

# BIOSENSORI PER IL MONITORAGGIO CONTINUO DELLA GLICEMIA

F. SANTEUSANIO

Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Endocrine e Metaboliche, Università di Perugia, Perugia

Le complicanze croniche del diabete mellito dipendono essenzialmente dal grado di controllo metabolico. Questa nozione, messa in dubbio sino a circa 15 anni or sono, ha ricevuto una definitiva conferma dopo che si sono conosciuti i risultati di indagini prospettiche condotte negli anni '80 e '90, per periodi di osservazione prolungati e su ampie casistiche di diabetici. In particolare lo studio DCCT ha dimostrato che in soggetti con diabete di tipo 1, in un periodo di osservazione di circa 10 anni, un buon controllo glicemico ottenuto con terapia insulinica ottimizzata è in grado di ridurre drammaticamente il rischio di sviluppo di complicanze microangiopatiche (1). Lo stesso studio ha anche indicato che il raggiungimento di obiettivi metabolici troppo ambiziosi espone i pazienti al rischio di ipoglicemia. Pertanto è stato individuato un range di valori di  $HbA_{1c}$  fra 6 e 7%, in cui si può ottenere egualmente una buona protezione dal rischio di complicanze croniche riducendo nello stesso tempo il rischio di ipoglicemia. Conclusioni abbastanza simili sono state raggiunte con lo studio UKPDS, per i pazienti con diabete di tipo 2, anche se in questa patologia, altri fattori spesso associati condizionano lo sviluppo di complicanze micro- e macroangiopatiche (2). La misurazione di  $HbA_{1c}$  che è un valido indice di controllo metabolico, non consente di valutare il grado di oscillazioni glicemiche durante la giornata. A bruschi incrementi della glicemia post-prandiale, infatti, si attribuisce un ruolo importante nella genesi delle complicanze croniche del diabete. Analogamente riduzioni esagerate della glicemia sino a valori francamente di ipoglicemia, talora non avvertiti dai pazienti, possono provocare danni neurologici o precipitare episodi vascolari acuti con conseguenze talora drammatiche. Pertanto l'automonitoraggio glicemico viene ritenuto oggi strumento fondamentale nella conduzione di una terapia insulinica ottimizzata. La registrazione glicemica domiciliare viene attualmente effettuata mediante glucometro con misurazioni ripetute nel corso della gior-

nata, utilizzando minime quantità di sangue ottenute con puntura dei polpastrelli delle dita. Questa pratica, che può rendersi fastidiosa quando le misurazioni sono numerose, non offre comunque una valutazione completa dell'andamento glicemico dell'intero arco della giornata e soprattutto delle ore notturne. Pertanto da molti anni l'attenzione è stata rivolta alla messa a punto di sistemi di registrazione automatica e continua della glicemia utilizzando sensori per il glucosio, direttamente o indirettamente connessi con gli spazi interstiziali del tessuto adiposo sottocutaneo (3). È stato documentato che le concentrazioni di glucosio negli spazi interstiziali del tessuto sottocutaneo riflettono bene le concentrazioni plasmatiche registrate nel compartimento vascolare sia in condizioni basali che di oscillazioni glicemiche, anche se in termini assoluti nello spazio interstiziale i valori sono più bassi (4). Sebbene le variazioni di concentrazione del glucosio plasmatico richiedano un tempo di latenza per raggiungere un equilibrio con la concentrazione del compartimento interstiziale, questo tempo è stimato essere inferiore a 10 minuti, né appare influenzato dalla presenza di elevate concentrazioni di insulina e dalla conseguente attivazione del metabolismo del glucosio (5, 6).

## Biosensori elettrochimici

Recentemente sono stati perfezionati modelli di sensori già utilizzati in passato e si è ora giunti a una fase di impiego clinico di prototipi adatti alla registrazione continua della glicemia sia pure per periodi limitati ad alcuni giorni. Un biosensore è un dispositivo analitico dotato di un sistema di rilevazione associato a un trasduttore di segnale (7). I sensori attualmente impiegati sono di tipo elettrochimico. Piccole variazioni indotte da reazioni chimiche si traducono in segnali elettronici, la cui intensità è proporzionata alla con-

centrazione dell'analita esaminato. Gli elementi essenziali per il funzionamento di un biosensore elettrochimico per la rilevazione delle concentrazioni di glucosio, sono: 1) l'enzima glucosio-ossidasi immobilizzato in un piccolo compartimento e incorporato in una cellula elettrochimica; 2) un sistema di trasduzione del segnale elettrochimico generato dalla reazione enzimatica; 3) un processore che elabora il segnale e lo traduce in un valore che riflette la concentrazione dell'analita esaminato. In altre parole, in questo tipo di sensore l'enzima glucosio-ossidasi, responsabile della reazione biochimica di conversione del glucosio in acido gluconico e perossido di idrogeno, viene accoppiato con un detettore amperometrico, per cui in presenza di 2 elettrodi, l'anodo di platino e il catodo d'argento, e di un potenziale elettrico costante (+ 0,6 V), il prodotto della reazione chimica, di ossidoriduzione, libera 2 elettroni e genera corrente. Il segnale di corrente prodotto viene convertito in un dato che quantifica la concentrazione di glucosio presente nel mezzo biologico.

In passato questo tipo di sensore è stato utilizzato per il funzionamento del pancreas endocrino artificiale, nel suo modello più noto, il Biostator (8). Tuttora uno degli ostacoli principali alla realizzazione di una cellula beta artificiale miniaturizzata e quindi portatile rimane proprio la difficoltà di allestire un sensore per il glucosio biocompatibile, stabile nel tempo e affidabile.

Negli ultimi 10-15 anni sono stati messi a punto vari tipi di sensori elettrochimici che pur non consentendo la realizzazione di un pancreas endocrino artificiale miniaturizzato, hanno tuttavia reso possibile l'allestimento di prototipi che vengono ora proposti al medico nella pratica clinica per il monitoraggio continuo della glicemia e per l'ottimizzazione della terapia insulinica.

Attualmente vengono utilizzati due tipi fondamentali di sensori elettrochimici, in rapporto alla modalità di impiego, cioè a seconda che venga applicato direttamente nel tessuto sottocutaneo (sensore ad ago) o invece connesso all'organismo dall'esterno mediante un piccolo catetere, sfruttando il principio della microdialisi per l'estrazione del glucosio (sensore con microdialisi). Le loro caratteristiche consentono tuttora un'efficienza e una stabilità di funzionamento limitate a qualche giorno. Il sensore ad ago ha il vantaggio di essere direttamente a contatto con il mezzo biologico, in genere rappresentato dal tessuto sottocutaneo, e quindi di operare sulle concentrazioni reali di glucosio. La glucosio-ossidasi è immobilizzata all'anodo di platino. Una sostanza interna, come l'acetato di cellulosa, filtra le sostanze interferenti, e una

membrana esterna, come il poliuretano, controlla la diffusione di glucosio e migliora la biocompatibilità. Questo tipo di sensore è minimamente invasivo e l'impianto sottocutaneo evita i problemi di sepsi e di embolismo associati all'eventuale impianto venoso. Possono comunque verificarsi reazioni di tipo flogistico, che favorendo l'accumulo locale di proteine e cellule infiammatorie possono alterare nel tempo la concentrazione locale di glucosio e di ossigeno. Lo strumento nel suo modello recentemente commercializzato, "MiniMed CGMS" (Continuous Glucose Monitoring System) è stato già utilizzato in studi clinici (9,10). In particolare è stato impiegato per periodi di 3 giorni in pazienti di età pediatrica e giovanile. I numerosi dati raccolti nel periodo di osservazione sono risultati molto utili perché hanno consentito agli sperimentatori di analizzare il comportamento delle curve glicemiche e di apportare degli aggiustamenti alla terapia insulinica sia nella componente basale che nei boli preprandiali, che si sono tradotti nei mesi successivi in una significativa riduzione degli episodi di ipoglicemia e del valore di HbA<sub>1c</sub>.

L'altro tipo di sensore è situato totalmente all'esterno dell'organismo, al quale rimane comunque collegato mediante un catetere di piccolo calibro a sua volta connesso con una fibra dotata di una membrana semipermeabile in grado di dializzare i soluti presenti nel mezzo biologico, e in particolare il glucosio. Per l'impianto della fibra dializzante nel tessuto sottocutaneo sono state proposte due soluzioni. Nel primo caso la fibra è costituita da una piccola ago-cannula a doppio lume, connessa con un catetere di entrata e un altro di uscita (11). L'ago-cannula viene impiantata nel sottocutaneo della regione periombelicale. Nel lume interno arriva la soluzione di dialisi che raggiunta l'estremità della cannula ritorna indietro attraverso il lume esterno, le cui pareti dotate di pori e a contatto con il liquido interstiziale consentono l'estrazione per dialisi del glucosio e il suo passaggio nella soluzione di perfusione. Nel secondo sistema invece la microfibra, inserita in un breve tratto di un piccolo catetere di nylon, è dotata di un unico lume con pareti dializzanti direttamente a contatto con il liquido interstiziale (12). Per l'impianto della fibra una piega del tessuto sottocutaneo della regione periombelicale viene fatta attraversare dal catetere, mediante la guida di un ago-cannula, in modo che il tratto costituito dalla fibra dializzante rimanga fissata all'interno del tessuto sottocutaneo e quindi a contatto con lo spazio interstiziale. La soluzione dializzante attraversa da un estremo all'altro il tratto di fibra e continua il suo flusso lungo il piccolo catetere di nylon.

In entrambi i sistemi una micropompa consente il flusso continuo della soluzione da dialisi. Il fluido di perfusione comunque ritorna all'esterno e raggiunge il sensore elettrochimico per essere raccolto in un piccolo serbatoio di scarico da dove viene poi rimosso. A livello della cellula elettrochimica la reazione enzimatica sopra ricordata genera corrente, proporzionale alla concentrazione dell'analita. Un convertitore consente la trasformazione del segnale elettrochimico in un dato numerico corrispondente alla concentrazione molare del glucosio.

Il sensore connesso alla microdialisi ha il vantaggio di lasciare il sistema di registrazione dell'analita all'esterno dell'organismo, minimizzando le reazioni da corpo estraneo. Tuttavia ha anche lo svantaggio di operare su concentrazioni di glucosio diluite, non corrispondenti pertanto alla reale concentrazione dell'analita nel mezzo biologico. Infatti l'estrazione di glucosio è solo parziale (circa il 10%), ma costante e riproducibile. È stata ben dimostrata la stretta correlazione fra le concentrazioni di glucosio nel liquido interstiziale e quella registrata nel liquido di dialisi in un range ampio fra 40 e 400 mg/dL, sia in condizioni stabili di glicemia che di variazioni più meno rapide. Si richiedono tuttavia accurate operazioni di calibrazione del sistema e una elevata sensibilità di registrazione della concentrazione di glucosio (12). Esiste un lieve ritardo di registrazione delle variazioni glicemiche dovuto al tempo impiegato dalla soluzione di dialisi per raggiungere l'elettrodo, ma contenuto in un tempo di circa 2 minuti e quindi assolutamente accettabile.

Un prototipo di sensore associato all'estrazione del glucosio in microdialisi è stato già messo a punto dalla Ditta Menarini (GlucoDay) e utilizzato in uno studio clinico volto a valutarne l'efficienza e l'affidabilità operative (13). Esso consente la registrazione della concentrazione di glucosio secondo per secondo con letture intervallate sulla media della glicemia ogni 3 minuti. Lo strumento ha già raggiunto una buona sensibilità e accuratezza di registrazione della glicemia, oltre che una sufficiente stabilità per una durata di efficienza di alcuni giorni. In una sperimentazione clinica in ambito nazionale sono stati esaminati 70 diabetici sia di tipo 1 che di tipo 2 nei quali è stata effettuata la registrazione glicemica per un periodo di almeno 24 ore consecutive. L'inserzione della fibra nel tessuto sottocutaneo della regione periombelicale è stata ben tollerata dai pazienti e lo strumento portatile per la registrazione glicemica è stato facilmente applicato e tenuto in un marsupio per tutto il periodo dello studio. I valori della concentrazione sottocutanea di glucosio misurati con il siste-

ma di microdialisi sono risultati assai ben correlati con le misurazioni glicemiche da sangue venoso e capillare nel range di valori fra 40 e 400 mg/dL (13). Questi dati hanno mostrato una buona riproducibilità e affidabilità dello strumento, almeno per un periodo di registrazione sino a 3 giorni e aprono interessanti prospettive di monitoraggio glicemico continuo nella pratica clinica.

Un altro modello di biosensore applicato all'esterno dell'organismo e che ha già avuto un impiego clinico con il prototipo "GlucoWatch biographer", è quello basato sul principio della ionoforesi invertita (14). In tal caso l'elettrodo costituito da anodo e catodo viene applicato sulla superficie cutanea, a livello del polso. L'elettrodo opera in un continuo flusso di corrente, anodo-catodo. Di conseguenza composti di basso peso molecolare, sotto l'influenza del campo elettrico, possono attraversare gli strati cutanei. Gli anioni vengono attratti dall'anodo, mentre i cationi, fra cui il  $\text{Na}^+$  e le specie neutre come il glucosio, sono attratti dal catodo. Il glucosio così estratto determina la reazione enzimatica mediata dalla glucosio-ossidasi a livello dell'elettrodo, producendo un segnale elettrico proporzionale alla concentrazione di glucosio. Lo strumento consente la lettura automatica della glicemia ogni 20 minuti per 12 ore, è dotato di un sistema di allarme per valori troppo alti o troppo bassi e per variazioni glicemiche rapide, e può immagazzinare sino a 4000 letture. Sono possibili interferenze in grado di modificare la regolarità e l'affidabilità dell'estrazione del glucosio. Variazioni di temperatura ambientale e corporea, la stessa sudorazione a livello locale sono alcuni dei fattori interferenti.

## Biosensori non elettrochimici

Vengono oggi sperimentati altri biosensori del glucosio basati su principi tecnologici diversi da quelli enzimatici. Lo scopo è quello di ottenere sistemi che siano meno invasivi, meno influenzabili da interferenze in vivo, più resistenti e quindi più adatti per un impianto a lungo-termine nell'organismo (15). Uno di questi sistemi riguarda i recettori non biologici o abiotici, detti anche anticorpi plastici. Varie tecniche sono state proposte, dall'impiego di polimeri a quello di sostanze fluorescenti in grado di legare il glucosio e di evocare flussi ionici o segnali di fluorescenza proporzionati alla concentrazione dell'analita. Nel primo caso sono stati impiegati monomeri dotati di gruppi chimici in grado di interagire con una molecola simile a quella del glucosio. I monomeri vengono quindi polimerizzati in modo da creare un polimero che può

accogliere in una specie di tasca la molecola stessa. Una volta che questa viene rimossa, il polimero manterrà una ben definita conformazione e sarà in grado di legarsi al glucosio. Un tale approccio si basa sulla interazione a pH alcalino fra complesso di metalloni e glucosio, con liberazione di ioni idrogeno. La concentrazione di glucosio può essere misurata in base all'entità titolabile di protoni liberati. Un sistema del genere può essere totalmente impiantabile nell'organismo.

L'altro approccio di costruzione di recettori artificiali per il glucosio, riguarda l'impiego di molecole fluorescenti. Una proteina marcata con una sostanza fluorofora eccitabile, quando si lega al glucosio subisce un cambiamento conformazionale e induce una variazione del grado di eccitazione del fluoroforo stesso. Questi recettori artificiali possono essere impiantati totalmente nel sottocutaneo. Dall'esterno è possibile eccitare le sostanze fluorofore situate all'interno e di registrarne le variazioni di energia di fluorescenza. Questi tipi di sensori sono impiantabili nel tessuto sottocutaneo, ma per quanto biocompatibili, possono comportarsi come sostanze estranee all'organismo e subire un danno da reazione infiammatoria. Per questo ci si sta orientando verso l'allestimento di sensori per il glucosio privi di qualsiasi invasività. Fra questi vanno citati i sensori basati sulla spettroscopia, utilizzando la regione dello spettro prossima all'infrarosso ("near infrared spectroscopy"), sulla dispersione della luce e sulla spettroscopia fotoacustica. In breve la spettroscopia "near infrared" è basata sul fatto che nei tessuti trasparenti alla luce esiste una cosiddetta "finestra ottica" nella regione spettrale compresa fra 600 e 1300 nm. L'assorbimento dei raggi luminosi di questa banda spettrale può essere misurata dalla loro trasmissione o riflessione a livello delle estremità delle dita o della superficie della mucosa orale. Il glucosio presente nei liquidi dei tessuti esaminati a seconda delle concentrazioni può modificare l'entità del fenomeno fisico. Di conseguenza, grazie a complesse tecniche multivariate è possibile calibrare modelli che offrano buone correlazioni fra le concentrazioni glicemiche di riferimento e quelle attese nei mezzi biologici.

Un altro approccio non invasivo è quello che utilizza le modificazioni della dispersione della luce incidente sui tessuti ed è basata sulla dipendenza del grado di dispersione in sospensioni torbide, dal rapporto fra gli indici di rifrazione delle particelle sospese (cellule, membrane ecc.) e la soluzione (plasma, liquido interstiziale) in cui sono sospese (16). È stato calcolato che per ogni incremento di 5 mmol/L della glicemia si ha una riduzione di circa l'1% del coefficiente di dispersione, il che significa che i tessuti diventano più tra-

sparenti. I fattori interferenti con questa tecnica sono tuttora numerosi.

Infine va menzionata la spettroscopia acustica, fondata sul principio per cui la luce dello spettro infrarosso viene assorbita in presenza di glucosio, determinando un'espansione termica e la generazione di ultrasuoni che sono registrabili sulla superficie cutanea mediante un microfono piezoelettrico.

Tutte queste nuove tecniche menzionate, sebbene promettenti e variamente sperimentate, sono ancora lontane da un possibile impiego clinico.

## Conclusioni

In conclusione sono oggi disponibili efficienti strumenti portatili per la registrazione continua della glicemia. Il loro impiego è limitato ad alcuni giorni, ma dalla raccolta dei dati il medico può già trarre utili indicazioni per l'ottimizzazione della terapia insulinica. Inoltre vari studi di fisiopatologia potranno essere impostati nei soggetti diabetici con l'ausilio di questi dispositivi. Per ora i dati vengono registrati su una memoria elettronica montata sullo strumento e vengono trasferiti a un P.C. al termine dello studio per una successiva lettura o presentazione, come avviene per un Holter elettrocardiografico. Si spera che presto questi dispositivi possano essere portati stabilmente dai pazienti, consentendo anche una lettura dei valori glicemici in tempo reale, ed essere programmati per fornire segnali acustici o visivi quando siano superati pericolosi limiti dei valori glicemici, sia in eccesso che in difetto. Tuttavia, il passo successivo rimane la messa a punto di un biosensore per il glucosio finalizzato alla realizzazione di un sistema ad ansa chiusa, cioè di una cellula beta artificiale miniaturizzata e quindi portatile, in cui l'erogazione insulinica mediante una pompa è autoregolata da un sistema computerizzato sulla base dei valori glicemici registrati minuto per minuto e di algoritmi ben definiti.

## Bibliografia

1. Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **329**, 977-986, 1993
2. United Kingdom Prospective Diabetes (UKPDS) Group: Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* **352**, 837-853, 1998

3. Pickup JC: Biosensors: a clinical prospective. *Lancet* II, 817-820, 1985
4. Schaupp L, Ellmerer M, Brunner GA, Wutte A, Sendlhofer G, Trajanoski Z, Skrabal F, Pieber TR, Wach P: Direct access to interstitial fluid in adipose tissue in humans using open-flow microperfusion. *Am J Physiol* **276** (Endocrinol Metab 39): E401-E408, 1999
5. Jansson PA, Fowelin J, Smith U, Lonroth P: Characterization by microdialysis of intracellular glucose level in subcutaneous tissue in humans. *Am J Physiol* **255** (Endocrinol Metab 18): E218-E220, 1988
6. Rebrin K, Steil GM, Van Antwerp WP, Mastrototaro JJ: Subcutaneous glucose predicts plasma glucose independent of insulin: implications for continuous monitoring. *Am J Physiol* **277** (Endocrinol Metab 40): E561-E571, 1999
7. Heller A: Amperometric biosensors. *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 50, 54, 1996
8. Reboldi GP, Massi Benedetti M, Calabrese G, Santeusano F, Brunetti P: Il pancreas artificiale: stato attuale e prospettive. *G Ital Diabetol* **12**, 149-163, 1992
9. Kaufman FR, Gibson LC, Halvorson MH, Carpenter S, Fisher LK, Pitukcheewanont P: A pilot study of the continuous glucose monitoring system. *Diabetes Care* **24**, 2030-2034, 2001
10. Boland E, Monsod T, Delucvia M, Brabdt CA, Fernando S, Tamborlane WV: Limitations of conventional methods of self monitoring system. *Diabetes Care* **24**, 1858-1862, 2001
11. Trajanoski Z, Brunner GA, Schaupp L, Ellmerer M, Wach P, Pieber TR, Kotanko, Skrabal F: Open-flow microperfusion of subcutaneous adipose tissue for on-line continuous *ex vivo* measurement of glucose concentration. *Diabetes Care* **20**, 1114-1121, 1997
12. Poscia P, Mascini M, Luzzana M, Caramenti G, Cremonesi P, Bongiovanni C, Varalli M: A microdialysis technique for continuous subcutaneous glucose monitoring in diabetic patients. *Biosensors* (submitted)
13. Maran P, Crepaldi C, Tiengo A, Grassi G, Vitali E, Pagano G, Bistoni S, Calabrese G, Santeusano F, Leonetti F, Ribaldo M, Di Mario U, Annuzzi G, Genovese S, Riccardi G, Previti M, Cucinotta D, Giorgino G, Bellomo A, Gioregino R, Poscia A, Varalli M: *Diabetes Care* **25**, 2002 (in stampa)
14. Garg SK, Potts RS, Ackerman NR, Fermi SJ, Tamada JA, Chase HP: Correlation of fingerstick blood glucose measurements with GlucoWatch Biographer glucose results in young subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* **22**, 1708-1714, 1999
15. Pickup J, McCartney L, Rolinski O, Birch D: *In vivo* glucose sensing for diabetes management: progress towards non-invasive monitoring. *BMJ* **319**, 1289-1290, 1999
16. Heinemann L, Schmelzeisen-Redeker on behalf of the non-invasive task force (NITF): Non-invasive continuous glucose monitoring in type I diabetic patients with optical glucose sensors. *Diabetologia* **41**, 848-854, 1998

---

Corrispondenza a: Prof. Fausto Santeusano, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Perugia, Via E. dal Pozzo, 06126 Perugia, e-mail: fsant@unipg.it

Pervenuto in Redazione il 23/1/2002 - Accettato per la pubblicazione il 25/1/2002