrebbero fornire un metodo minimamente invasivo, reversibile, biocompatibile, in tempo continuo e a lungo termine di monitoraggio, diagnosi e prevenzione di diverse patologie [70]. Al momento la principale barriera da superare è quella della biocompatibilità dei materiali utilizzati e della stabilità delle proprietà nel lungo periodo all'interno dell'ambiente biologico [71]. Nella prossima sezione, verranno riportate le evidenze scientifiche, disponibili al momento, riguardo all'utilizzo dei tatuaggi come biosensori.

### **5.5 Tatuaggi come biosensori: stato dell'arte**

Il progetto Dermal Abyss è stato forse il primo a proporre il corpo come strumento di determinazione interattivo per l'utilizzo di sensori colorimetrici. Lo studio propone una combinazione di tecniche di investigazione avanzate in ambito biotecnologico e pratica tradizionale del tatuaggio [32]. La proposta era quella di incorporare i principali scopi estetici e permanenti dei tatuaggi con la codificazione di informazioni tramite la sostituzione dei classici inchiostri tatuabili con biosensori che potessero verificare la concentrazione di alcuni ioni di interesse [32]. In particolare, nello studio svolto in collaborazione tra i ricercatori dell'MTI e i ricercatori dell'Università di Harvard, i biosensori erano progettati per misurare le variazioni delle concentrazioni del sodio, del glucosio e dell'idrogeno (pH). La peculiarità dei tatuaggi biosensibili è data dalla combinazione tra l'accessibilità che forniscono (pari a quella di un sensore impiantabile) e l'interazione con l'individuo (paragonabile a quella di un sensore indossabile) [32]. I vantaggi, che vengono evidenziati dagli studiosi, dell'utilizzo di biosensori colorimetrici rispetto a dispositivi elettronici sono i seguenti: non è necessario disporre di una fonte di energia elettrica, il sensore ha la stessa dimensione e peso di un normale tatuaggio, il biosensore è inserito direttamente sotto alla cute, questo lo rende isolato, inoltre, i movimenti della pelle non impediscono la rilevazione

del segnale [32]. Inoltre, come già ampiamente citato dalla tesi, il monitoraggio continuo dei parametri è diventato fondamentale per la corretta gestione di malattie croniche come il diabete; questo metodo, essendo per definizione permanente, è perfettamente in linea con la definizione di monitoraggio continuo. I biosensori studiati da Vega K., et al. [32] comprendevano due bioinchiostri fluorescenti, uno per il pH e uno per il sodio, e due sensori cromogenici, uno per il pH e uno per il glucosio (in seguito sarà riportata in dettaglio la preparazione del bioinchiostro per il glucosio). Inoltre, nello studio vengono anche testate diverse tecniche di iniezione (laterale e verticale) per verificare la visibilità degli inchiostri. I sensori sono stati testati con un metodo *ex vivo*, tatuando pelle di maiale tramite una tradizionale macchinetta per tatuaggi. Ciò che è stato provato è la effettiva risposta colorimetrica dei sensori, ad esempio il sensore cromogenico di pH variava il suo colore da rosso a viola passando da valori di pH acidi a basici (a pH = 2 il bioinchiostro era rosso, a pH = 7 era viola e a pH = 10 era blu).



**Figura 15 – (a) Bioinchiostro per il glucosio, (b) Bioinchiostro per il glucosio in presenza di una soluzione di glucosio 10 mmol/L, (c) e (d) Bioinchiostro per pH rispettivamente a pH 8.0 e 7.0, (e) e (f) Bioinchiostro fluorescente per il sodio rispettivamente sotto luce visibile e sotto luce UV, (g) e (h) Bioinchiostro fluorescente per il pH sotto luce visibile e sotto luce UV a pH = 8 [32].**

L'utilizzo della pelle di maiale è giustificato dal fatto che ha una percentuale di *agreement* del 78% con il modello umano e la composizione della cute è molto simile. La verifica, invece, sia tramite iniezione laterale, sia tramite iniezione verticale, trova significato nel fatto che l'iniezione laterale replica maggiormente la situazione di tatuaggi post-guarigione, mentre la tecnica verticale verifica la profondità di iniezione relazionata alla visibilità del biosensore [70].

Per il progetto Dermal Abyss i tatuaggi possono essere progettati per accogliere sia inchiostri tradizionali sia bioinchiostri (per accentuare la rilevazione di informazioni significative) e può avvenire l'accoppiamento con dei dispositivi mobili in grado di leggere i dati sottoforma di cambiamento di colore per quantificare le informazioni (provato dalla ricerca stessa utilizzando uno smartphone).

Un altro studio svolto da Yetisen A.K, et al. [74] ha sviluppato tre bioinchiostri per il monitoraggio del pH, del glucosio e dell'albumina, con lo stesso scopo del progetto Dermal Abyss: il monitoraggio di metaboliti nell'ISF con un metodo minimamente invasivo. Anche in questo caso la sperimentazione è stata svolta *ex vivo* e quantificata attraverso l'utilizzo di uno smartphone ed i risultati sono stati in linea con quanto aspettato. Tutti i biosensori hanno modificato la loro colorazione (identificabile in una variazione di lunghezza d'onda emessa compresa nello spettro visibile) in seguito al cambiamento di concentrazione dei metaboliti e hanno dimostrato una buona stabilità per un utilizzo di lunga durata [74]. In questo studio il sensore di pH era dato da una combinazione di tre componenti chimici, ciascuno dei quali aveva dimostrato una variazione di colore alla variazione di pH, risultando complessivamente in una variazione da arancio-rosso a blu, passando dal giallo e dal verde [74]. L'algoritmo di analisi sviluppato per l'utilizzo dello smartphone si è rivelato indicato per la quantificazione delle variazioni cromatiche in una condizione di luce standard; viene riportato anche che l'utilizzo di strisce di calibrazione potrebbe aiutare nell'analisi dei risultati nel caso in cui le fotografie venissero fatte in condizioni di eccessiva luminosità, ombra o saturazione [74].

Sono necessari ancora molti studi di cito-tossicità, biocompatibilità e stabilità *in vivo* [32] per provare definitivamente l'utilizzabilità di questa tecnica per la pratica clinica, ma i risultati fanno ben sperare. L'applicazione di biosensori potrebbe essere estesa alla determinazione di elettroliti, proteine, microorganismi patogenici, gas e stati di deidratazione [74].

Tra gli studi proposti i bioinchiostri per il glucosio non sono stati sviluppati come biosensori fluorescenti, ma sono diverse ad oggi le possibilità di sviluppare biosensori fluorescenti per altre molecole (come pH, sodio e potassio) [32] [75]. L'identificazione di queste sostanze deve però essere svolta con l'aiuto di una sorgente di eccitazione luminosa, oltre che con un dispositivo mobile, come visto nei precedenti casi [75].

Niente vieta di accoppiare in un tatuaggio informazioni ricavabili tramite inchiostro fluorescente o cromogenico differenziando le zone di attuazione (come svolto nel progetto Dermal Abyss).

In generale una nozione da tenere presente per lo sviluppo di nuovi biosensori, è che la permanenza dei tatuaggi nel derma è determinata dalla dimensione delle particelle dei pigmenti. I bioinchiostri dovrebbero riprodurre le caratteristiche degli inchiostri commercializzabili, avendo delle particelle al loro interno sufficientemente grandi per impedire la diffusione nell'area di iniezione, ma abbastanza piccole da non necessitare di chirurgia per il loro impianto [70]. Per quanto riguarda più nello specifico la produzione di biosensori per il glucosio, l'utilizzo di enzimi è limitante per l'ambito di reversibilità delle reazioni. La sostituzione degli enzimi con l'acido diborico permette un'adeguata reversibilità delle reazioni sensibili al glucosio [70].

#### 5.5.1 *Insieme dei parametri osservabili*

Come per i tatuaggi classici, è possibile svolgere con i biosensori dei disegni abbastanza complessi, rendendo possibile l'integrazione di diverse informazioni rilevate da composti differenti tatuati in aree distinte e facilmente individuabili. Ad esempio, nel progetto proposto da Vega K., et al. [32] il tatuaggio rendeva disponibili informazioni riguardo al pH, alla concentrazione di sodio e a quella di glucosio. Il pH è uno degli indici metabolici più importanti, ci dà informazioni sull'equilibrio acido-base e permette la determinazione di episodi di acidosi o alcalosi [32]. Il sodio invece è l'elettrolita più espresso all'interno dell'ambiente biologico e si occupa di regolare il volume di sangue e la pressione, la variazione della concentrazione di sodio dai normali *range* può essere fatale per l'individuo [32]. Il glucosio interstiziale invece, come già presentato dalla tesi in precedenza, è il marcatore che meglio rappresenta la concentrazione di glucosio sanguigno ed è di fondamentale importanza per la gestione del diabete. Lo studio svolto da Yetisen A.K, et al. proponeva il monitoraggio di pH, glucosio e albumina. L'importanza di due dei tre metaboliti è già stata espressa precedentemente; per quanto riguarda l'albumina: essa è una molecola particolarmente abbondante nel plasma, è infatti la proteina maggiormente espressa; viene prodotta dal fegato, ciò la rende un buon marcatore per la determinazione di un'eventuale insufficienza epatica.

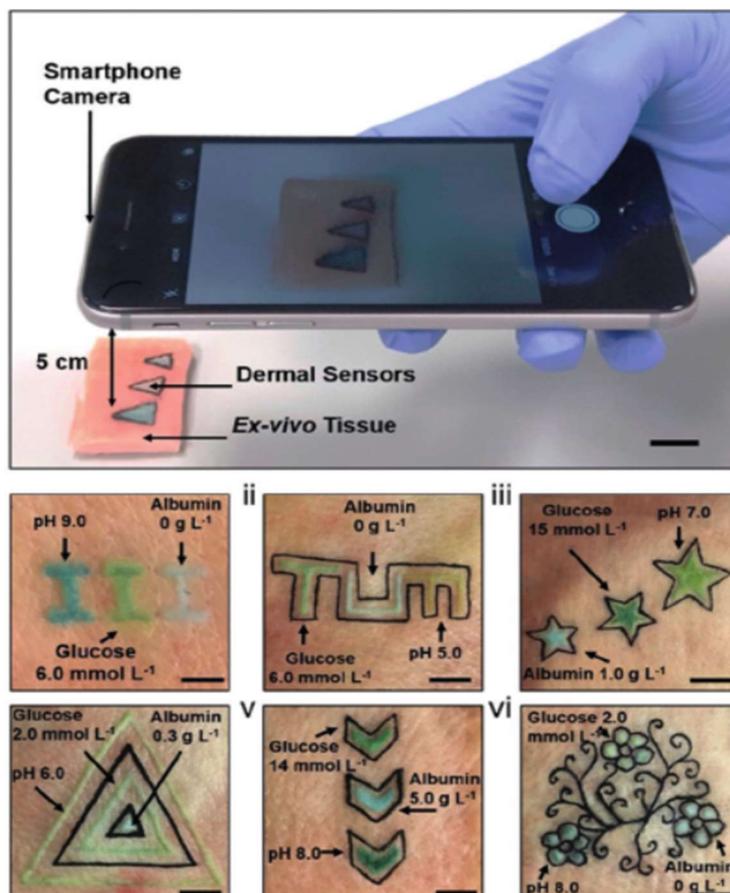


Figura 16 – Cattura dei biosensori tramite Smartphone e varie proposte di tatuaggi estetici in cui sono stati incorporati i biosensori per il pH, il glucosio e l'albumina [74]

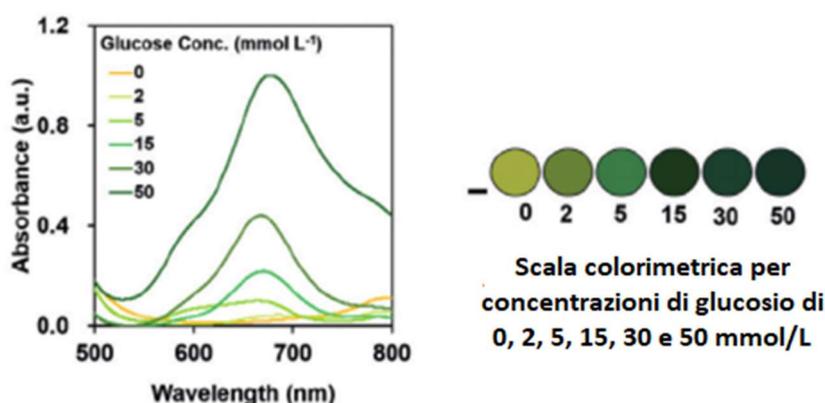
L'utilizzo di tatuaggi funzionali non è stato proposto solo in ambito di diagnosi/monitoraggio di alcune patologie, ma anche rilascio di farmaci e vaccini, oltre che di monitoraggio dei livelli di alcol ingerito, temperatura corporea, misurazioni inerenti all'elettrocardiogramma e addirittura nell'incorporazione di informazioni relative alla nostra identità [70].

### 5.5.2 Formulazione dei bioinchiostri per il glucosio

Di seguito è riportata solo la preparazione dei bioinchiostri utilizzati per la determinazione della concentrazione del glucosio, in quanto è la molecola di interesse per il monitoraggio del diabete (alcune informazioni sugli altri inchiostri sono riportate nel sotto capitolo "Stato dell'arte"). Nello studio in cui è presentato il progetto Dermal Abyss [32], i biosensori per il glucosio sfruttano la stessa reazione enzimatica delle strisce reagenti. La reazione di cambiamento del colore avviene in seguito a due step;

grazie all'enzima glucosio ossidasi il glucosio nel liquido interstiziale subisce ossidazione, permettendo la riduzione dell'ossigeno in perossido di idrogeno. Il perossido di idrogeno, in presenza di ioduro di potassio, reagisce con l'enzima perossidasi risultando in una reazione di produzione dello ioduro che crea un segnale luminoso misurabile (legando indirettamente la presenza di ioduro alla concentrazione di glucosio) [32] [70].

Nel secondo studio proposto da Yetisen A.K, et al., il sensore di glucosio era ancora basato principalmente sugli enzimi glucosio ossidasi e perossidasi e sfruttava il metodo in due step precedentemente citato nell'articolo di Vega K., et al.



**Figura 17 – Spettro di assorbanza in soluzione acquosa compreso in un range di glucosio di 0-50mmol/L e rispettiva scala colorimetrica del biosensore catturata con smartphone [74]**

In figura 17 è mostrata la variazione di colorazione del biosensore in soluzione acquosa catturata con uno smartphone e le misurazioni quantitative ricavate. La quantificazione è stata svolta misurando a una determinata lunghezza d'onda un valore di assorbanza a cui far corrispondere la concentrazione di glucosio. Come si può vedere, il biosensore ha mostrato una variazione di colorazione da giallo a verde scuro variando la concentrazione da 0.0 a 50.0 mmol/L; il tempo di risposta misurato è stato di 30 s per una concentrazione di 5 mmol/L e anche questo tipo di biosensore ha dimostrato ottima stabilità anche dopo alcune ore nel test *ex vivo* a concentrazione costante. In generale tutti e tre i biosensori di questo studio hanno dimostrato reversibilità della colorazione in funzione della concentrazione del metabolita per i quali erano progettati [74].

## 5.6 Microneedles Patches

I microaghi sono entrati recentemente a fare parte della tecnologia minimamente invasiva per il monitoraggio continuo del glucosio. I microaghi sono effettivamente degli aghi di dimensioni microscopiche: l'altezza può variare tra i 25 e 2000 micrometri [60]. I microaghi, attaccati alla pelle, si sono rivelati confortevoli, non provocando dolore e la loro applicazione/rimozione può essere fatta direttamente dal paziente senza la necessità di recarsi in una clinica [60]. Le *patch* con sopra i microaghi permettono di misurare il glucosio presente nel liquido interstiziale attraverso gli aghi che rimangono continuamente a contatto con l'ISF; al momento esistono due aziende che stanno sviluppando questo tipo di tecnologia accoppiata a degli elettrodi enzimatici e stanno svolgendo e pubblicando i relativi studi per presentare le ottime prestazioni dei sensori [60].

Successivamente verrà descritto solamente lo studio svolto da He R., et al. [76] in quanto rientra nella classificazione di biosensore colorimetrico (per la determinazione di metaboliti nell'ISF); classe di sensori già evidenziata in precedenza per le molteplici peculiarità rispetto alle altre trattate dalla tesi.

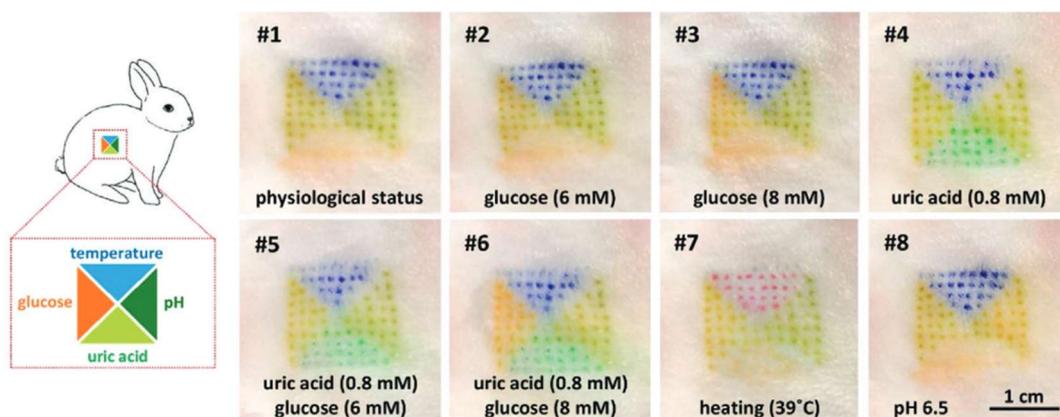
Le reazioni avverse ai materiali utilizzati per lo svolgimento dei tatuaggi sono diminuite fortemente con l'avvento della regolamentazione sull'utilizzo di materiale sterile e sui continui aggiornamenti delle liste di sostanze accettate; nonostante ciò, esiste ancora il rischio di avere delle reazioni avverse una volta concluso il tatuaggio a causa delle microlesioni provocate nella cute che possono aprire la strada ad infezioni se non correttamente curate [72]. Infatti, ogni volta che l'ago penetra nella cute crea delle microlesioni che attivano un processo infiammatorio, nel quale partecipano le cellule immunitarie nella riparazione dei tessuti danneggiati [70] e che potrebbe portare alla creazione di infezioni nel caso in cui l'organismo percepisse l'ingresso di sostanze non biocompatibili. Inoltre, persone affette da immunodeficienza sono maggiormente predisposte a contrarre gravi infezioni da tatuaggi e piercing [72]. Questo problema potrebbe essere risolto con l'utilizzo di microaghi solubili che rilasciano nel derma i biosensori minimizzando ancora di più l'invasività della pratica.

I microaghi forniscono un'alternativa allettante alla classica macchinetta per tatuaggi, permettendo iniezioni con profondità e inclinazione replicabile e garantendo la determinazione di molteplici metaboliti contemporaneamente [76]. Le patch di

microaghi, inoltre, permettono di minimizzare l'esposizione dei biosensori ad agenti esterni durante la realizzazione del tatuaggio, in quanto essi si trovano all'interno dei microaghi e vengono rilasciati quando le punte si trovano già dentro alla cute [76]. I microaghi sono sufficientemente lunghi da penetrare nello strato di derma per fare in modo che il contenuto reagisca con le molecole presenti nell'ISF, ma senza rischiare di danneggiare le strutture presenti più in profondità come vasi sanguigni e nervi [76]. Il materiale con cui sono realizzati è principalmente acido ialuronico (HA) per far sì che le punte dei microaghi si dissolvano con il tempo, rilasciando il loro contenuto (i biosensori) [76].

Nello studio svolto da He R., et al. i marcatori di interesse scelti sono stati: pH, glucosio, acido urico e temperatura corporea, sono quindi stati sviluppati quattro differenti bioinchiostri. Anche in questo caso i bioinchiostri hanno mostrato le variazioni di colore in relazione ai rispettivi cambiamenti delle sostanze a cui erano associati e la proposta di un'analisi quantitativa attraverso smartphones è stata avvallata [76]. Il sensore è stato testato *ex vivo*, ma anche *in vivo* per 4 giorni sulla pelle di conigli, ottenendo ottimi risultati.

La determinazione del glucosio avveniva convertendo il glucosio in acido gluconico attraverso la catalisi della glucosio-ossidasi, l'acido gluconico cambiava il pH della soluzione rendendo la misurazione possibile attraverso il biosensore per il pH [76].



**Figura 18 – Rappresentazione dello schema utilizzato per visualizzare contemporaneamente i quattro biosensori (sinistra) e alcune rilevazioni in diverse situazioni (destra)**

Il cambiamento di colore variava dal verde, in presenza di ipoglicemia, al giallo, per concentrazioni normali di glucosio, e infine tendeva al rosso per intervalli di iperglicemia; il cambiamento era facilmente visibile anche ad occhio nudo [76].

Non sono stati rilevati segni di tossicità risentiti dalla pelle dei conigli e l'infiammazione dell'area era trascurabile, confermando la biocompatibilità presentata dai biosensori [76]. Inoltre, il sensore è stato ritenuto stabile *in vivo* per una durata minima di 4 giorni, presentando variazioni di colore visibili sia ad occhio nudo, sia tramite la fotocamera di un telefono cellulare [76].

Due sono stati i fattori principali individuati per la variabilità della durata dei biosensori: la reversibilità delle reazioni per la rilevazione colorimetrica e il tempo che i bioinchiostri reagenti possono effettivamente rimanere nel derma mostrando delle variazioni chiare. Questi sono gli aspetti principali da investigare per studi futuri [76].

## 5.7 Utilizzo di Smartphones come dispositivi POC

L'implementazione della telemedicina si è rivelata fondamentale durante l'emergenza sanitaria dovuta alla diffusione del virus Covid-19; ha permesso a persone con diverse patologie di ricevere assistenza sanitaria a distanza proteggendole dalla trasmissione del virus, in quanto ritenute maggiormente vulnerabili [31]. Le restrizioni imposte hanno fortemente impattato sullo stile di vita di ogni individuo; questo è un aspetto fondamentale soprattutto per le persone affette da diabete che devono regolare la propria dose di insulina anche in funzione del regime alimentare e di allenamento. L'esperienza di giovani pazienti seguiti a distanza proposta da Parkinson A, et al. [31], ha evidenziato la necessità di avere una comunicazione dei risultati stabile con il proprio medico per prendere le giuste decisioni riguardo alle dosi di insulina. Inoltre, da questo genere di studi, si evince la necessità di sviluppo di una proposta di dispositivo in *closed-loop* (in catena chiusa) che permetta una maggiore assistenza al paziente nelle decisioni terapeutiche, quando gli specialisti sono impossibilitati a svolgere i controlli completi (o ad ogni modo per alleggerire il carico di visite necessarie sottoposto alle strutture cliniche). Vari sistemi *closed-loop* sono stati creati per rendere sempre più vicino l'avvento di un pancreas artificiale. In questo scenario il dispositivo di monitoraggio del glucosio crea la base di informazioni su cui processare i dati tramite algoritmi ottimizzati e su cui poi far basare la pompa di

insulina per dosare la terapia. Un sistema di interconnessione affidabile tra i dispositivi è fondamentale per lo sviluppo di questa tecnologia.

Queste implementazioni sono state senz'altro valutate maggiormente realizzabili con la crescente possibilità di far svolgere operazioni complesse agli smartphones.

Come evidenziato negli studi precedentemente citati sulla presentazione dei bioinchiostri, l'elemento di trasduzione del segnale può essere impersonato dallo smartphone. I trasduttori ottici sono in grado di identificare un cambiamento di fase, polarizzazione o frequenza nel campo ottico di un elemento di bioriconoscimento. I sensori ottici vengono classificati in funzione del meccanismo di trasduzione (assorbimento, fluorescenza o luminescenza). I trasduttori basati sull'assorbimento rilevano la variazione di ampiezza della luce in presenza di sostanze di interesse [69]. Ovviamente i biosensori colorimetrici forniscono un'informazione rilevabile ad occhio nudo, ma il cambiamento di ampiezza può essere quantificato e correlato con la concentrazione della molecola nella soluzione analizzata, dando una chiara informazione clinica. Grazie al miglioramento delle fotocamere dei telefoni è possibile sfruttare l'elevata risoluzione e la potenza di calcolo per effettuare una misurazione diretta dei cambiamenti risentiti dal biosensore colorimetrico [69]. La concentrazione dell'analita può essere ricavata sfruttando la legge di Lambert-Beer, dove la concentrazione è proporzionale al logaritmo del quoziente dell'intensità dell'onda elettromagnetica incidente e dell'onda magnetica riflessa (Equazione 1) [69].

$$\log I_0/I = \varepsilon C \Delta x$$

**Equazione 1 – Legge di Lambert-Beer:  $I_0$  = intensità dell'onda elettromagnetica incidente,  $I$  = intensità dell'onda elettromagnetica riflessa,  $\varepsilon$  = coefficiente di assorbimento molare del mezzo,  $C$  = concentrazione dell'analita e  $\Delta x$  = cambiamento del cammino ottico**

Un'applicazione apposita potrebbe essere l'interfaccia utilizzata per l'analisi e la memorizzazione dei dati [70], rendendo facile anche la condivisione dei dati con individui che dispongono della stessa applicazione.

Senza essere riportati nello specifico si nomina anche la possibilità di effettuare misurazioni del glucosio prelevato da altri liquidi alternativi come saliva, urina, ecc., sempre tramite l'utilizzo di smartphones, come anche l'accoppiamento con metodi

innovativi non riportati nella tesi (come metodi che utilizzano la stampa 3D, sagome polimeriche ed elettrodi serigrafati) [77].

## CONCLUSIONI

L'elaborato ha esaminato le tecniche di monitoraggio per la glicemia ai fini di gestione della malattia del diabete, partendo dalla descrizione del primo dispositivo POC per il controllo del glucosio fino ai metodi più innovativi studiati ai giorni d'oggi. Sono stati riportati alcuni dei vantaggi e svantaggi di ogni macrocategoria di dispositivo, evidenziando i limiti che ogni tecnologia porta con sé e proponendo un metodo innovativo che ne risolva, almeno in parte, gli svantaggi. Particolare enfasi è stata posta sull'utilizzo di dispositivi continui di monitoraggio del glucosio per ottimizzare la gestione autonoma della malattia.

Il metodo che la tesi ha proposto con maggiore interesse è quello dei sensori colorimetrici espressi sottoforma di tatuaggi. Questa tecnologia, formata da biosensori in grado di cambiare il proprio colore una volta iniettati nel liquido interstiziale, risolve molti dei problemi che caratterizzano i metodi CGM invasivi e non-invasivi che si basano su altri liquidi alternativi. Nonostante siano ancora necessari molti altri studi in merito, per i risultati ottenuti fino ad adesso e per le prospettive future a cui si dovrà guardare, i bioinchiostri si prestano a diventare un metodo di monitoraggio CGM a basso-costi. L'interconnessione tra dispositivi di analisi e applicazioni con cui immagazzinare e condividere i dati è possibile, la minima invasività per l'individuo è garantita e l'utilizzo frequente di dispositivi monouso è eliminato. In futuro sarà sicuramente necessario investigare maggiormente i campi della biocompatibilità, della selettività, della sensibilità e della comunicabilità.

La tecnica ha ovviamente anche degli svantaggi, come l'impossibilità di avere un'informazione immediata per le persone con problemi di vista o affette da daltonismo. L'interconnessione con un dispositivo elettronico capace di analizzare l'immagine catturata con una fotocamera e di "leggere" i risultati potrebbe essere una possibile soluzione. Inoltre, la tecnica di iniezione con classica macchinetta per tatuaggi non è utilizzabile su bambini ed anziani. Una soluzione potrebbe essere quella

di utilizzare le *patches* di microaghi che sono sostanzialmente non dolorose nell'applicazione e nel rilascio dei bioinchiostri.

In conclusione, nonostante la mancanza odierna di esaustive informazioni, la tecnica di controllo tramite bioinchiostri ha avuto ottimi risultati di stabilità e biocompatibilità, provandola meritevole di ulteriori approfondimenti per un'eventuale commercializzazione futura.

## REFERENZE

- [1] B.-P. S. Faglia, *Malattie del sistema endocrino e del metabolismo*, McGraw-Hill Education, 2013.
- [2] M. S. Makaryus A.N, «Diabetes insipidus: Diagnosis and treatment of a complex disease,» *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 2006.
- [3] J. B. W. Kerner, «Definition, Classification and Diagnosis of diabetes mellitus,» *German Diabetes Association: Clinical Practice Guidelines*, 2014.
- [4] A. D. Association, «Classification and diagnosis of diabetes: Standard of Medical Care in Diabetes,» *Diabetes Care*, 2021.
- [5] S. K. H. d. R. F. O. M. Cho, «IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045,» *Elsevier*, 2018.
- [6] K. K. D. J. Chatterjee S., «Type 2 Diabetes,» *The Lancet*, 2017.
- [7] H. L. S. M. e. a. Pal K, «Time trends in the incidence of clinically diagnosed type 2 diabetes and pre-diabetes in the UK 2009-2018: A retrospective cohort study,» *BMJ*, 2021.
- [8] H. C. R. W. e. a. Tabak A.G, «Prediabetes: A high-risk state for diabetes development,» *Lancet*, 2012.
- [9] P. K. B. D. e. a. Moran A, «ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Management of cystic fibrosis-related diabetes in children and adolescents,» *Pediatric Diabetes*, 2018.
- [10] B. B. L. J. Shivaswamy V, «Post-transplant diabetes mellitus: causes, treatment and impact on outcomes,» *Endocr Rev*, 2016.

- [11] W. L. H. M. e. a. Hecking M, «Novel views on new-onset diabetes after transplantation: development, prevention and treatment,» *Nephrol Dial Transplant*, 2013 .
- [12] U. P. D. S. Group, «Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes,» *Lancet*, 1998.
- [13] E. G. Atkinson M.A, «Type 1A diabetes: new perspective on disease pathogenesis and treatment,» *Lancet* , 2001.
- [14] K. M. V. R. e. a.-. Hermann R, «Temporal changes in the frequencies of HLA genotypes in patients with type 1 diabetes-- Indication of an increased environmental pressure?,» *Diabetologia*, 2003.
- [15] M. A. P. A. Merlotti C, «Prevention of type 2 diabetes; a systematic review and meta-analysis of different intervention strategies,» *John Wiley & Sons Ltd*, 2014.
- [16] L. E. E. G. e. a. Devasenan D., «Type 1 diabetes: recent developments,» *BMJ*, 2004.
- [17] G. K. M., «Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention,» *CMA Media Inc.*, 2006.
- [18] B. P. E. C. e. a. Gake E.A, «European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before onset of type 1 diabetes,» *Lancet*, 2004.
- [19] «Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study Group: Effect of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus,» *N Engl J Med*, 2002.
- [20] K. J. W. J. e. a. Skyler J.S, «Effect of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: the Diabetes Prevention Trial-Type 1,» *Diabetes Care*, 2005.
- [21] B. A. G.-P. G. e. a. Orozco L.J, «Exercise or exercise and diet for preventing type 2 diabetes mellitus,» *Cochrane Database* , 2008.

- [22] B. L. Z. J. Carey M, «Impact of hypoglycaemia in hospitalized patients,» *Curr Diab Rep*, 2013.
- [23] J. T. R. A. e. a. Clarke W, «Assesment and management of hypoglycemia in children and adolescent with diabetes,» *Pediatric Diabetes*, 2008.
- [24] M. M. K. I. S. P. Pratiwi C, «The risk factor of inpatient hypoglycaemia: A systematic review,» *Elsevier Ltd*, 2020.
- [25] H. N. S. H. e. a. Kubiak T, «Assessment of hypoglycaemia awareness using continuous glucose monitoring,» *Diabetic Medicine*, 2004.
- [26] B. Matsuda, «The effectiveness of continuous subcutaneous insulin pumps with continuous glucose monitoring in outpatient asolescents with type 1 diabetes: A systematic review,» *JBI Library of Systematic Reviews*.
- [27] J. D. R. F. -. C. G. M. S. Gruop, «Factors Predictive of Use and of Benefit From Continuous Glucose Monitoring in Type 1 Diabetes,» *American Diabetes Association*, 2009.
- [28] M. I. Harris, «Frequency of Blood Glucose Monitoring in Relation to Glycemic Control in Patients With Type 2 Diabetes,» *American Diabetes Association*, 2001.
- [29] K. L. B. R. e. a. Laffel L.M, «Effect of continuous glucose monitoring on glycemic control in adolescents and young adults with type 1 diabetes,» *Jama*, vol. American Medical Association, 2020.
- [30] K. L. R. M. e. a. Pratley R.E, «Effect of continuous Glucose monitoring on Hypoglycemia in older Adults with type 1 Diabetes,» *Jama*, vol. American Medical Assocation, 2020.
- [31] B.-S. N. H. D. S. e. a. Parkinson A, «Managing type 1 diabetes during the COVID-19 pandemic is a team effort: a qualitative study of the experiences of young people and their parents,» *Integrated Healthcare Journal*, 2021.

- [32] J. N. X. L. e. a. Vega K, «The Dermal Abyss: interfacing with the skin by tattooing biosensors,» *ISWC*, 2017.
- [33] K. T. O. K. Manmana Y, «Recent developments of point-of-care (POC) testing platform for biomolecules,» *Elsevier*, 2020.
- [34] C. M. G. D. L. G. Montagna M, «Overview on self-monitoring of blood glucose,» *Elsevier*, 2008.
- [35] A. L. F. A. e. a. Karter A.J, «Self-Monitoring of Blood Glucose Language and financials barriers in a managed care population with diabetes,» *Diabetes Care*, 2000.
- [36] B. E.M, «Self-Monitoring of Blood Glucose: The Basics,» *Clinical Diabetes*, 2002.
- [37] N. R. R. D. e. a. Evans J.M.M, «Frequency of blood glucose monitoring in relation to glycemic control: observational study with diabetes database,» *BMJ*, 1999.
- [38] S. J. Kirk J.K, «Self-Monitoring of Blood Glucose: Practical Aspects,» *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2010.
- [39] P. F. D. B. G. e. a. Franciosi M, «The impact of blood glucose self-monitoring on metabolic control and quality of life in type 2 diabetic patients,» *Diabetes Care*, 2001.
- [40] L. J. L. R. e. a. Tang Z, «Effects of hematocrit levels on glucose measurements with handheld meters for point of care testing,» *Arch Pathol Lab Med*, 2000.
- [41] S. K. M. M. e. a. Bamberg R, «Effect of adverse storage conditions on performance of glucometer test strips,» *Clin Lab Sci* , 2005.
- [42] H. T. S. E. e. a. Cunningham D.D, «Blood extraction from lancet wounds using vacuum combined with skin stretching,» *Appl Physiol*, 2002.

- [43] R. L. B. S. e. a. Pavithran A.A, «Comparison of Fingertip vs Palm Site Sampling on Pain Perception, and Variation in Capillary Blood Glucose Level among Patients with Diabetes Mellitus,» *J Caring Sci*, 2020.
- [44] T. E. K. N. e. a. Holstein A, «Blood glucose self-monitoring from abdominal skin: a precise and virtually pain-free method,» *Acta Diabetol* , 2002.
- [45] M. C. Z. F. e. a. Soumerai S.B, «Effect of health maintenance organization coverage of self-monitoring devices on diabetes self-care and glycemic control,» *Arch Intern Med*, 2004.
- [46] M. T. D. M. e. a. Boland E, «Limitations of Conventional Methods of Self-Monitoring of Blood Glucose,» *Diabetes Care*, 2001.
- [47] D. C. a. C. T. R. Group, «Effect of intensive diabetes treatment on the development of longterm complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: Diabetes Control and Complications Trial,» *J Pediatr* , 1994.
- [48] C. A., «The post-prandial state and cardiovascular disease: relevance to diabetes mellitus,» *Diabete Metab Rev*, 2000.
- [49] C. A. D. A. e. a. Cameroglu A.P, «Fear of needles in children with type 1 diabetes mellitus on multiple daily injections and continuous subcutaneous insulin infusion,» *Endocrine Practice*, 2015.
- [50] L. Y. H. L. e. a. Langendam M, «Continuous glucose monitoring system for type 1 diabetes mellitus,» *The Cochrane Collaboration*, 2012.
- [51] A. D. Association, «Diabetes Technology: Standards of Medical Care in Diabetes - 2021,» *Diabetes Care*, 2021.
- [52] G. R, «Continuous Glucose Monitoring: 40 Years, What We've Learned and What's Next,» *ChemPhysChem*, 2013.
- [53] Z. X.-L. L. Z.-H. e. a. Chen C, «Current and Emerging Technology for Continuous Glucose Monitoring,» *Sensors*, 2017.

- [54] G. M. B. M. e. a. Pullano S.A, «Glucose biosensors in clinical practice: principles, limits and perspectives of currently used devices,» *Theranostics*, 2022.
- [55] P. A. T. A. K. L. Adolfsson P, «Selecting the Appropriate Continuous Glucose Monitoring System - a Practical Approach,» *European Endocrinology*, 2018.
- [56] J. N. E. A. e. a. Reddy M, «A randomised controlled pilot study of continuous glucose monitoring and Flash glucose monitoring in people with type 1 diabetes and impaired awareness of hypoglycaemia,» *Diabete Med*, 2017.
- [57] B. A., «FreeStyle Libre Glucose Monitoring System,» *Clinical Diabetes Journals*, 2018.
- [58] A. A. G. N. e. a. Landau Z, «Use of flash glucose-sensing technology (FreeStyle Libre) in youth with type 1 diabetes: AWeSoMe study group real-life observation experience,» *Acta Diabetologica*, 2018.
- [59] M. C.-F. A. L. J. Schierenbeck F, «Accuracy of 2 Different Continuous Glucose Monitoring System in Patients Undergoing Cardiac Surgery: Intravascular Microdialysis Versus Subcutaneous tissue Monitoring,» *Diabetes Technology Society*, 2016.
- [60] H. Y. Park M, «Biosensing Technologies for Chronic Diseases,» *BioChip Journal*, 2021.
- [61] L. B. Y. G. e. a. Fang L, «A needle-type glucose biosensor based on PANI nanofibers and PU/E-PU membrane for long-term invasive continuous monitoring,» *Elsevier*, 2017.
- [62] G.-D. S. T. K. K. F. Sanchez P, «Real-World Data for the First U.S. Commercial Users of an Implantable Continuous Glucose Sensor,» *Diabetes Technology and Therapeutics*, 2019.
- [63] c. M. V. M. e. a. Diouri O, «Hypoglycaemia detection and prediction techniques: A systematic review on the latest developments,» *Diaetes Metab Res Rev.*, 2021.

- [64] C. C. S. J.-H. e. a. Ruan J-L, «A Gelated Colloidal Crystal Attached Lens for Noninvasive Continuous Monitoring of Tear Glucose,» *Polymers*, 2017.
- [65] M. J. Naing C, «Salivary glucose in monitoring glycaemia in patients with type 1 diabetes mellitus: a systematic review,» *BioMed Central*, 2017.
- [66] K. Y. N. H. e. a. Arakawa T, «Mouthguard biosensor with telemetry system for monitoring of saliva glucose: A novel cavitas sensor,» *Biosens. Bioelectron.*, 2016.
- [67] G. Y. C. P. e. a. Chen C, «Recent advances of tissue-interfaced chemical biosensors,» *J. Mater. Chem. B*, 2020.
- [68] S. T. Z. S. e. a. Wang H, «Recent advances in transdermal sensors for glucose monitoring,» *ScienceDirect*, 2021.
- [69] V. P. S. N. C. P. Purohit B, «Biosensor nanoengineering. Design, operation, and implementation for biomolecular analysis,» *Elsevier*, 2020.
- [70] H. Y. E. Y. e. a. Pazos M.D, «Tattoo Inks for Optical Biosensing in Interstitial Fluid,» *Adv. Healthcare Mater.*, 2021.
- [71] G. E. G.-J. C. L. M. Rubio L, «Body-decorating products: Ingridients of permanent and temporary tattoos from analytical and european regulatory perspectives,» *Elsevier*, 2019.
- [72] G. A. D. H. Carmen R.A, «Ultimate Answers to Proximate Questions: The Evolutionary Motivations Behind Tattoos and Body Piercings in Popular Culture,» *American Psychological Association*, 2012.
- [73] «European Commission website,» 14 December 2020. [Online]. Available: [https://ec.europa.eu/growth/news/chemicals-eu-takes-action-safer-tattooing-inks-and-permanent-make-2020-12-14\\_en](https://ec.europa.eu/growth/news/chemicals-eu-takes-action-safer-tattooing-inks-and-permanent-make-2020-12-14_en).
- [74] M. R. S. S. e. a. Yetisen A.K, «Dermal Tattoo Biosensors for Colorimetric Metabolite Detecion,» *Angew. Chem.*, 2019.

- [75] Y. A. L. N. e. a. Jiang N, «Fluorescent dermal tattoo biosensors for electrolyte analysis,» *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 2020.
- [76] L. H. F. T. e. a. He R, «A Colorimetric Dermal Tattoo Biosensor Fabricated by Microneedle Patch for Multiplexed Detection of Health-Rekated Biomarkers,» *Adv. Sci.*, 2021.
- [77] k. V. H. J. H. N. Kap O, «Smartphones-based colorimetric detection systems for glucose monitoring in the diagnosis and management of diabetes,» *Analyst* , 2021.
- [78] P. T. Cashen K, «Diabetic Ketoacidosis,» *Pediatr Rev*, 2019.
- [79] J. W. Y. C. e. a. Bandodkar A.L, «Tattoo-Based Noninvasive Glucose Monitoring: A Proof-of-Concept Study,» *American Chemical Society*, 2014.