

Ultrahang-alapú tű nélküli inzulin adagolás

TDK-dolgozat

Feiszthuber Helga

Konzulens: dr. Gyöngy Miklós



Pázmány Péter Katolikus Egyetem
Információs Technológiai Kar

Molekuláris Bionika

BSc

2012

Címlap

Intézmény:

Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Információs Technológiai Kar

Molekuláris Bionika Szak

Szerző:

Feiszthuber Helga

Évfolyam:

3. évfolyam

Témavezető:

dr. Gyöngy Miklós, egyetemi docens

A dolgozat címe:

Ultrahang-alapú tű nélküli inzulin adagolás

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom *Dr. Gyöngy Miklós* témavezetőmnek, aki szakmai tudásával, önzetlen támogatásával lehetőséget biztosított ezen dolgozat megírására. Köszönöm a rám szánt idejét és türelmét. Biztos vagyok benne, hogy a téma iránti ragaszkodásom kialakulásában jelentős szerepet játszott, hogy ő volt a konzulensem az önálló laboratórium, majd ezt követően a szakmai gyakorlat, végül pedig a szakdolgozat megírása alatt.

Különös köszönetet mondok testvéremnek, *Herman Andreának*, aki ezen a munka motivációját adta, továbbá hálás vagyok a cukorbetegséggel és pumpakezeléssel kapcsolatos tapasztalatainak megosztásáért.

Köszönetem fejezem ki *Dr. Niederland Tamásnak*, a Nyugat-Magyarországi Gyermekinzulinpumpa Centrum vezetőjének, a Győr-Sopron Megyei Gyermekgyógyászati Centrum Csecsemőosztályának osztályvezető főorvosának a diabétesszel és pumpakezeléssel kapcsolatos kérdéseim során nyújtott önzetlen és szíves segítségéért, és a legújabb technológiák ismertetéséért.

Hála illeti a *Zala Megyei Kórház szövettani dolgozóit*, akik megismertettek a lehetséges szövettani módszerek menetével.

Köszönettel tartozom *Pap Gábornak* az inzulinpumpa számítógépes megtervezésében nyújtott segítségéért.

Köszönet illeti *Kollár Sárát*, labortársamat, a jó hangulatban eltöltött "labornapokért".

Végül, de nem utolsó sorban, hálás vagyok a családomnak, amiért mindig mellettem állnak, bátorítanak, és megfelelő háttérrel biztosítanak a szeretetükkel.

Absztrakt

A diabétesz korunk egyik legsúlyosabb egyéni, társadalmi és gazdasági terhekkel járó betegsége. A diabéteszben szenvedők száma főleg a fiatal populáció (<5 év) körében mutat a legdrámaibb növekedést. Az inzulin helyi alkalmazása meglehetősen nehézkes a bőr legkülső rétegének, a stratum corneumnak lipofil jellege és kis mértékű permeabilitása miatt. Ezzel szemben az injekció egy jól alkalmazott módja az inzulin bevitelének, azonban meglehetősen nagy fizikai fájdalommal és pszichikai teherrel jár, kiváltképp gyermekkorban. Az ultrahang alkalmazása transzdermális adagolásra (szonoforézis) a hatóanyag bejuttatás egy lehetséges módszerének bizonyul, bár a klinikai használatban még nem terjedt el.

Alacsony frekvenciás (40 kHz és 44 kHz) ultrahangot alkalmazva sikerült megmutatnunk, hogy a humán bőr modellezésére használt agar gélben megfelelő nagyságú (akár 400 μm átmérőjű) járatok illetve lyukak keletkeznek ahhoz, hogy diffúzióval az inzulin szabadon átjuthasson rajtuk. Sertésbőrön végzett kísérletek során azt a feltételezést kívántuk igazolni, hogy szonoforézissel sikerül kellő mértékben megnövelni a bőr permeabilitását ahhoz, hogy egy adott hatóanyag (a mi esetünkben az inzulin) számára az átjárható legyen, és elérve a megfelelő mélységet, kifejtsen hatását. Különösen nagy hangsúlyt fektetünk a kavitáció mérésével egy megfelelő monitorozási mód kialakítására, amely nagy előrelépést jelentene egy újabb, gyakorlatban is alkalmazható hordozható eszköz kialakítása felé, melyhez jó kiindulási pontot jelenthet a dolgozatban található szonoforézis alapú eszköz terve.

Abstract

The population of young (<5 years) people suffering from type 1 diabetes mellitus is dramatically increasing. The topical application of insulin is made difficult by the low permeability and lipophilic nature of the outer layer of skin (the stratum corneum). While needle injection is the established method of insulin delivery, this is an unfavourable option mainly for young children. The use of ultrasound in transdermal drug delivery (sonophoresis) has been shown to be a viable method for a wide variety of substances including insulin, however its clinical use for diabetes therapy is still hindered. In the current work, low-frequency ultrasound (40 and 44 kHz, 35 W electric power, 50% duty cycle) generated by an ultrasonic cleaner bath and a piezoelectric transducer in a perspex holder was used to investigate sonophoresis in agar hydrogel, stratum corneum and porcine skin models. As a result we observed bores and holes on agar gel with diameters in the range of approximately 40-400 μm , which is suitable for drug delivery. Ultrasonic insonation of pig skin has shown that the method is a good way to increase the permeability of pig skin, making transdermal drug delivery possible. On stratum corneum model it has been shown that with hydrophone measurements formation of pits turns up as an increase in pressure amplitude. This work focuses on cavitation detection, as a way of the monitoring the quantity of delivered drugs, which is one of the a main parameters of diabetes therapy.

Based on our results this work contains construction plans of a sonophoresis based insulin pump, which could be a good starting point for a new, needle-free device used in clinical and daily application.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
1.1. Az inzulin adagolás relevanciája napjainkban	1
1.2. A egyes típusú diabetes mellitus (T1DM)	2
1.2.1. A betegség kialakulásának rövid kórélettana	2
1.2.2. Genetikai háttér	4
1.3. Hatóanyag-bejuttató rendszerek	6
1.3.1. Az inzulinkészítmények közti alapvető különbségek	6
1.3.2. Invazív eszközök	7
1.3.3. Non-invazív eszközök	10
2. Szonoforézis	13
2.1. Az ultrahang alapjai	15
2.2. Hatásmechanizmus	16
2.2.1. Termál effektus	16
2.2.2. Mechanikai effektus	16
2.2.3. Kavitáció	16
2.2.4. Kavitáció-követés	18
2.3. Ultrahang alapú készülékek a gyakorlatban	19
3. Eszközök és eljárások	21
3.1. Ultrahang generáló eszközök	21
3.1.1. Tisztító kád	21
3.1.2. Piezoelektromos kerámia lapka	21
3.2. Akusztikai monitorozás	22
3.3. Humán bőr modellek	25
3.3.1. Agar gél	25

3.3.2.	Sertésbőr	25
3.3.3.	Aluminium fólia	25
3.4.	Inzulinkészítmények	25
3.4.1.	Lantus	25
3.4.2.	Actrapid	26
3.4.3.	Levemir	26
4.	Eredmények	27
4.1.	Hidrofon mérések vízben	27
4.2.	Kavitációs jelenség igazolása stratum corneum modellen	31
4.2.1.	Akusztikai monitorozás	33
4.3.	Ultrahang alkalmazása agar gélen	35
4.4.	Ultrahang alkalmazása sertésbőrön	38
4.5.	Kavitáció-detekció	38
4.5.1.	Impedancia változás monitorozása	40
4.5.2.	Akusztikai követés	41
5.	Inzulinpumpa terve	44
5.1.	Inzulinadagoló "prototípus"	44
5.2.	Inzulinpumpa modell	45
6.	Konklúzió	49
7.	Tovább lépési lehetőségek	51

Ábrák jegyzéke

1.1. Pen	7
1.2. Insulinpumpa	9
1.3. A hatóanyag bőrön át történő bejutásának lehetséges útvonalai	11
2.1. Szonoforézis	13
2.2. Kavitációs küszöb az intenzitás és frekvencia függvényében	17
2.3. Frekvencia komponensek	18
3.1. Ultrahangos tisztító kád	21
3.2. Hidforon mérési elrendezés	22
3.3. Felhasznált LabView program blokkdiagramja	24
3.4. Actrapid inzulin	26
4.1. Detektált jelek jellemző frekvencia komponensei	28
4.2. Kavitáció-detekció hidrofonnal	29
4.3. Állóhullámok a vízszint függvényében	30
4.4. Diffúziós cella	31
4.5. Diffúziós cellás kísérlet eredménye	32
4.6. Oldott anyag változás diffúziós cellában	33
4.7. Akusztikai monitorozás stratum corneum modellen (50-200 kHz)	33
4.8. Akusztikai monitorozás stratum corneum modellen (35-45 kHz)	34
4.9. Akusztikai monitorozás stratum corneum modellen (250-350 kHz)	34
4.10. Lyukak száma az ultrahang (40 kHz, 35 W) alkalmazási idejének függvényében	35
4.11. Járatok agar gélben 1.	36
4.12. Járatok agar gélben 2.	36
4.13. Ultrahang hatására keletkező lyukak agar gélen	37
4.14. Járatok agar gélben 6 perc ultrahang alkalmazási idő után	37

4.15. Sertésbőr ultrahangos kezelést követően	38
4.16. Sertésbőr kísérleti elrendezése	39
4.17. Impedancia mérés eredménye sertésbőrön	40
4.18. Akusztikai mérési eredmény	41
4.19. Akusztikai mérési eredmény 2.	42
4.20. Bejuttatás hatékonyságának igazolása	43
5.1. Inzulin adagoló prototípusa	44
5.2. Inzulinpumpa transzducerének és vezérlőjének modellje	45
5.3. Inzulinpumpa transzducerének vezérlője	46
5.4. A transzducert vezérlő áramkör rajza	46
5.5. A transzducert vezérlő áramkör nyomtatott áramköri modellje	47
5.6. Csatorna elrendezés	47

Táblázatok jegyzéke

1.1. Az inzulinhiány és a glükagontúlsúly következményei	3
1.2. A T1DM várható megjelenése a populációban és a proband családjában	5
1.3. Pen és az inzulinpumpa összehasonlítása	10
1.4. Transzdermális adagoló módszerek összehasonlítása	12
2.1. A transzdermális adagolás előnyei és hátrányai	14

1. fejezet

Bevezetés

1.1. Az inzulin adagolás relevanciája napjainkban

A diabétesz, vagyis „...a rejtőzködő népbetegség, mely súlyos egyéni, társadalmi és gazdasági terhekkel jár” (Laoura Lazouras, a G77 képviselőjében, ENSZ, 2006) évente több mint 3.8 millió áldozatot követel. A Nemzetközi Diabétesz Szövetség felmérése szerint 2011-ben a 20-79 korosztályban a betegségben szenvedők száma meghaladta a 366 milliót, míg 2030-ra ez a szám elérheti az 552 milliót is.[1] A diabétesznek két típusa van, az egyes (T1DM), illetve a kettes típusú diabétesz (T2DM). Mindkét típus a szénhidrát anyagcsere zavarával hozható kapcsolatba. Az alapvető különbség közöttük az, hogy míg a T1DM jellemzően gyermek- és fiatal felnőttkorban alakul ki a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteit alkotó β -sejtek pusztulását követően (pl.: autoimmun betegség eredményeként), addig a T2DM főként az idősebb korosztályt érinti az elégtelen inzulinelválasztás vagy inzulinrezisztencia miatt. A T2DM gyakran jár együtt hipertóniával, kardiovaszkuláris betegségekkel, melyek részben a helytelen anyagcsere és obesztás következményeinek tudhatók be. Mindez megelőzhető, illetve csökkenthető rendszeres testmozgással, gyógyszeres kezeléssel, kiegyensúlyozott étrenddel. A diabétesz óriási gondot jelent a betegnek és a közvetlen környezetének egyaránt, nem beszélve a társadalomra rótt anyagi teherről. A cukorbetegség nem gyógyítható, viszont különböző eszközök alkalmazásával hozzá lehet segíteni a beteget egy teljesebb élethez. Erre nyújt megoldást például az inzulinpumpa vagy a pen. A legjobb terápiát egy úgynevezett ”mű hasnyálmirigy” jelentené, amely lehetővé teszi a beteg számára a folyamatos vércukorszint monitorozást (CBGM), és annak függvényében adagolná a szervezet helyes metabolizmusához szükséges inzulint.[2, 3, 4] Ezzel a folyamatos glykaemiás kontrollal elkerülhetők lennének a diabétesz okozta káros szövődmények.

Napjainkban a diabétesz incidenciájának rohamos növekedése elsősorban a legfiatalabb (5 év alatti) korosztályt érinti.[5] Egy átlagos (nem inzulinpumpát használó) beteg naponta 2-3-szor szűrja meg magát inzulinbeadás céljából, és még ennél is többször szükséges a cukormérés. Ez éves szinten több ezer szúrászt jelent. Gyermekekban mindez a kellemetlen érzéssel járó tünetek mellett maradandó nyomokat is hagyhat. Mindezek a tények jelentősen megnövelik az úgynevezett "needle-free injection", azaz a tű nélküli inzulin adagolás relevanciáját.

1.2. A egyes típusú diabetes mellitus (T1DM)

Ez a fejezet áttekintést ad a diabétesz kialakulásáról és az abban szerepet játszó genetikai tényezőkről, így pontos képet szolgáltatva arról, hogy egy olyan betegséggel állunk szemben, amely nem gyógyítható, viszont megfelelő eszközökkel kezelhető.

1.2.1. A betegség kialakulásának rövid kórélettana

A T1DM a β -sejtek autoimmun eredetű szelektív és progresszív pusztulása. Ez a folyamat mindaddig tart, amíg a β -sejtek teljesen el nem pusztulnak, és az inzulinszekréció meg nem szűnik. Az inzulin csökkent termelődése súlyos anyagcsere-következményekkel jár. Ilyen például a vázizmok és a zsírszövet glükózfelvételének és felhasználásának csökkenése, mely exogén hyperglykaemiát von maga után. Az inzulinhiány további következménye a pancreas proglukagont termelő α -sejtjeiben mutatkozik meg, ahol a glukagonszekréció felszabadul az inhibíció alól. (A glukagon a pancreas α -sejtjei által termelt, a vércukor emelkedését kiváltó hormon.) Az emelkedett glukagonszekréció glikogenolízissel és glükogenezissel jár, amelyek az endogén (éhom) hyperglykaemiában nyilvánulnak meg (diabéteszes glükóztútermelés). A fokozott glükoneogenesis feltételét, az aminosavszint emelkedését a proteolízis aktiválódásával az inzulinhiány eredményezi. A glukagon tútermelődése ketogenezist von maga után, amelyhez a zsírszövet fokozott lipolízisét szintén az inzulinhiány teremti meg.

A T1DM egyik kísérőjelensége a lipaemia, a vér lipoproteinszintjének emelkedése. Ez azal magyarázható, hogy a májban keletkező szabad zsírsavak nemcsak az oxidáció és ketogenezis reakciófolyamataiban vesznek részt, hanem a szokásostól eltérő nagyobb mennyiség a májsejtekben a triglicerid- és a lipoprotein-szintézis fokozódását is eredményezi. A magas vércukorszint további következménye a glycosuria, azaz a glükóz vizeletben való megjelenése. Ennek a folyamatnak a magyarázata, hogy a tubulusokba jutó glükóz mennyisége meghaladja a tubulushám viaszszívó kapacitását.

Az inzulinhiány következménye	A glükagontúlsúly következménye
máj glikogénképzés csökken glükózból zsírsavképzés csökken zsírsejtek, izomsejtek glükózfelvevétele csökken exogén hiperglykaemia	máj, izom glikogenolízis fokozódik máj glükoneogenezis fokozódik endogén hiperglykaemia
zsírszövetben a lipoprotein lipáz aktivitása csökken zsírszövetben a trigliceridszintézis csökken zsírszövetben a lipolízis fokozódik szabadzsírsav-szint a vérben fokozódik májzsövetben a ketogenezis fokozódik	zsírszövetben a lipolízis fokozódik szabadzsírsav-szint a vérben fokozódik májzsövetben a ketogenezis fokozódik
proteolízis fokozódik	
glükagonszekréció fokozódik	

1.1. táblázat. Az inzulinhiány és a glükagontúlsúly következményei diabetes mellitus esetén

A betegségre utaló egyik jellemző tünet a beteg fokozott vízfogyasztása. Ez abból adódik, hogy a tubulus lumenében maradt glükóz ozmotikus hatása miatt a víz egy része nem reabszolbeálódik, kiürül, és ezzel párhuzamosan a megszokottól több nátrium és klorid ion is távozik a vizelettel. Amennyiben a beteg nem pótolja az így elvesztett elektrolitot, dehidratáció alakulhat ki. A folyadékvesztéssel csökken a vértérfogát, amely további káros hatással jár: csökken az artériás vérnyomás, romlik a szövetek perfúziója, így az oxigénellátása is. Mindennek a legrosszabb következménye az agyi hypoxia. A ketoacidózis folyamata során keletkező acetecetsav és béta-hidroxi-vajsav acidózist okoznak. A ketoacidózis kezdetben csak étvágytalanságot, később azonban hányást okoz, ezzel tovább fokozva a dehidratációt és a vérkeringés zavarát. Az acidózis hatással van a légzésre is, növelve a légvételek gyakoriságát, így a légutakon keresztüli vízvesztéséget is.

A fent leírt folyamatok láncolata vezethet a diabétesz egyik legsúlyosabb következményéhez, a diabétesz kóma állapotához, ami az öntudat elvesztésével jár, és akár halálos is lehet.¹

¹A fejezet főként a [6] forrás, és Dr. Niederland Tamással való konzultáció alapján készült.

1.2.2. Genetikai háttér

Az 1-es típusú diabétesz kialakulása során négy stádiumot különböztethetünk meg:

1. genetikai hajlam
2. korai prediabetes; külső környezeti hatásra megindult az autoimmunitás, immunológiai eltérések észlelhetők (insulitis, autoantitest-pozitivitás)
3. késői prediabetes; az immunológiai zavarokhoz metabolikus eltérések (pl. csökkent korai inzulinszekréció) társulnak;
4. a cukorbetegség manifesztálódása (a β -sejtek 80-90%-ának pusztulása után). [7]

A T1DM előfordulása 10%-ban familiáris, 90%-ban sporadikus, de mindkét esetben alapvető fontosságú a genetikai fogékonyság. Az eddig azonosított, T1DM-re hajlamosító genetikai tényezők mind a sporadikus, mind a familiáris esetekben szerepet játszanak.[8] Magának az allélnek a megléte azonban csak hajlamosít a betegségre, mivel kis penetranciájú, nem jelenti feltétlenül a diabétesz kialakulását. Azonban ahhoz, hogy pontosabb kép alakuljon ki a betegség patomechanizmusáról, fontos ezen genetikai tényezők ismerete.

A T1DM iránti genetikai hajlam poligénes öröklésmenetű, eddig több mint 25 génrégióval hozták összefüggésbe. Ezek közt van 18 számozott (IDDM1-18) és 7 elnevezés nélküli génszakasz. [8, 9] Például az IDDM1 az MHC-ben (major hisztokompatibilitási komplex) talált, az IDDM2 pedig az inzulingén közelében talált fogékonysági locust jelöli. A T1DM fő genetikai meghatározója a HLA-rendszer. Ez az örökletes fogékonyságban 50-70%-os (más források [8] szerint ez a valószínűség csak 40-50%) szerepet játszik. A többi ma ismert locus egyenként a fogékonyságnak csak néhány százalékaért felelős.[9] A humán leukocyta antigéneket (HLA) a 6-os kromoszóma MHC régiója kódolja.

A korai prediabetes során az egyén szérumában szigetsejt elleni antitestek jelennek meg. A jelenleg vizsgálható autoantitestek a következők: szigetsejt elleni citoplazmatikus antitest (ICA), glutaminsav-dekarboxiláz elleni antitest (GADA), tirozin-foszfataz elleni antitest (anti-IA2), inzulin elleni antitest (IAA). [9]

Különböző vizsgálatok során leírták, hogy a fent említett antitestek a betegségben szenvedők rokonainál nagyobb valószínűséggel vannak jelen, mint az átlag populációban.[10] Az autoantitest-előfordulás részben genetikailag meghatározott: a monozigóta-dizigóta ikertestvérek közötti különbség genetikai, a dizigóta és a nem ikertestvérek közötti különbség pedig környezeti tényezők szerepére utal.[9]

Az alábbi táblázat a T1DM populációban és a diabéteszes egyén családjában való előfordulását foglalja össze:

Vizsgált csoport	Az 1-es típusú diabétesz előfordulása (%)
Az átlagnépességben 30 éves korra	0,1-0,4
Diabéteszes egyén testvérénél 30 éves korra	6
Diabéteszes egyén gyermekében,	3-6
-ha az apa diabéteszes, 20 éves korra	6-9
-ha az anya diabéteszes, 20 éves korra	1-4
Egypetűjű ikertestvér, 30 éves korra	34
Egypetűjű ikertestvér, 12 évvel a proband diagnózisa után	43
Egypetűjű ikertestvér, 40 évvel a proband diagnózisa után	50
Kétpetűjű ikertestvér	10-12
HLA-identikus testvér	15
HLA-haploidentikus testvér	9
HLA nem identikus testvér	1-2

1.2. táblázat. A T1DM várható megjelenése a populációban és a proband családjában. Forrás: [9]

1.3. Hatóanyag-bejuttató rendszerek

A fejezet rövid áttekintést ad a különböző hatóanyag-bejuttató rendszerekről az adagolás elve szerint. Először a bejuttatni kívánt, terápiás használatban lévő inzulinkészítményeknek a főbb jellemzői kerülnek ismertetésre, ugyanis ezek a készítmények mondhatni a diabétesz terápia legfontosabb tényezői.

1.3.1. Az inzulinkészítmények közti alapvető különbségek

Az inzulin felfedezését követően számos inzulintípust alkottak meg szubkután alkalmazás céljából, különös tekintettel arra, hogy minél inkább csökkentsék a szervezet fiziológiás válaszát az adott készítményre.[1] Kezdetben különböző állati inzulinokat használtak (sertés, szarvasmarha), azonban ezek a készítmények sok szennyezőest tartalmaztak, és sokszor az antitestek áldozatául estek. További hátrányt jelentett, hogy nem lehetett velük jó vércukorértékeket elérni. A következő generációt alkotják a proinzulin-mentes (PFI), később az azonos fajtájú állatból készült (monospecies (MS)), majd a tovább tisztított monokomponens (MC, single peak) állati inzulinok, melyek már hatásosabbnak bizonyultak, azonban a kívánt hatást velük sem lehetett elérni.[5] A genetika lehetővé tette a szintetikus, gyors és elhúzódó hatású inzulinkészítmények megalkotását (genetic engineering), amelyek jobb vércukorértékeket eredményeztek, de a viszonylag hosszú hatástartam miatt ezek sem bizonyultak sikeresnek.[5]

A gyors hatású inzulin beadását követően a szervezetben kb. fél óra elteltével az inzulin szintje emelkedni kezd, majd 120-140 perc után elér egy maximális szintet, 6-8 óra múlva pedig visszatér a kiindulási állapotba. Ez a lassú felszívódás postprandialis hiperglykaemiát okozhat, amit egy hiperinsulinaemiás állapot követ, aminek következtében hypoglykaemia alakulhat ki. Az inzulinszint lassú emelkedésének hátterében az áll, hogy az inzulinmolekulák hexamereket alkotnak. Ezeknek a hexamereknek azonban disszociálniuk kell ahhoz, hogy elérjék a monomer állapotot, hogy felszívódhassanak, illetve kötődhessenek a receptorokhoz.[11] Diabéteszes betegeknél minden fő- és kis étkezés esetén gyorshatású inzulin beadása szükséges az étkezés megkezdése előtt. Ez az úgynevezett bólus inzulin, melynek mértéke szabályozható az elfogyasztott étel szénhidrát tartalmától függően. Mindazonáltal a beadás sebessége is meghatározható, aminek különösen akkor van jelentősége, ha zsíros ételeket fogyaszt az illető vagy lassú az emésztése. Egészséges embereknél a szervezetben folyamatosan kimutatható egy bizonyos mennyiségű inzulin. Ez annak köszönhető, hogy a hasnyálmirigy folyamatosan (nem csak szénhidrát bevitel esetén) termeli az inzulint.

Ezt diabéteszben szenvedő egyénnél napi egyszeri (inzulinpumpa esetén folyamatos) inzulinadással orvosolják. Ez az úgynevezett bázis inzulin, ami a szervezet napszakonkénti változó inzulin igényéhez állítható. Bázis inzulinként hosszú hatású inzulint alkalmaznak.

1.3.2. Invazív eszközök

Pen

Az inzulin peneket az Egyesült Államokban használták először 1987-ben, ezáltal megkönnyítve számos beteg kezelését.[1, 12]

A pen egy injekciós tű és egy inzulin tartály együttese, amely precíz adagolást tesz lehetővé. Egy pen általában 3 ml inzulint (azaz 300 IU) tartalmaz. A pen lehetővé teszi a ruhán át történő inzulin beadást is. Előnyei közé tartozik, hogy a mikrotű szinte teljesen fájdalommentessé teszi a beadást, továbbá többször használható fertőzésmentesen, nem kell minden adagolás után tűt cserélni. Egy pen akár évekig használható mindössze az inzulintartály és a tű cseréjével, ezért meglehetősen költséghatékony megoldás. Némely készülék speciális funkciókkal is rendelkezik, mint például a digitális kijelző az adatok tárolására és megjelenítésére. Továbbá látható rajta a beadandó inzulinegység és az idő is, valamint képes eltárolni az utolsó 16 beadott inzulinadagot is. Némely pen képes akár 0.5 egység adagolására is, ami különösen fontos a gyerekek esetében.[1]



1.1. ábra. Pen. Forrás: nickcampos.com

Inzulinpumpa

Az inzulinpumpa a cukorbetegség kezelésének egyik legkorszerűbb eszköze. A pumpakezelés kifejlesztését a napi többszöri inzulinadás (MDI) hibái tették szükségessé. Nem pusztán kényelmi eszközt láttak benne, amely megkíméli a beteget a napi többszöri injekciózástól, hanem a kifinomult dozírozási módszerekben rejlő előnyöket is.[5] Számos közlemény kiemeli, hogy a folyamatos inzulinadagolással lehet a legjobban megközelíteni az inzulin fiziológiás szintjét, a 24 órás automatikus inzulinprogramozással, amelyet a beteg kiegészíthet az étkezések előtt beadott bólussal.

A pumpakezelés sok előnnyel jár. A pumpa lehetővé teszi a bázis inzulin folyamatos adagolását, mindemellett a beteg az étkezések előtt beállíthatja a kívánt bólust, amiben az úgynevezett „bólus-varázsló” is segíti. Ez egy speciális program, ami abban az esetben lenne a legideálisabb, ha a betegre lenne szabva, figyelembe véve szervezetének válaszait az adott szénhidrát, illetve inzulin bevitelre.

A pumpa használata során az egyenletes inzulinadagolás következményeként csökken a hypoglykaemia kockázata, ami további előnyökkel járhat: normalizálódik a plazma glukagon-szintje, kedvezően változnak a lipoprotein paraméterek, javul az idegek vezetési sebessége, stabilizálódik a háttér retinopáthia további progressziója és az enyhe fokú nephropathia.[5]

A Medtronic volt az első olyan cég, amely a '70-es évek elején elkezdte gyártani a maihoz hasonló inzulinpumpákat (Minimed 502). Az inzulinpumpa Alfred E. Mann ötlete alapján született meg. Hazánkban először 1999-ben került alkalmazásra a Roche inzulinpumpa. Maga az inzulinpumpa egy mechanikus szerkezet, amely tartalmazza az inzulint tároló tartályt, az adagolót szabályozó elektronikát, és magát az adagoló rendszert. A pumpa egy kanülben folytatódik, amely egy olyan mikrotűben végződik, ami közvetlenül a bőr alá adagolja az inzulint. A pumpák jelentős mértékben eltérnek a beadható inzulin mennyiség szabályozhatóságában (ez különösen nagy jelentőséggel bír a gyerekek esetében, ahol az inzulinegység törtedékének is meghatározó hatása van a vércukorra). Kutatások során kimutatták, hogy a pumpát alkalmazó egyéneknél a HbA1c értéke csökkent összevetve a pent használó betegek értékeivel. Ez főleg azoknál a betegeknél volt megfigyelhető, akiknél korábban rossz glykaemiás kontrollt tapasztaltak.[2] A HbA1c (glikohemoglobin) a hemoglobin egy formája, melyben a hemoglobinhoz glükóz kötődik. A glikolizált hemoglobin aránya a teljes hemoglobinhoz képest (százalékban kifejezve) a cukorbetegség kezelésének egyik fontos laborparamétere. Segítségével megállapítható, hogy milyen volt a beteg átlagos vércukorszintje az elmúlt három hónapban. Minél magasabb a vércukorszint, annál több hemoglobin alegységhez kötődik cukor. Amikor stabilizálódik

a kötés, a cukor nem tud többé leválni a hemoglobinnal. A cukorbetegség kezelésének egyik fő célja, hogy a HbA_{1c} érték 6.5-6% alatt maradjon. 8% feletti szinteknél a cukorbetegség késői szövődményeinek kialakulása (retinopátia, nephropathia) jelentősen felgyorsul. Az inzulinpumpák egy különálló csoportját a patch pumpa alkotja. Ez egy speciális inzulinpumpa, amely a többi készülékkel ellentétben nem igényel kanült, ugyanis közvetlenül kapcsolódik a testhez, így nem áll fenn a kanül buborékok miatt való eldugulásának veszélye, ami a hiperglykaemia előfordulásának a csökkenését vonhatja maga után. A patch pumpák egy második készülékkel szabályozhatók (ami általában okostelefon) rádiófrekvenciás jellel.

Különösen nagy a relevanciájuk azoknak az inzulinpumpáknak, melyek glükóz-szenzorhoz kapcsolódnak, ezzel lehetővé téve a vércukor folyamatos monitorozást (CBGM). A szenzort alkalmazva elkerülhető a hiper-, illetve hypoglykaemia, ugyanis a szenzor tartalmaz egy riasztási funkciót, ami automatikusan bekapcsol, ha a vércukor értékében csökkenő vagy növekvő tendenciát észlel, továbbá, ha a vércukor szintje egy adott érték fölé vagy alá megy.



1.2. ábra. Inzulinpumpa. Forrás: egeszseg.com

Pen	Pumpa
Egyenletes, 24 órás bázishatás	A bázisadag a diurális inzulinérzékenységnek megfelelően változtatható
A bólusok száma behatárolja az étkezések számát	A bólusadag az étkezések számához illeszthető
Az inzulinanalógok felszívódási hatékonyságának változása 19-55 %	Az inzulinanalógok felszívódási hatékonyságának változása < 3 %
Magasabb HbA1c értékek	Alacsonyabb HbA1c értékek
Roszbabb anyagcsere	Jobb anyagcsere
Hypoglykaemia előfordulási gyakoriságának csökkenése nem tapasztalható	A hypoglykaemia előfordulási gyakorisága csökken

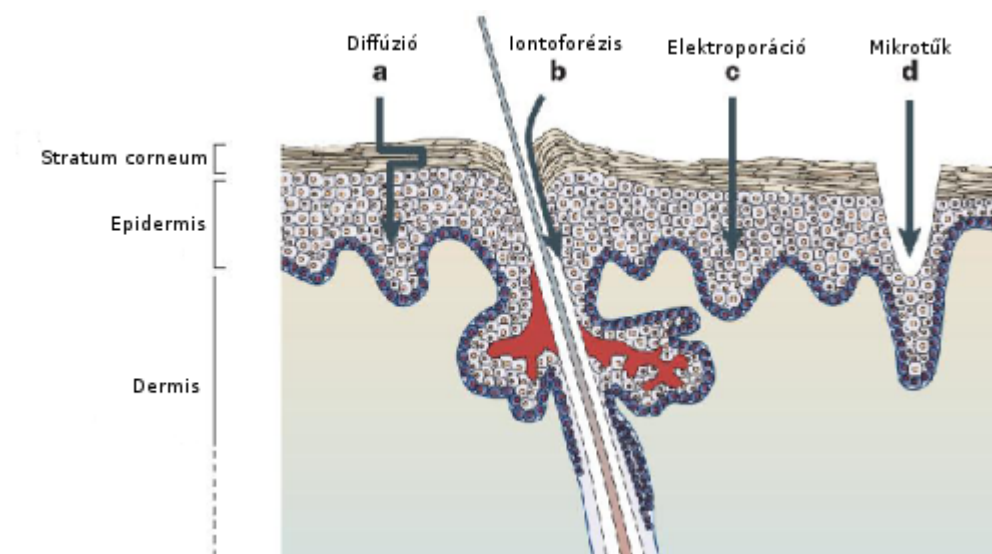
1.3. táblázat. A pen és az inzulinpumpa összehasonlítása

1.3.3. Non-invazív eszközök

A non-invazív transzdermális inzulinadagolás jelentős mértékben hozzájárulhat a diabéteszes beteg életminőségének javulásához, szemben a gyógyszeres és az invazív módszerekkel. [13, 14] Ez az adagolási mód nem igényel tűt, ami jelentős előnyt jelent, különösen ha figyelembe vesszük azt, hogy az egyes típusú diabétesz főként gyerek és fiatal felnőttkorban jelentkezik.

Az non-invazív hatóanyag bejuttatásánál az egyik legfontosabb szempont az, hogy a bejuttatni kívánt gyógyszer kellő mélységre jusson a bőrön keresztül. Ez általában 100-200 μm -t jelent a bőr felszínétől mérve. Nagy jelentőséggel bír a bejuttatni kívánt anyag mérete is. A túl kicsi részecskék nem minden esetben érik el a kellő momentumot ahhoz, hogy átjuthassanak a bőrön.

Az alábbi ábra a hatóanyag transzdermális úton való bejutásának lehetséges útvonalait és módszereit összegzi.



1.3. ábra. A hatóanyag bőrön át történő bejutásának lehetséges útvonalai. A bőr felszínét alkotó stratum corneum egy keratin sejtekből álló elhalt réteg, melyet egy lipid-gazdag extracelluláris mátrix vesz körül, így alkotva a hatóanyagok bejuttatása szempontjából az első barriert. A bőr következő rétege, az epidermis, ami vérerekben szegény. Kicsit mélyebbre haladva, a dermális-epidermális junction alatt a dermis már tartalmaz kapillárisokat, amelyek képesek felvenni a transzdermálisan bejuttatott hatóanyagot, így eljuttatva azokat a szisztémás keringésbe. **a.** Transzdermális diffúzió, általában egy kémiai anyag jelenlétében, a stratum corneumon keresztül, egy kanyargós útvonalon halad, megkerülve az ott található sejteket, majd átmegy az extracelluláris lipid kettősréteggel érintkező felületen. **b.** Az alacsony feszültségű elektromos iontoforézis a szőrtüszőkön és a verejtékmirigyek kivezető csövén át történő transzport utakat teszi hozzáférhetőbbé. **c.** A nagy feszültségű elektroporáció transzcelluláris utakat hoz létre a lipid kettősréteg átszakításával. Az ultrahang az **a.** és a **c.** utakat sokkal permabilisabbá teszi a lipid kettősréteg átrendezése által. **d.** A mikrotűk és termális poráció μ nagyságú lyukakat hoznak létre a bőrön, ezzel biztosítva a hatóanyagok számára a transzport útvonalat. Forrás: [15]

Az alábbi táblázat az egyes non-invazív hatóanyag bejuttatási módokat hasonlítja össze.

Bejuttató módszer	Dozirozás	Folyamatos adagolás	Fájdalom- és irritációmentesség	Ár, egyszerűség
Hipodermiás tű	XXX	XX	X	XXX
Kémiai enhancerek	X	XXX	XX	XXX
Iontoforézis	XX	XXX	XXX	X
Elektroporáció	XX	XXX	XX	X
Mikrotűk	XX	XXX	XXX	X
Termál poráció	XX	XXX	XXX	X
Ultrahang	XX	XXX	XXX	X

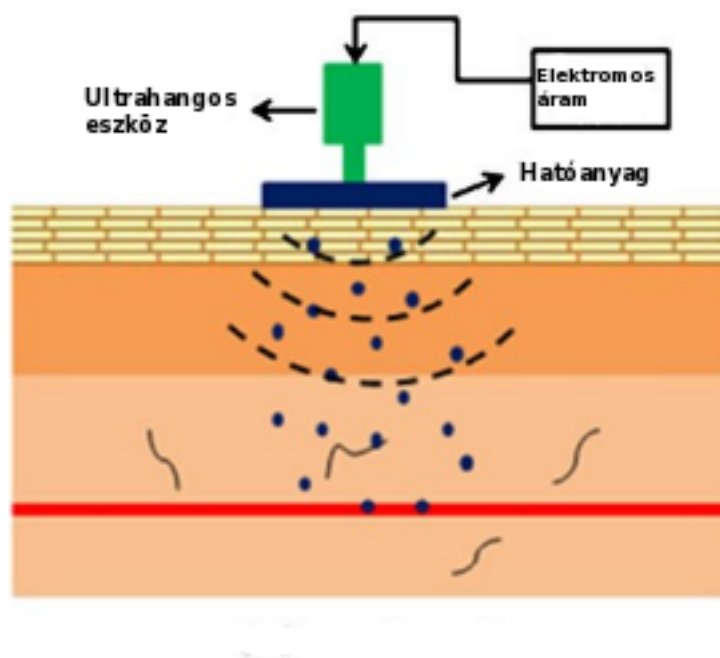
1.4. táblázat. Transzdermális adagoló módszerek összehasonlítása. A táblázatban használt szimbólumok: (X): limitált, (XX):moderált, (XXX):jó. Forrás: [15]

A számos non-invazív módszer közül mi az ultrahang alapú szonoforézissel foglalkozunk.

2. fejezet

Szonoforézis

Több évvel ezelőtt már alkalmazták az ultrahangon alapuló szonoforézisnek nevezett technikát, hogy növeljék a bőr permeabilitását.[16, 17] A szonoforézis során alkalmazott ultrahang frekvenciája 20 kHz és 16 Mhz között változik, intenzitása $<3\text{Wcm}^{-2}$. [18] Alacsony frekvenciás ultrahanggal történő adagolás során mikrobuborékok keletkeznek a bőrben, amik növelik a pórusok átmérőit, így lehetővé téve a lipid membránon át a víz beáramlását.[13, 19] Ezt a folyamatot kavitációnak nevezzük.



2.1. ábra. A szonoforézis folyamatának ábrázolása. Kékkel jelöltük a bejuttatni kívánt hatóanyagot. Forrás: [19]

Számos kutatási eredmény számol be a módszer hatékonyságáról olyan peptidek bejuttatása során, mint amilyen az inzulin vagy a heparin.[19]

A szonoforézisnek két típusát különböztetjük meg:

- folyamatos vagy *szimultán* szonoforézis, ahol a hatóanyag bejuttatása az ultrahang alkalmazásával azonos időben történik
- *előkezelésen alapuló* szonoforézis, amikor az ultrahang alkalmazása után történik a hatóanyag bejuttatása

Előnyök és hátrányok

Előnyök [20, 18]
Növeli a hatóanyagok penetrációját passzív transzport által Lehetővé teszi a transzdermális penetráció mértékének kontrollját A bőr sértetlen marad, ezzel csökkentve a fertőzések kialakulását Kevésbé fájdalmas, mint az injekció Sok esetben nagyobb a betegek megelégedettsége Nincs immunológiai szenzitivitás A szisztémás abszorpció kockázata kisebb, mint injekció esetében Csökkenti a hatóanyag plazmafluktuációját Nincs májkárosító hatása
Hátrányok [18]
A stratum corneumnak épnek kell lennie a hatóanyag hatékony bejuttatás érdekében Időigényes lehet Esetenként kissé csípő érzés, bőrirritáció és égési sérülések tapasztalhatók

2.1. táblázat. A transzdermális adagolás előnyei és hátrányai

2.1. Az ultrahang alapjai

A hang longitudinális nyomáshullám. A 20 kHz-nél magasabb frekvenciájú hangokat **ultrahangnak** nevezzük. Folyadékokban és gázokban a hang alacsonyabb és nagyobb sűrűségű régiókat hoz létre, ugyanis a közegben lévő molekulák a hullámmal megegyező irányba mozognak. Szilárd anyagokban tranzverzális és nyíróhullámok is jelen lehetnek, a molekulák mozgása pedig merőleges a terjedés irányára.

A hullámhossz növelésével a frekvencia csökken, konstans szinten tartva a hullám terjedési sebességét.

$$c = f \cdot \lambda$$

A közeg ellenállása a hullám terjedésére a közeg akusztikus impedanciájától függ (Z), ami a közeg sűrűségének (ρ) és a hangsebességnek (C) szorzataként határozható meg:

$$Z = \rho \cdot C$$

A bőr, a csontok és a levegő akusztikus impedanciája rendre $1.6 \cdot 10^6$, $6.3 \cdot 10^6$ és $400.0 \text{ kg/m}^2\text{s}$. A szöveteken keresztül terjedő ultrahang energiájának biológia hatásai lehetnek, ha a szövet elnyeli az energiát. Az abszorpciós koefficiens (a) a szövetekben való abszorpció jellemzésére szolgáló mennyiség. Az adott szövetmélységben mérhető intenzitást az alábbi összefüggés írja le:

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-ax}$$

ahol $I(x)$ az x mélységben mérhető intenzitás, I_0 a felszínen mérhető intenzitás, míg a az abszorpciós koefficiens. Ahhoz, hogy az ultrahang energiája eljusson a testhez, egy ultrahangot vezető közegre van szükség a levegő nagy impedanciája miatt. Számos ilyen anyag létezik: olajok, víz-olaj emulziók, gélek és kenőcsök.[18] A frekvenciatartományok és az ultrahang alkalmazása szerint három fő ultrahang csoportot különböztetünk meg:

- **Magas frekvenciás** vagy **diagnosztikai ultrahang** a klinikai képalkotásban ($3\text{-}10 \text{ MHz}$)
- **Közép frekvenciás** vagy **terápiás ultrahang** a fizikai terápia során. ($0.7\text{-}3.0 \text{ MHz}$)
- **Alacsony frekvenciás** vagy **”erő” ultrahang** a rákterápiában, fogkö eltávolítására, *transzdermális adagolásra* és ultrahangos szikeként. ($18\text{-}100 \text{ kHz}$)[18]

2.2. Hatásmechanizmus

2.2.1. Termál effektus

Az ultrahang nem jut át teljes mértékben a szöveten. Miközben halad, részben visszaverődik, részben pedig elnyelődik a közeg által, ami a kibocsátott hullám gyengülését eredményezi. Az elvesztett energia hővé alakul át.

Az ultrahang abszorpciója növeli a közeg hőmérsékletét. Némely szövetnek, mint amilyen a csont is, magasabb az abszorpciókoefficiense, aminek eredményeként jelentősebb termál effektust mutat, szemben például az izommal, ami alacsonyabb abszorpciókoefficienssel rendelkezik. Adott frekvencián a közeg hőmérséklet-emelkedése függ az ultrahang alkalmazási idejétől és a használt intenzitás mértékétől. Egy adott közeg abszorpciókoefficiense növekszik az ultrahang frekvenciájával, ami a hőmérséklet emelkedését is eredményezi.[18]

2.2.2. Mechanikai effektus

Az ultrahang egy longitudinális nyomáshullám, amely szinuszos nyomásváltozást idéz elő a bőrben, ezáltal szinuszos sűrűségváltozást eredményez. 1 MHz-nél magasabb frekvencián a sűrűségváltozás olyan gyorsan következik be, hogy az apró levegőmagok nem képesek növekedni, így nem jöhet létre a kavitáció. A sűrűség változás egy további hatása ciklusos nyomások formájában jelentkezik. A lipid kettősrétegek ezek által a nyomáshullámok által könnyen átrendeződhetnek, amely a kettősréteg nagyobb permeabilitását eredményezi. Ez a hatás nem számottevő. [18]

2.2.3. Kavitáció

Nem ismert egészen pontosan, hogy mi az a mechanizmus, ami a bőr permeabilitásának megnövekedését okozza, azonban általánosan elfogadott tény, hogy a folyamatért leginkább a kavitáció felelős.

A *kavitáció* egy fizikai jelenség, mely ultrahangnak kitett közegben következik be, buborékok gyors növekedésével és összeroskadásával (*transiens* vagy *incerciális* kavitáció) vagy a buborék lassú, oszcilláló mozgásával jár (*stabil* kavitáció). Az oszcillációk és összeroskadások átrendezik a stratum corneum lipid kettősrétegét, így segítve a transzportot.[21] A kavitáció egy komplex jelenség, mely számos paramétert ölel fel, mint amilyen az ultrahang frekvenciája, intenzitása vagy a közeg hőmérséklete, felületi feszültsége és a kavitációs magok száma[22, 23]

Atmoszférikus nyomáson tiszta vízben a kavitációs küszöböt (P_{C0} , bar-ban kifejezve) az alábbi összefüggés írja le [24]:

$$p_{C0} = (0.00025f)^2 + (0.045f - 1)$$

A kavitáció két nagyon fontos paramétere az intenzitás és a frekvencia. Számos közlemény vizsgálta ezen két paraméter kapcsolatát.[22] [23, 25, 26]

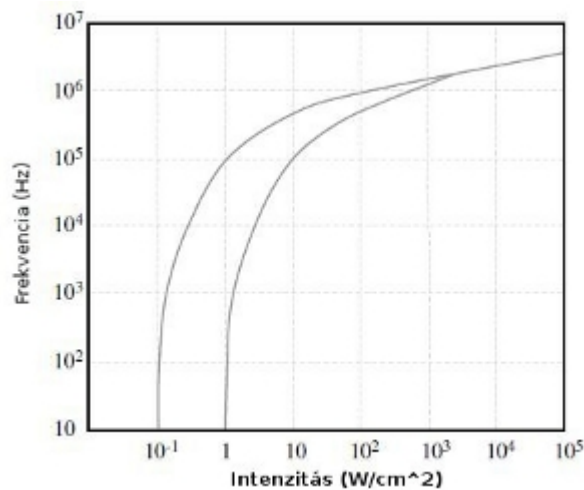
10-szer nagyobb intenzitás szükséges ahhoz, hogy 400 kHz-en bekövetkezzen a kavitáció, mint ugyanilyen paraméterek mellett 10 kHz-es frekvencián. Ennek a fizikai magyarázata abban rejlik, hogy a kompressziós és dekompressziós ciklusok, melyeket az ultrahang hoz létre, olyan rövidek lesznek, hogy a folyadék molekulái nem tudnak elválni, hogy egy űrt hozzanak létre, így a kavitáció nem jöhet létre. [27]

Felhasználva azt az összefüggést, hogy

$$P = \sqrt{\rho \cdot c \cdot I}$$

ahol P a nyomás, c a hang vízben való terjedési sebessége, I pedig az intenzitás, a kavitáció bekövetkeztéhez legalább 39 kPa nyomás szükséges.

Az alábbi ábra a kavitációs küszöböt szemlélteti az alkalmazott frekvencia és intenzitás függvényében buborékos (bal oldali függvény) és gáztalanított (jobb oldali függvény) vízben.



2.2. ábra. Kavitációs küszöb az intenzitás és frekvencia függvényében. A bal oldali függvény buborékos, míg a jobb oldali teljesen buborékmentes vízben készült mérések eredményét szemlélteti. Forrás: [28]

2.2.4. Kavitáció-követés

Számos módszer létezik a kavitáció folyadékban való követésére. A bekezdésben ezek közül csak néhány kerül ismertetésre.¹

Akusztikai mérések

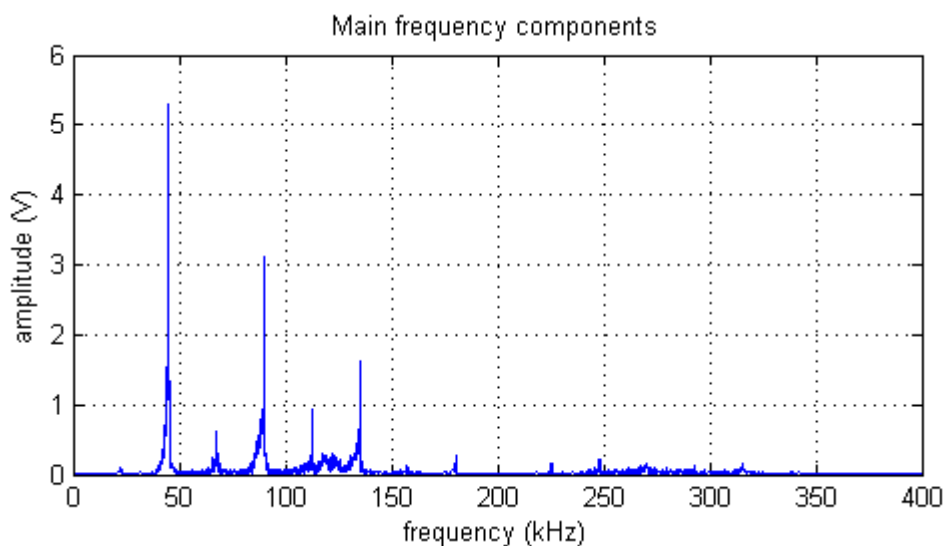
A kavitációs buborékok második hangforrásként hatnak, azaz monitorozható és analizálható a kibocsátott hang. Mindez megtehető egy hidrofon segítségével, amely képes felvenni a jelet, melyek spektruma ezt követően analizálható, különböző szűrők alkalmazásával kiválasztható a megfelelő frekvenciatartomány. Alacsony intenzitáson (küszöb alatti intenzitáson) csak az eszköz működési frekvenciája detektálható.

A $f_0/2$ szubharmonikusokat a kavitáció indikátoraiként jelentkezőnek.

Az ultrahang tranziens kavitáció küszöbét meghaladó intenzitálásának növekedésével a szubharmonikus jelek amplitúdója hirtelen megnő. Ezen az intenzitás a szubharmonikusok azoktól a buborékoktól származhatnak, melyeknek az összeroskadáshoz két nyomásciklus szükséges.

Stabil kavitáció esetén a második felharmonikus ($2f_0$) a meghatározó frekvencia.

A $(2n+1)f_0/2$ felharmonikusok szintén észlelhetők.



2.3. ábra. Frekvencia komponensek. A jelet egy ultrahangos kádban rögzítettük, melyen megfigyelhetők a fel- és alharmonikusok.

¹Az alfejezet C. R. Hill *Physical Principles of Medical ultrasonics* című könyvének "Cavitation monitoring" fejezete alapján készült

Ahogy az intenzitás közeledik a tranziens kavitáció küszöbéhez, a szub- és felharmonikus jelek amplitúdója megnő. A második felharmonikus marad továbbra is a legerősebb jel, de jelek detektálhatók $3 f_0 / 2$ frekvenciáknál is. A tranziens kavitáció egy további indikátora a szélessávú zaj (fehérzaj). Ennek a frekvenciatartománynak a nagyságából meghatározható a tranziens kavitáció mértéke.[16]

Impedancia változás

A közeg akusztikus impedanciájának megváltozása a kavitációs aktivitás mennyiségére utal. A víz impedanciája akár 60 %-kal is csökkenhet nagy intenzitású ultrahang alkalmazása esetén. A módszer nagy pontosságú, és nem igényli az ultrahangos közegbe való behatolást, ugyanis a transzduceren vizsgálja az elektromos jeleket. A transzducer kivezetésén detektálható jel egy frekvencia modulált feszültség. A különböző frekvenciák szűrők segítségével tanulmányozhatók.

Szonolumineszcencia

A ultrahangnak kitett közeg fénykibocsátó képessége a szonolumineszcencia, amelyet a kavitáció egyik indikátoraként tartanak számon, bár a fény képződésének pontos mechanizmusa nem teljesen ismert.

A szonolumineszcens jelek legfontosabb jellemzői a következők:

1. csökken a frekvencia növekedésével, és nem figyelhető meg 2 MHz frekvencia fölött
2. egy bizonyos intenzitásküszöb fölött jelentkezik, és megközelítőleg lineárisan növekszik az intenzitás mértékének növelésével, de teljes mértékben el is tűnhet túl nagy intenzitás alkalmazása esetén
3. csökken a külső nyomás növekedésével
4. csökken a külső hőmérséklet növelésével

2.3. Ultrahang alapú készülékek a gyakorlatban

A *Transdermal Specialties* által kifejlesztett ultrahang alapú készülék képes megnövelni a pórusok átmérőit, melyeken így szabadon átjuthatnak a nagyobb molekulák is. A készülék egyaránt alkalmas a bázis és a bólus inzulin beadására is. Az inzulint tapaszok formájában tárolja 25, 50, 100 és 150 egységnyi mennyiségben. Egy elektronikus bejuttató rendszer tárolja a beadott inzulinmennyiség adatait és a vércukorértékeket.[29]

Az *MIT* által fejlesztés alatt álló készülék két frekvenciát használ azon az elven, hogy a magasabb frekvenciás ultrahang nem rendelkezik kellő energiával ahhoz, hogy a buborékokat összeroskadásra bírja. Ezért alkalmaznak először egy magasabb frekvenciás ultrahangot, ami létrehozza a buborékokat, és kisebb átmérőjű pórusokat eredményez, majd egy alacsonyabb frekvenciás ultrahangot használnak, hogy előidézzék a buborékok roszakadását.[30]

A *SonoPrep* egy alacsony frekvenciás készülék, amely a klinikai használatban is gyakori (Echo Therapeutics, Franklin, MA, USA). A beteg egy vezető polimer kézi eszközt tart, így az adagoló eszköz automatikusan megáll, amikor a bőr impedanciája a terápiának megfelelő szintre csökken. A tipikus alkalmazási idő 10s.[31]

3. fejezet

Eszközök és eljárások

3.1. Ultrahang generáló eszközök

3.1.1. Tisztító kád

Egy ultrahangos tisztító kádat (HQ-JC40 Ultrasonic Cleaner) használtunk arra, hogy tanulmányozzuk a kavitáció hatását a különböző szöveti modelleken. A kád működési frekvenciája 40 kHz, a teljesítménye pedig 35 W (aminek a fele feltehetően hő formájában elvész).



3.1. ábra. Az ultrahangos tisztító kád, amit a kísérletek során használtam (40 kHz, 35 W)

3.1.2. Piezoelektromos kerámia lapka

A lapka frekvenciája 44 kHz, átmérője 50 mm, vastagsága 3.5 mm. A fegyverzetei át vannak vezetve azonos oldalra. A fent említett két eszköz a piezoelektromosság elvén működik. A piezoelektromosság egy fizikai jelenség, amely bizonyos anizotróp anyagokban jelenik meg, amelyekben az anyag mechanikai torzítása a töltések egyenlőtlen eloszlásához vezet. Ennek megfelelően az inverz piezoelektromos hatás során egy külső elektromos tér hatására mechanikai torzulás jön létre.

3.2. Akusztikai monitorozás

Egy hidrofont (Reson TC 4013, PicoScope 5203-hoz kapcsolva) használtunk, hogy detektáljuk a nyomást és a jellemző frekvencia komponenseket az ultrahangos kád belsejében. Mindez arra szolgált, hogy megállapítsuk az állóhullámok keletkezését, és hogy detektálni tudjuk a kavitációt. Mindkettő nagyon fontos eleme egy hordozható eszköz kifejlesztésének, ugyanis segíthetnek rávilágítani arra, hogy hogyan tudjuk csökkenteni a kavitációs küszöböt egy olyan szintre, hogy az előídeázhető legyen egy hordozható eszközzel, és hogyan kerülhetjük ki (vagy hogyan fordíthatjuk hasznunkra) az állóhullámokat. A PicoScope oszcilloszkóp jelgenerátora legfeljebb 4 V-os (a jel minimum pontjától egészen a maximumáig) jelet képes generálni, ami elegendő az állóhullámok jelenlétének megállapításához, ahhoz azonban kevés, hogy kavitációt tudjunk előídeázni vele, ugyanis a legnagyobb nyomás, amit segítségével elő tudtunk állítani, megközelítőleg 4 kPa volt.



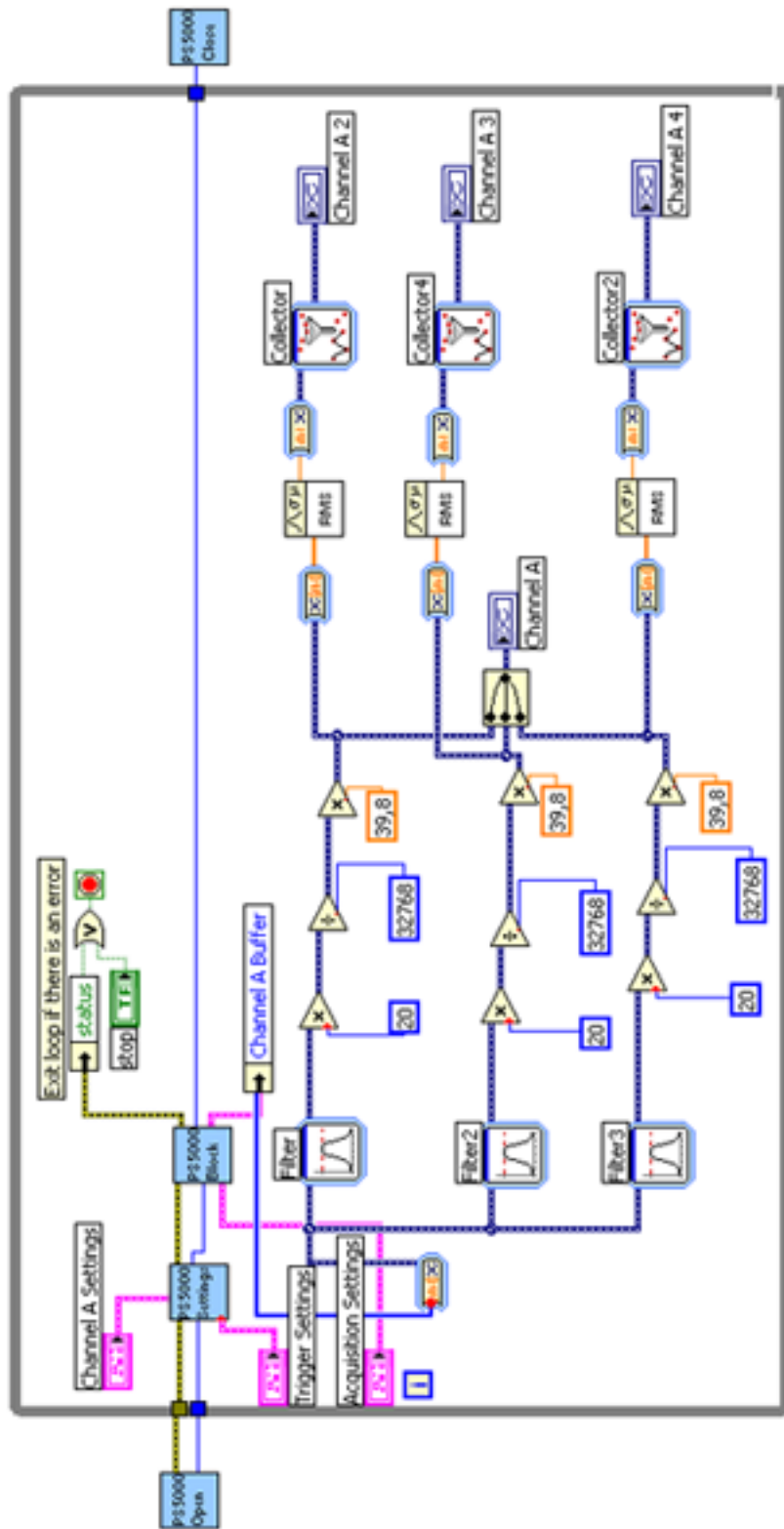
3.2. ábra. Hidrofont mérési elrendezés. A PicoScope által generált jel erősítéssel érkezik a kádhoz. A hidrofón az ultrahangos tisztító kádba merülve monitorozza a kád által kibocsátott jeleket, melyeket egy számítógép dolgoz fel.

A jelek valós idejű vizsgálatát egy **LabView** programmal végeztük.

A mintavételezés 1 MHz-en történt. A jelek először Butterworth szűrők segítségével frekvencia komponensekre lettek bontva. A használt sávszűrők paraméterei a következők:

- *Filter*: 35 kHz-45 kHz
- *Filter2*: 50 kHz-200 kHz
- *Filter3*: 250 kHz-400 kHz

A szűrést követően az egyes feszültségértékekből kiszámoltuk a nyomás szórását az idő függvényében. Mindez arra szolgált, hogy detektálni tudjuk a kavitációra utaló jeleket, melyek reményeink szerint megjelennek mind a kísérleti mintán, mind pedig a vizsgált spektrumon, így össze tudjuk kapcsolni a két eseményt. A következő oldalon található ábra a felhasznált LabView program blokkdiagramját mutatja be.



3.3. ábra. A méréshez használt LabView kód blokkdiagramja

3.3. Humán bőr modellek

3.3.1. Agar gél

A humán bőr modellezésére 3%-os agar hidrogélt használtunk, ami sűrűség (1030 kg m^{-3}) és a hang közegben való terjedési sebességét (1540 ms^{-1}) illetően nagy hasonlóságot mutat az emberi bőrhöz.[32, 33] A mintát meghatározott időre ultrahangnak tettük ki egy ultrahangos kád segítségével 40 kHz frekvencián. 3 percenként a kísérleti mintából szeleteket vágunk ($< 1 \text{ mm}$ vastagságú), amit mikroszkóp (Olympus, 10-szeres és 20-szoros nagyítás) alatt tanulmányoztunk, a keletkezett lyukak és járatok számát pedig feljegyeztük.

A járatok detektálására festékes oldatot (3.5 ml Coomassie blue oldat 200 ml vízben, 1,75% koncentrációban) használtunk, így azok könnyen feltérképezhetővé váltak.

3.3.2. Sertésbőr

Számos kísérlet során sertésbőrt alkalmaztunk az emberi bőr modellezésére, amit egy helyi piacról szereztünk be (kaszapi sertés). A modell használatának több olyan kutatómunkán alapul, amely arról számol be, hogy az állati eredetű bőrmodellek közül a sertés mutat a legnagyobb mértékű hasonlóságot a humán bőrhöz sűrűsége és akusztikai tulajdonságai miatt.[33]

3.3.3. Aluminium fólia

Aluminium fóliát használtunk a kísérleteink során a bőr stratum corneum rétegének modellezésére.

3.4. Inzulinkészítmények

A kísérletekhez háromféle inzulinkészítményt próbáltunk megfesteni, azonban csak az Actrapid inzulin esetében jártunk sikerrel.¹

3.4.1. Lantus

A Lantus egy glargin inzulinos injekciós oldat. A glargin inzulin rekombináns DNS technológiával, Escherichia coli segítségével előállított hosszú (akár 24 órás) hatású inzulin.

¹A készítmények alkalmazására még nem került sor, azonban jövőbeli terveink közt szerepel az eddig ételfestékekkel végzett kísérletek inzulinra történő átültetése, ehhez azonban egy specifikus festési módszerre van szükség, ami a bejuttatás detektálhatóságát teszi lehetővé.

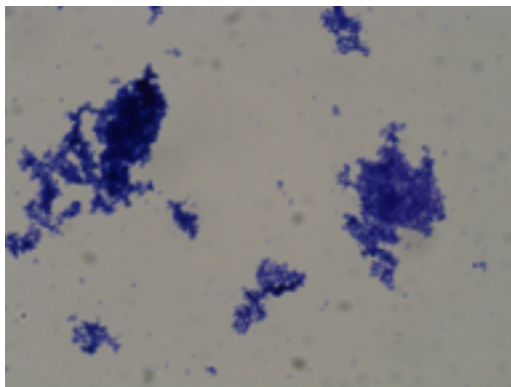
A glargin inzulin abban tér el a humán inzulintól, hogy az A21-es helyen aspargin aminosav helyett egy glycín és két arginin aminosav kapcsolódik a B-lánc C-terminusához. A Lantus minden millilitere 100 inzulinegységet tartalmaz.[34]

3.4.2. Actrapid

Az Actrapid egy gyors hatású inzulin, amit egy hosszú hatású inzulinnal kombinálva használnak. 1 ml Actrapid inzulin 100 inzulinegységnek felel meg. Egy tartály 1000 egységet tartalmaz. Tiszta, átlátszó, vizes oldat.

Humán inzulin, melyet rekombináns DNS technológiával állítanak elő *Saccharomyces cerevisiae*-ben.[35]

A bejuttatott inzulin könnyebb monitorozására érdekében az inzulint Coomassie Blue fehérjefestékkel jelöltük meg, amely csak az Actrapid inzulin esetében volt hatásos.



3.4. ábra. Actrapid inzulin Coomassie-blue festéssel 40x-es nagyítás alatt

3.4.3. Levemir

A Levemir 1 ml-es oldata 100 egységnyi detemir inzulint tartalmaz. A detemir inzulint rekombináns DNS technológiával állítják elő *Saccharomyces cerevisiae*-ben. A Levemir egy bázisinzulin, mely önmagában vagy bólus inzulinnal kombinálva adható. [36]

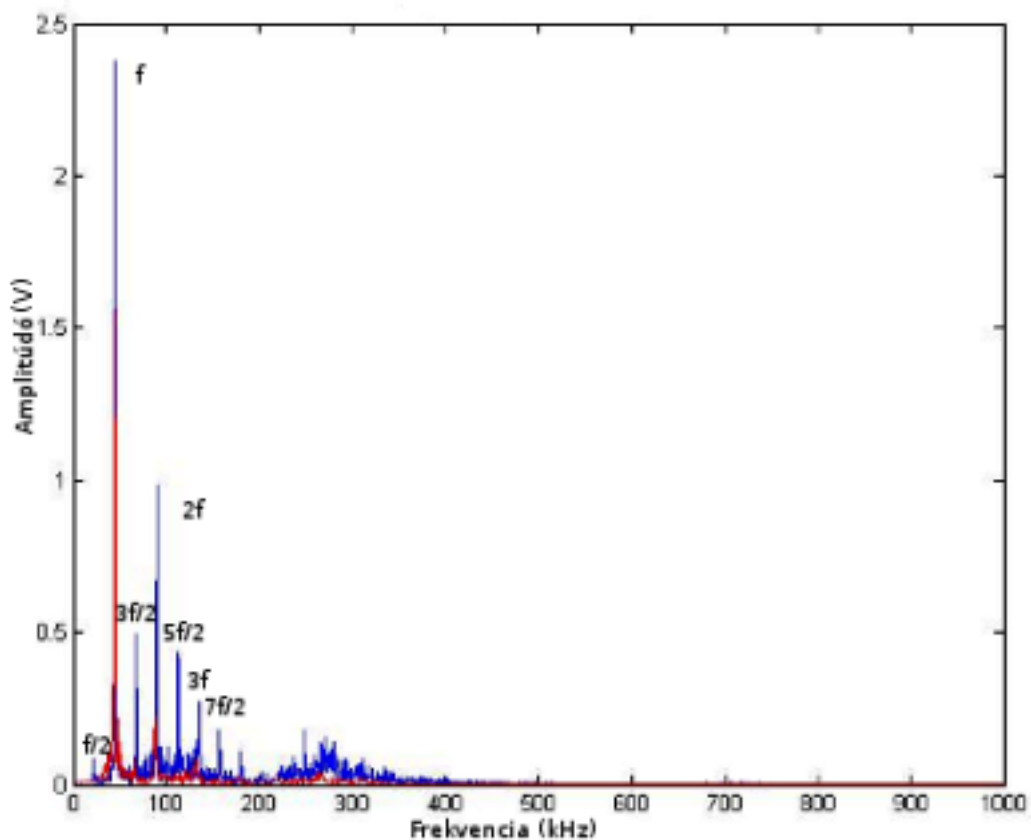
4. fejezet

Eredmények

4.1. Hidrofon mérések vízben

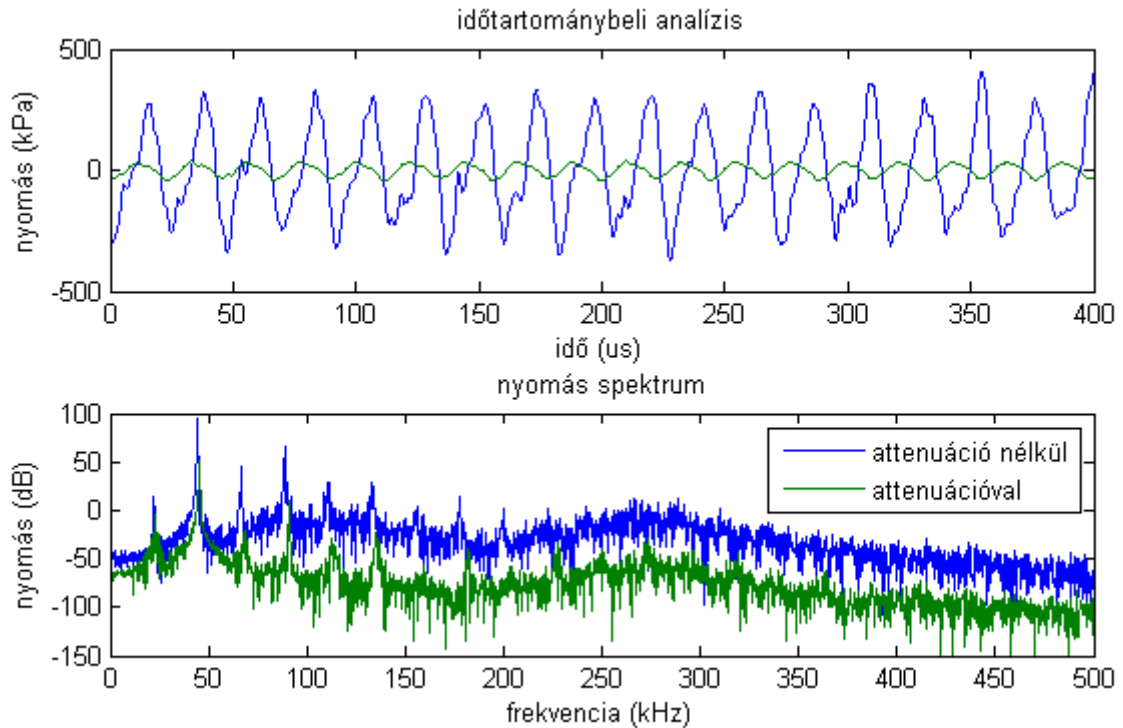
Egy hidrofont használtunk a jelek közvetlen detektálása érdekében. Az eszköz segítségével sikerült feltérképeznünk az ultrahangos kád és a plexi keretbe integrált transzducer jellemző frekvencia komponenseit, továbbá egy LabView kód segítségével lehetővé vált a jelek komponensek szerint történő valós idejű monitorozása is. Fontos szempontot jelentett az állóhullámok, így a túl nagy, vagy éppen a 0 intenzitású pontok megtalálása, ugyanis ezeknek jelentős élettani hatásai lehetnek egy ultrahangon alapuló eszközzel történő terápia során. A következőkben az erre tett kísérletek eredményei kerülnek ismertetésre.

Az ultrahangos kád által generált frekvencia jellemző komponenseit vizsgáltuk plexi jelenlétében (piros jel), illetve nélküle (kék jel), melynek eredménye a következő ábrán látható. A vártak szerint a piezo nemcsak a saját frekvenciáján (40 kHz) rezonált, hanem annak többszörösein is. A megfigyelt fel- illetve alhangok a stabil kavitációra engednek következtetni. Jelentős eltérés mutatkozik a két jel amplitúdó spektrumában. A kék jel esetében nagyobb az amplitúdó, így a szélessávú zaj mértéke is. Összességében megállapíthatjuk, hogy a plexi lemez nélkül jobb kavitációs értékeket érhetünk el.



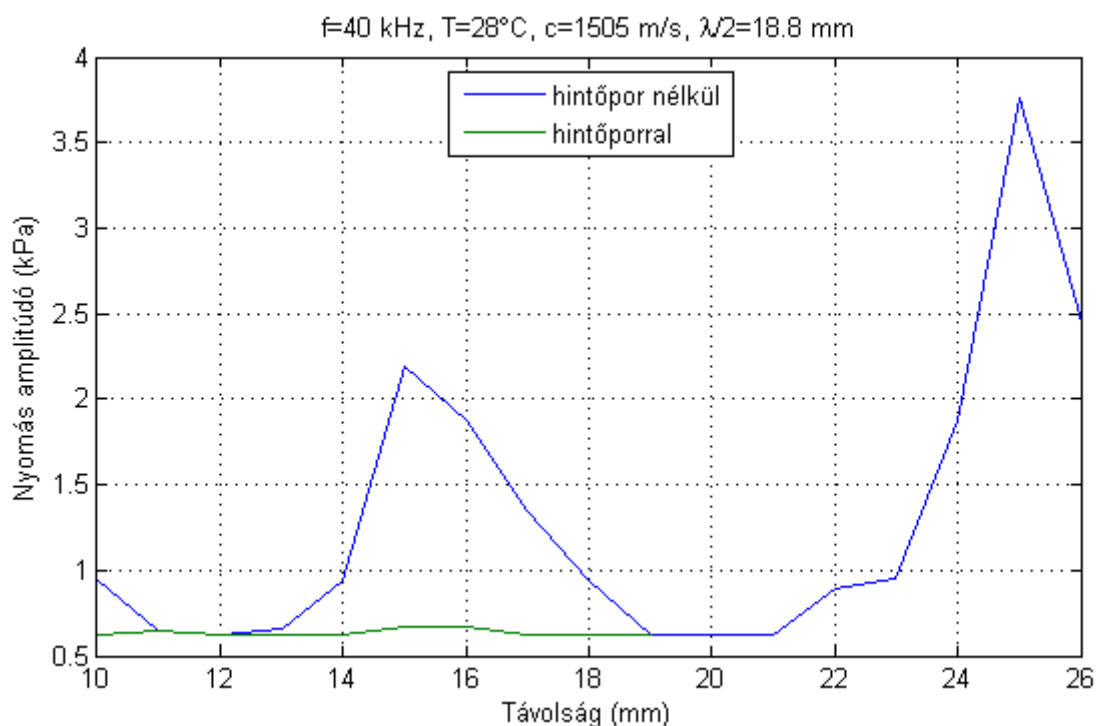
4.1. ábra. Hidrofonnal detektált jelek jellemző frekvencia komponensei. A mérés egy ultrahangos kád segítségével készült (40kHz, 35W). A pirossal jelölt jelet egy plexi szóró jelenlétében, míg a kék jelet kizárólag desztillált vizet tartalmazó közegben detektáltuk. A spektrumon jól láthatók a korábban leírt kavitációra utaló jellemző frekvencia komponensek, mint amilyenek az alharmonikusok: $f/2$, illetve felharmonikusok: $3f/2$ vagy $2f$. A plexi jelenlétében felvett jelek esetében a felharmonikusok jelentős mértékben csökkentek, különösen a $2f$ frekvencián, ami a stabil kavitáció egyik indikátora magasabb intenzitáson. A kék jel esetében sokkal nagyobb a szélessávú zaj mértéke, ami a jelentősebb mértékű tranziens kavitációt indikálja.

Az alábbi két ábrán az ultrahangos kádban észlelt nyomás amplitúdók láthatók plexi jelenlétében és anélkül.



4.2. ábra. Kavitáció detektálása az ultrahang szórására használt plexi lemezzel és anélkül. Az időtartományban a plexivel rögzített nyomás sokkal kisebb amplitúdójú és szinuszosabb, mint a plexi nélküli mérések során detektált jel. A plexi nélküli jelen tüskék figyelhetők meg a csúcsok körül, feltehetően a kavitáció eredményeként. A frekvencia tartományban mindkét jelen felharmonikusok és szélessávú zaj látható (körülbelül -60 dB-nél).

Az állóhullámok detektálásra és kiküszöbölésére hintőport használtunk, ami kavitációs magként szolgált. Azt tapasztaltuk, hogy számottevő a különbség a két detektált jel között. A várt eredménnyel szemben nem a $\lambda/4$ -nek (ahol a λ a 40 kHz frekvenciához tartozó hullámhossz adott hőmérsékleten) megfelelő vízmagasságnál detektáltuk a legnagyobb amplitúdót. Mindez feltehetően a 40 kHz harmonikusainak következménye. Hintőporral sokkal egyenletesebb a nyomásamplitúdó, ami az ultrahang szóródásának és újraalakulásának köszönhető.



4.3. ábra. Állóhullámok a vízszint függvényében hintőpor jelenlétében és nélküle

4.2. Kavitációs jelenség igazolása stratum corneum modellen

A kavitáció jelenségének direkt vizsgálatához egy diffúziós cellát használtunk, amit a csiszolatok rögzítését követően egy ultrahangos kádba helyeztünk.

A mérési elrendezést az alábbi ábra szemlélteti:



4.4. ábra. Diffúziós cella ultrahangos kádban. A cella alsó felébe ételfestékes vizet, míg a felső térrészbe desztillált vizet töltöttünk. A két térrészt egy aluminium fólia lap választotta el egymástól.

A kísérlettel azt kívántuk igazolni, hogy az ultrahang hatására keletkező buborékok kellő erősséggel csapódnak a fóliának ahhoz, hogy átlukasszák azt.

Azt feltételeztük, hogy amennyiben bármilyen lyuk keletkezik a fólián, az alsó lombikban levő festékes víz diffúzió útján elkezd átvámlani a felső térrészbe, aminek következtében szinte azonnal észlelni tudjuk a kavitációs jelenséget.

Az egyes mérések időtartama eltérő volt aszerint, hogy mennyi idő elteltével észleltük a jelenséget, illetve mekkora intenzitással (általában 3-6 perc).

Mindez nagy jelentőséggel bír számunkra, tekintettel arra, hogy hasonló folyamat játszódhat le akkor is, amikor inzulint szeretnénk átjuttatni a humán bőrön.

A kísérlet igazolta a feltevéseinket, az eredmény az alábbi képeken látható.



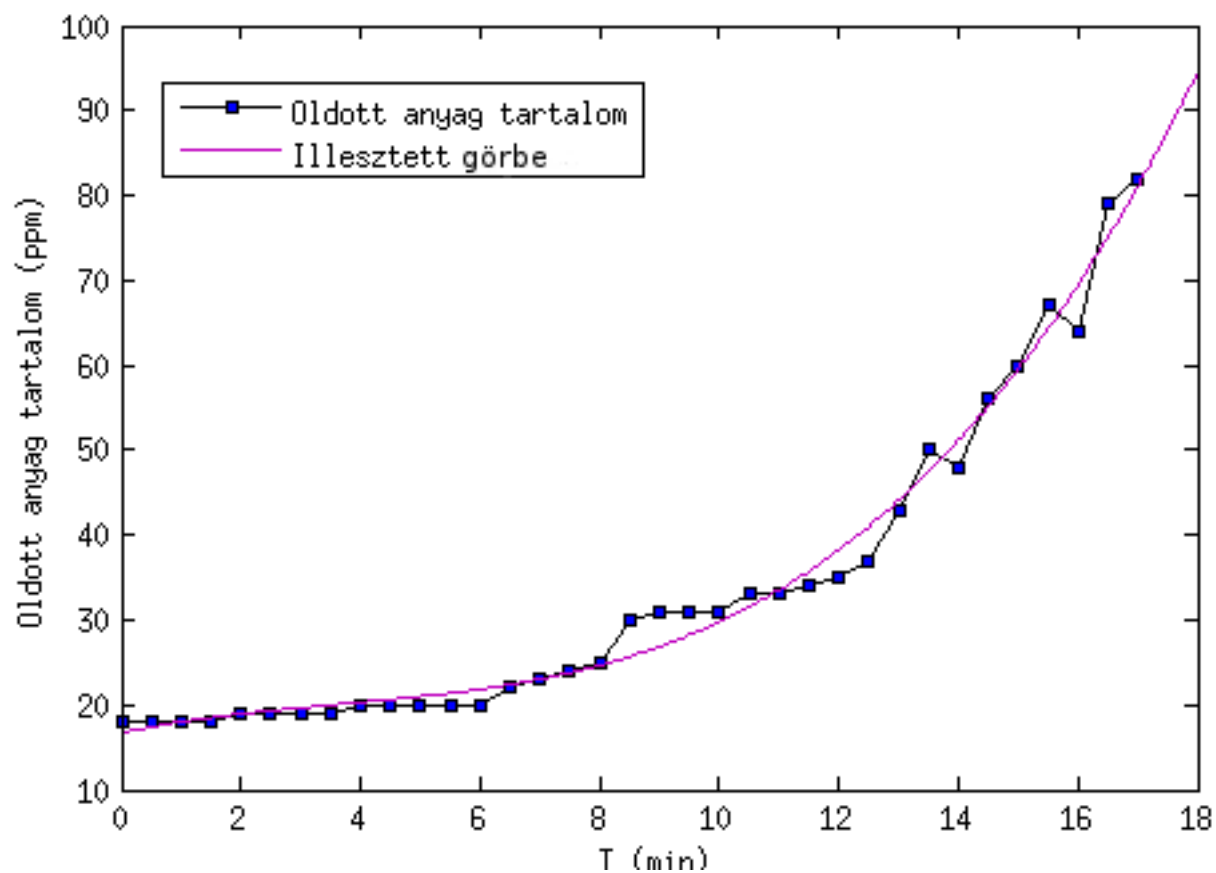
(a) Kontroll



(b) 6 perc után

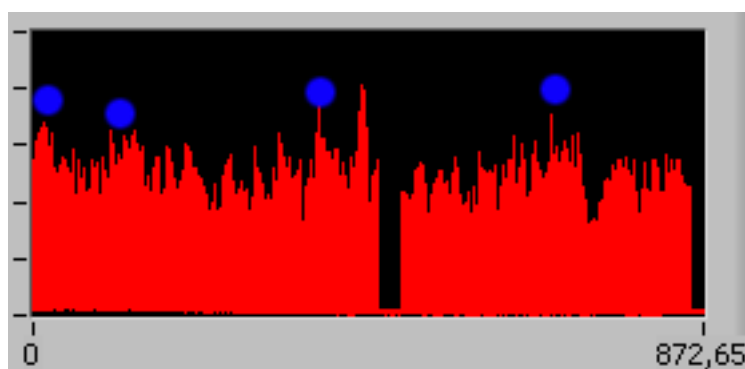
4.5. ábra. Diffúziós cellás kísérlet eredménye. Szemmel látható a különbség a két cella közt 6 perc elteltével, ami az alufólián keletkezett lyukakon át beáramló festéknek köszönhető.

A kavitációs jelenség bekövetkeztének igazolására egy újabb kísérletet végeztünk. A diffúziós cella alsó lombikjába csapvizet (oldott anyag tartalma 251 ppm), míg a felsőbe desztillált vizet (50 ml, 18 ppm) öntöttünk. A két térrészt alumínium fólia választotta el egymástól, így a két folyadék normál körülmények közt nem keveredett. A rendszert az ultrahangos kádba helyeztük, majd az idő függvényében monitoroztuk a felső térrészben levő folyadék oldott anyag tartalmának változását. Ehhez egy víztisztaság mérőt használtunk. Az eredményt a következő grafikon szemlélteti, ahol látszik, hogy az oldott anyag koncentrációja idővel emelkedik, majd elér egy maximális egyensúlyi értéket. Ez a növekedés a kavitáció során keletkezett apró lyukakon át beáramló csapvíz következménye.

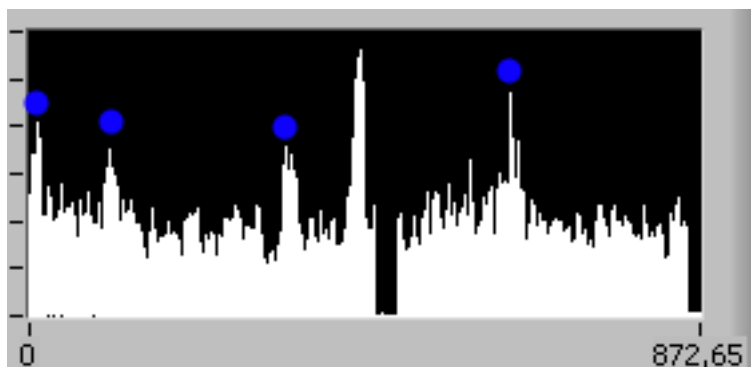


4.6. ábra. Az ábra a víz oldott anyag tartalmának változását mutatja be az idő függvényében.

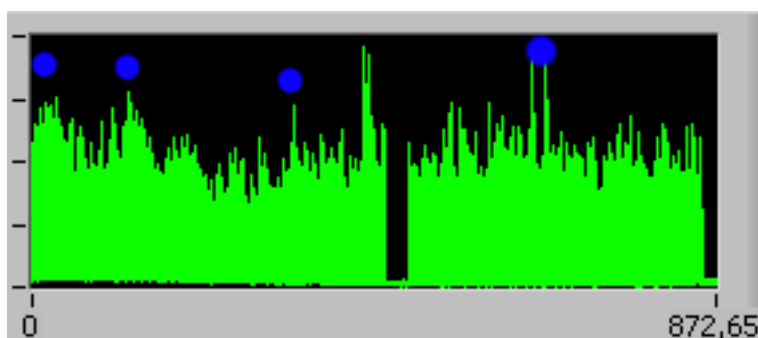
4.2.1. Akusztikai monitorozás



4.7. ábra. Akusztikai monitorozás stratum corneum modellen $50\text{--}200\text{ kHz}$ frekvencia tartományban. Kékkel vannak jelölve azok a csúcsok, melyeket az aluminium fólia átllyukadása során észleltünk. Az x tengely az idő másodpercben, az y tengely pedig még nem volt kalibrálva.



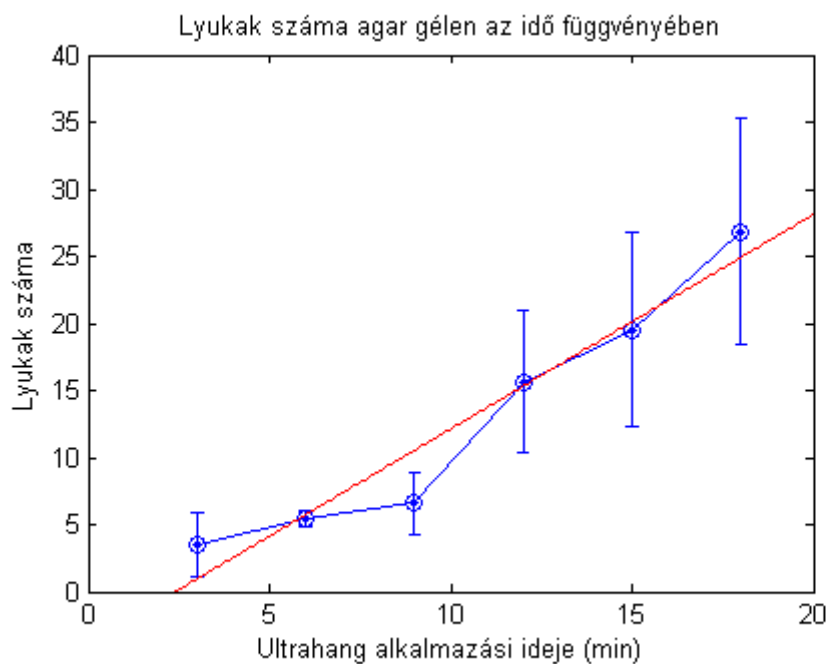
4.8. ábra. Akusztikai monitorozás stratum corneum modellen $35\text{-}45\text{ kHz}$ frekvencia tartományban. Kékkel vannak jelölve azok a csúcsok, melyeket az alufólia átlukadása során észleltünk. Az x tengely az idő másodpercben, az y tengely pedig még nem volt kalibrálva.



4.9. ábra. Akusztikai monitorozás stratum corneum modellen $250\text{-}350\text{ kHz}$ frekvencia tartományban. Kékkel vannak jelölve azok a csúcsok, melyeket az alufólia átlukadása során észleltünk. Az x tengely az idő másodpercben, az y tengely pedig még nem volt kalibrálva.

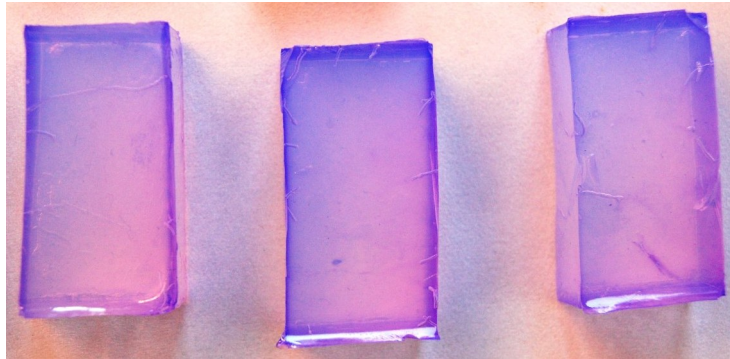
4.3. Ultrahang alkalmazása agar gélen

A kísérletek egy ultrahangos tisztítókád (40 kHz, 35 W) segítségével készültek. A minta térfogata minden mérés során 10x30x15 mm volt. A kísérletek eredményeiből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a keletkező lyukak száma egyenes arányosságban áll az ultrahang alkalmazási idejével.

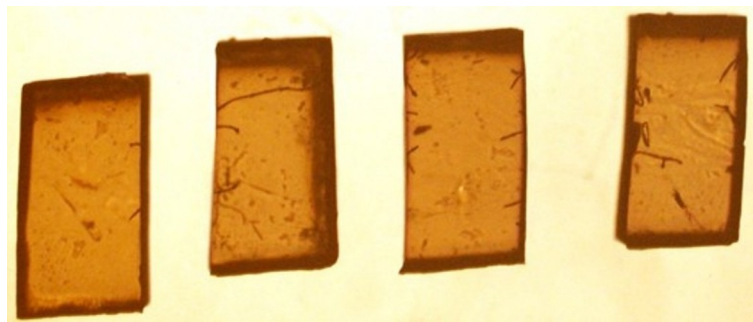


4.10. ábra. Lyukak száma az ultrahang (40 kHz, 35 W) alkalmazási idejének függvényében. A függőleges vonalak a standard szórást mutatják (n=6 mérés).

A kísérletet elvégeztük Coomassie Blue fehérjefestéket tartalmazó vízben is, így a szín intenzitásából is következtethetünk a bejutott festék mértékére. Az eredményeket az alábbi ábrák szemléltetik.

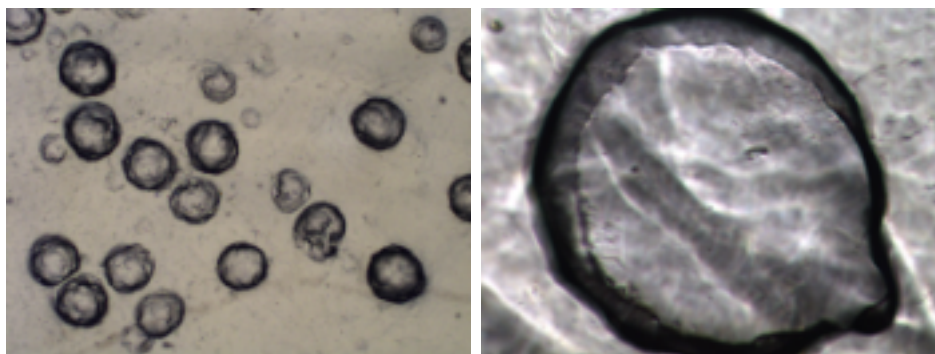


4.11. ábra. Balról jobbra az ultrahang alkalmazási ideje 3, 6, illetve 9 perc. Az agar "kéksége" a diffúzió során bejutott festéknek köszönhető, amely különösen nagy intenzitást mutat a járatok esetében.



4.12. ábra. Balról jobbra haladva az ultrahang alkalmazási ideje 0, 3, 6, illetve 9 perc. A képek projektor segítségével készültek. Az utolsó három kép megfelel az előző ábra mintáinak. Látható, hogy a projektor kiemeli a szonoforézis folytán keletkező járatokat.

Nagyon fontos paraméter a keletkező lyukak átmérője. Azt tapasztaltuk, hogy ez meglehetősen nagy szórást mutat, elérve a $400\text{ }\mu\text{m}$ -es átmérőt is, amin nemcsak az inzulin, de számos sokkal nagyobb fehérje is átjutna.

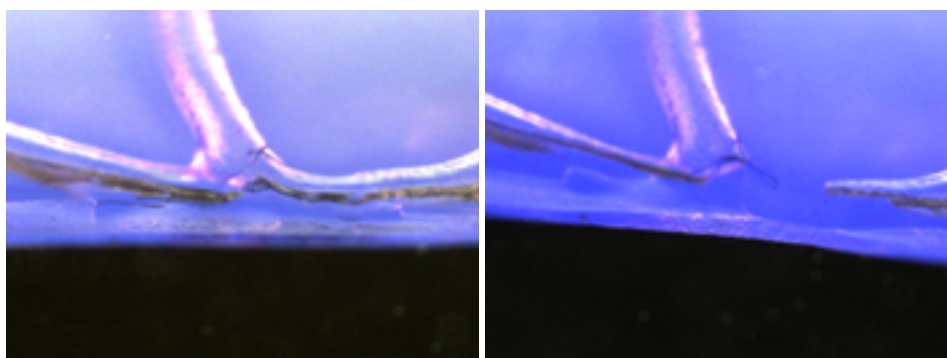


(a) 4x-es nagyítás

(b) 40x-es nagyítás

4.13. ábra. Ultrahang hatására keletkező lyukak agar gélen. A képek 4-szeres és 40-szeres nagyítás alatt készültek. A képen látható lyukak átlagos átmérője $400\text{ }\mu\text{m}$.

A járatok esetében azt a megfigyelést tettük, hogy bizonyos idő elteltével zárulnak, ami a lyukak keletkezésének egy reverz folyamatára enged következtetni.



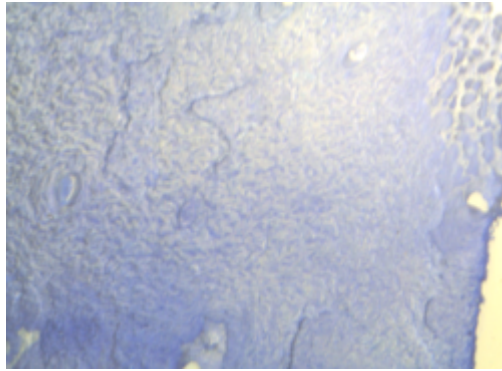
(a) 0 perc

(b) 6 perc

4.14. ábra. Járatok agar gélben 6 perc ultrahang alkalmazási idő után. Megfigyeltük, hogy néhány perc elteltével a járatok bezárultak. A megfigyelésből arra következtetünk, hogy bár az agar gél nem egy élő szövet, a transzport régiók (LTR: Localised Transport Region) kialakulása mégis egy reverz folyamatnak bizonyul. Ezt a megfigyelést is alapul véve, egy hasonló folyamatot feltételezünk a bőrszövet esetében is.

4.4. Ultrahang alkalmazása sertésbőrön

A sertésbőrt egy ultrahangos kád segítségével 6 percig ultrahangnak tettük ki. A kísérlet során a kád transzducerhez tartozó bemélyedésébe ultrahangos zselé került, ami közvetlenül a sertésbőr felszínére vezette az ultrahangot. A mérést követően mikrotóm segítségével $50\mu\text{m}$ vastagságú szeleteket vágunk a kísérleti és a kontroll mintából. A minta tárgylemezre helyezését követően Coomassie Blue fehérjefestékekkel megfestettük a szövetet, amit így könnyebben tudtunk vizsgálni mikroszkóp alatt.¹ A képen látható szövet és a kontroll minta közt nem figyeltünk meg számottevő különbséget.



4.15. ábra. Sertésbőr 6 perc ultrahangos kezelés követően.

4.5. Kavitáció-detekció

A kavitáció követése mind akusztikai, mind pedig az impedancia változás monitorozásával az alábbi mérési elrendezés szerint történt:

¹A sertésbőr festése Hematoxylin és Eosin (H&E) festéssel történik laboratóriumi körülmények között. A bejuttatás tényének legkorszerűbb vizsgálati módszere immunhisztokémiai úton történik, az inzulinhoz kapcsolódó speciális antitestek segítségével.

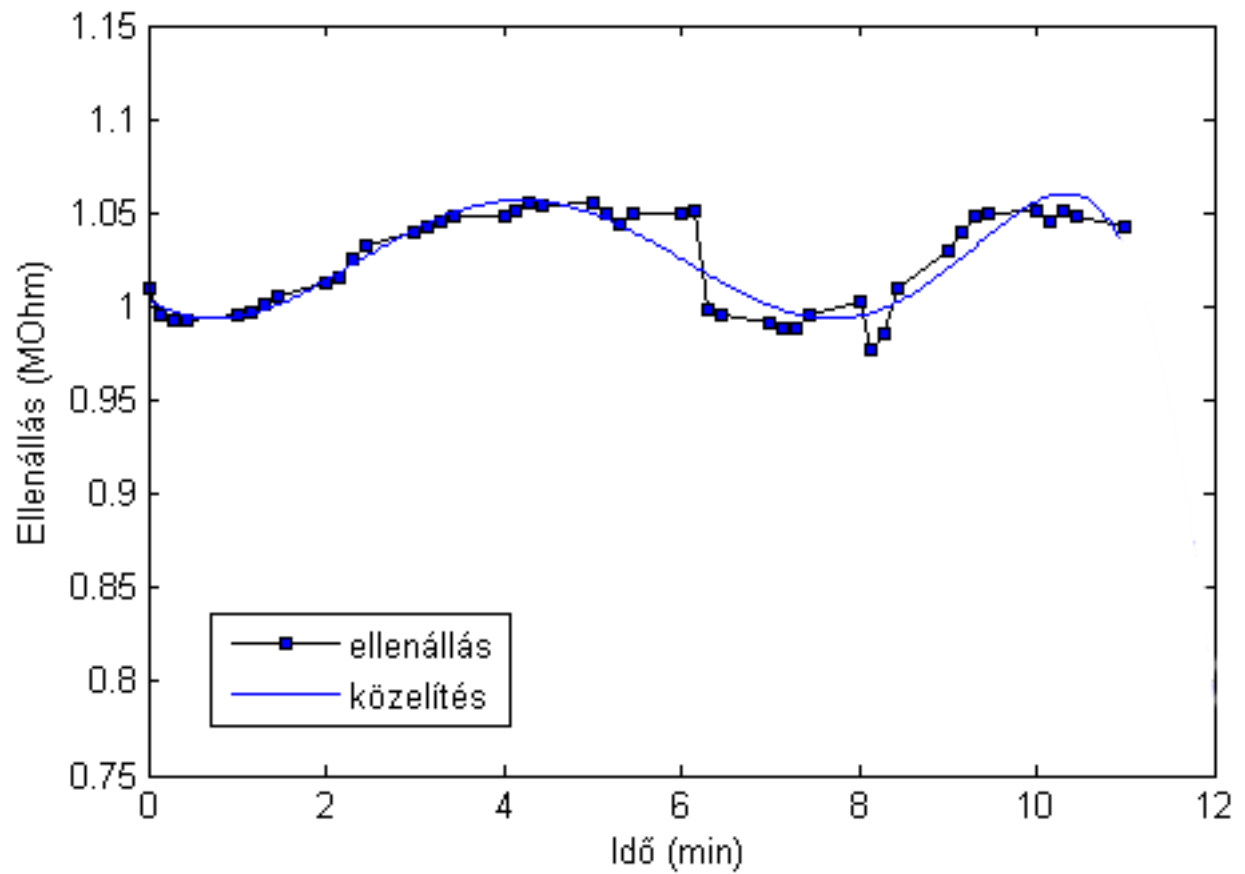


4.16. ábra. Sertésbőr kísérleti elrendezése. A cella felső kompartmentje 1% -os PBS oldatot, míg az alsóba csapvizet töltöttünk. A felső térrészbe helyeztük a hidrofont és a multiméter egyik kivezetését. A multiméter másik kivezetését a mintavevő csőbe rögzítettük. A detektált jelek számítógép segítségével lettek feldolgozva.

A kísérletek során nagy nehézséget jelentett, hogy nem sikerült izolálnunk a stratum corneumot, ez a jövőben egy megoldandó problémát jelent. A kísérleti eredmények során figyelembe kell vennünk, hogy a bőr sokszor már ki volt száradva, mire a laborba érkezett, illetve vastag zsírréteget tartalmazott, így a stratum corneum modellel (aluminium fólia) ellentétben nem sikerült közvetlenül megfigyelnünk a kavitáció hatását.

4.5.1. Impedancia változás monitorozása

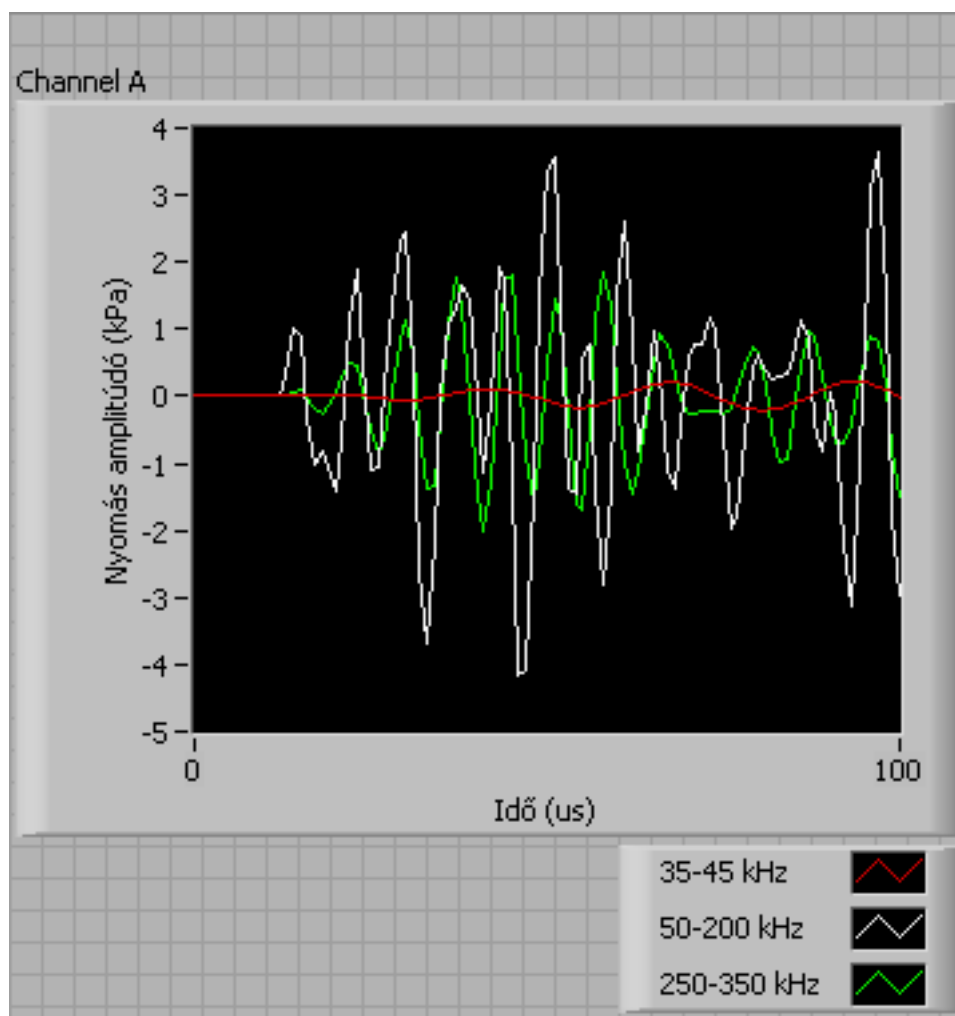
A kísérlet során az impedancia változása során tapasztalt értékek nem informatívak, nem tudunk belőlük kavitációra következtetni. Az eredményeket az alábbi grafikon szemlélteti:



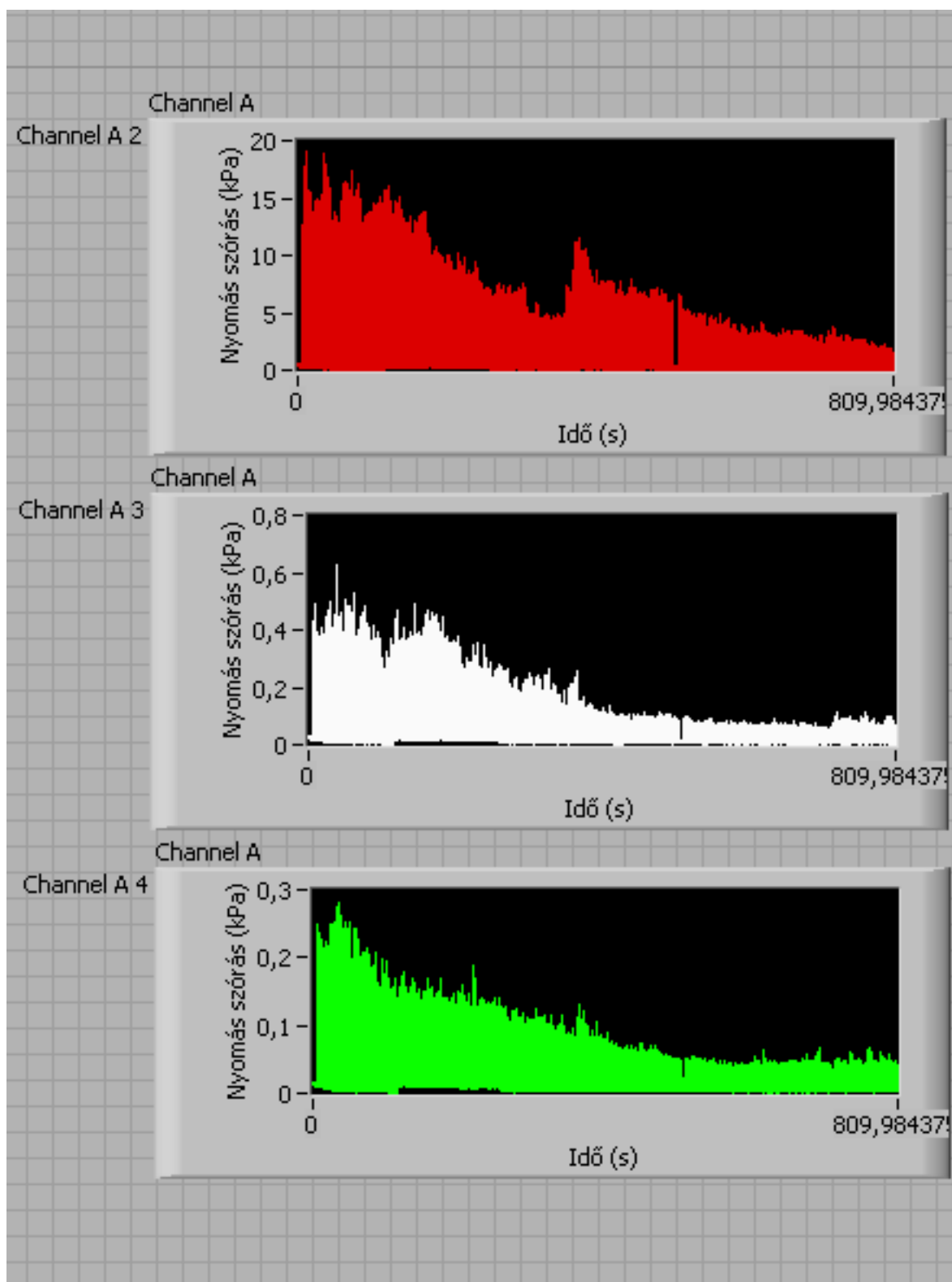
4.17. ábra. Az impedancia mérés eredménye sertésbőrrel való kísérlet során

4.5.2. Akusztikai követés

Az *Eszközök és eljárások* fejezetben bemutatott LabView program segítségével valós időben analizáltuk a mérések során észlelt jeleket, amit az akusztikai követés során használtunk fel. A kísérlet a korábbi elrendezéstől annyiban tért el, hogy az ultrahangos kádba helyezett diffúziós cella alsó, stratum corneum felé néző kompartmentje piros ételfestéket tartalmazott. A kísérlet során egy kontroll mintát is készítettünk: egy Petri-csészébe a diffúziós cellában lévő mintával azonos tulajdonságú bőrt tettünk, majd 50 ml ételfestékes vízzel (a diffúziós cellában levő festékkel megegyező koncentrációban) leptük el. A kísérlet időtartama megközelítőleg 12 perc volt. Az akusztikai mérések eredményét az alábbi ábrák szemléltetik:



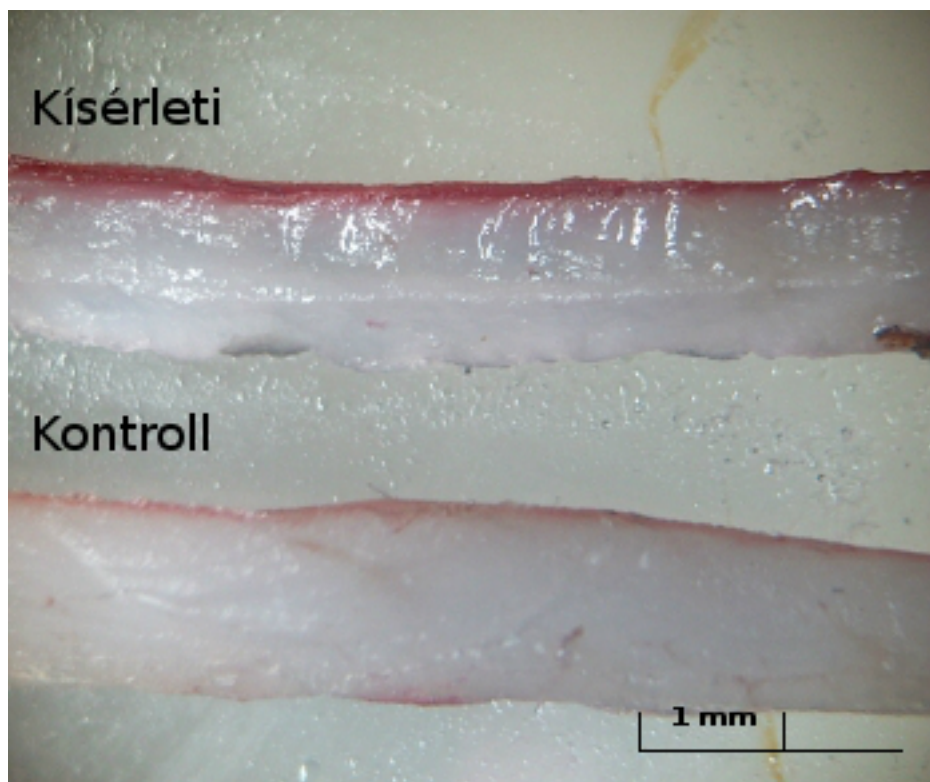
4.18. ábra. A mérés során észlelt nyomás amplitúdók frekvencia sávok szerint



4.19. ábra. Az akusztikai mérések során észlelt nyomások szórása

Az egyes jelek frekvencia tartományai: *piros jel* - 35-45 kHz, *fehér jel* - 50-200 kHz, *zöld jel* - 250-350 kHz

Alufóliával végzett kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy az aluminium fólia kavitáció hatására bekövetkező kilyukadása a spektrumon egy-egy nagyobb (akár 48.8 kPa) nyomás amplitúdóban nyilvánult meg. Ez alatt a kísérlet alatt is hasonló eredményt vártunk. A spektrum exponenciális csökkenése a kavitációs buborékok számának csökkenéséből adódnak. További ok lehet a buborékok nagy mértésű növekedése, amelyek összeroskadására már nem elegendő a rendszerben levő nyomás. Ez orvosolható a külső nyomás, illetve a kavitációs magok számának növelésével. Az ultrahangnak nem sikerült teljes keresztmetszetében átlukasztania a sertésbőrt, ami feltehetően annak köszönhető, hogy egyes kísérletek során a sertésbőr tartalmazta a dermist, illetve több esetben már ki volt száradva a bőr, mire a laborba került. A kísérleti mintát összevetettük a kontroll mintával, és azt tapasztaltuk, hogy a kísérleti mintába több festék jutott be, elérve a kb. 100-150 μm mélységet is, ami már elegendő lehet a transzdermális hatóanyag bejuttatás sikeréhez.



4.20. ábra. Ultrahangot alkalmazva számottevő a különbség a kísérleti és a kontroll mintába bejutott festék mennyisége között. A piros festékes rész a *stratum corneum*. A képek 10x-es nagyítás alatt készültek.

5. fejezet

Inzulinpumpa terve

5.1. Insulinadagoló "prototípus"

Egy korábbi fejezetben említett piezoelektromos lapka egy speciális, erre kialakított plexi tartóba lett integrálva, olyan elrendezésben, amely lehetővé teszi az inzulin vagy más hatóanyag bejuttatását. A tartó két kompartmentből áll: az alsó, kisebb rész tartalmazza a bejuttatni kívánt hatóanyagot, míg a felső nagyobb térbe izotóniás (például 1%-os PBS) oldat kerül, amely fenntartja a sejt normális fiziológiás működéséhez szükséges pH értéket. A sertésbőr stratum corneumot tartalmazó oldala a bejuttatni kívánt anyag kompartmentje felé néz.¹

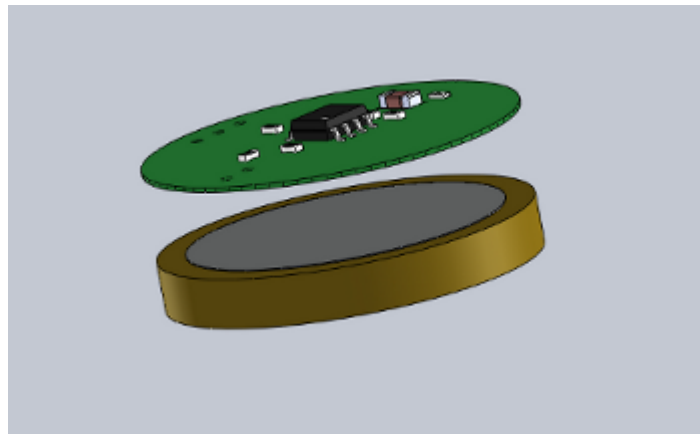


5.1. ábra. Insulinadagoló "prototípusa". Az alsó (1), kisebb térfogatú rész az inzulin számára, a nagyobb (2), felső térrész PBS oldat számára lett kialakítva.

¹Az adagolóval történt első kísérletek eredményei nem kerültek rögzítésre, teszt jellegűek voltak. Egy további kísérlet során pedig túl magas feszültség alkalmazása miatt a piezo túlmelegedett, így az egyik forrasztás mentén a kerámia elrepedt. Ennek következtében egyelőre nem volt mód az eszközzel történő további kísérletek elvégzésére.

5.2. Inzulinpumpa modell

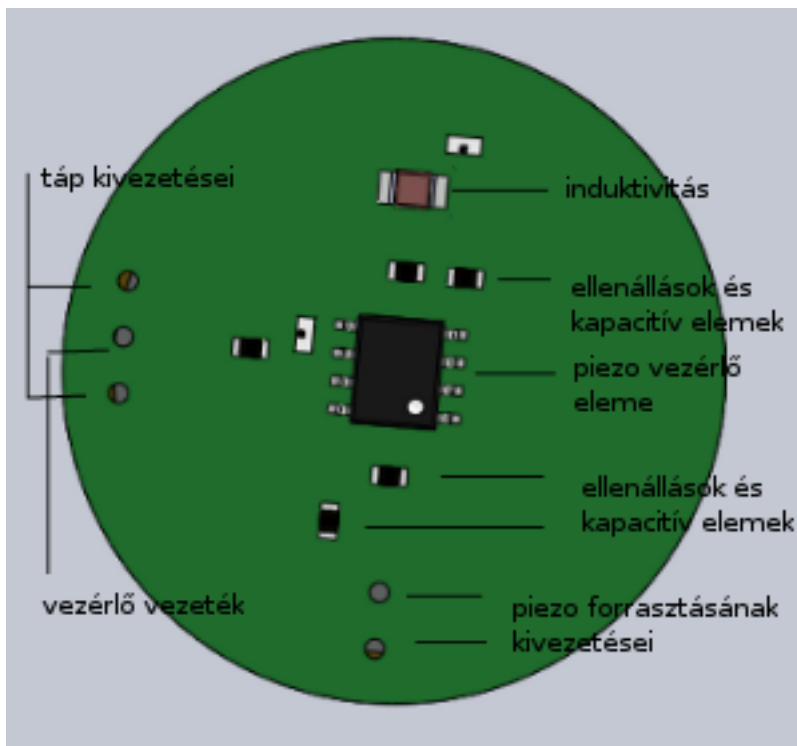
Az alábbi alfejezet egy ultrahang alapú készülék vázlatos tervét tartalmazza, melynek elkészítésében *Pap Gábor*, molekuláris bionikus hallgató volt segítségünkre. A pumpa működési frekvenciája és intenzitása a transzducer és a hozzá tartozó táp megválasztásával szabályozható. Az eszköz tervezett átmérője 3 cm, magassága pedig nem éri el a 2 cm-t sem, így a mérete jelentősen kisebb, mint egy átlagos inzulinpumpaé.²



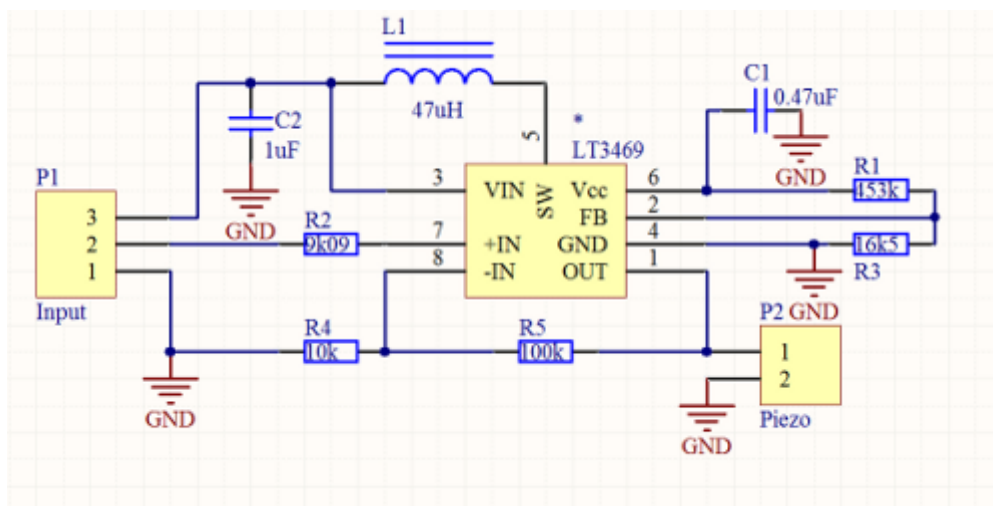
5.2. ábra. Inzulinpumpa transzducerének és vezérlőjének modellje

A pumpa piezo transzducerének vezérlését az alábbi képen látható panel látja el. A táp a panelen fog elhelyezkedni, így is csökkentve a pumpa méretét.

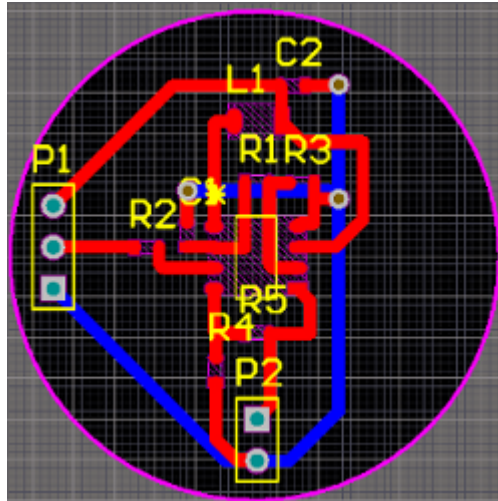
²A tervek SolidWorks és Altium Designer tervező programokkal készültek.



5.3. ábra. Inszulinpumpa transzducerének vezérlője

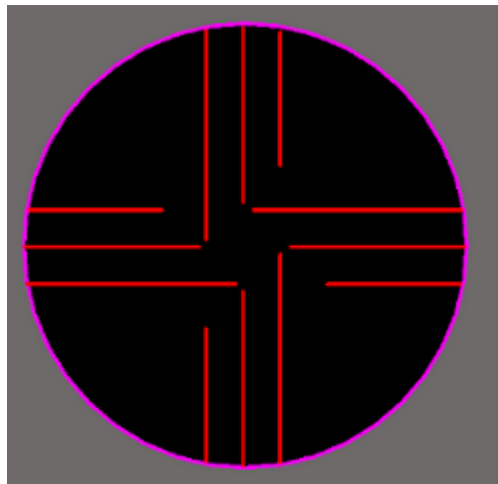


5.4. ábra. A transzducert vezérlő áramkör rajza



5.5. ábra. A transzducert vezérlő áramkör nyomtatott áramköri modellje

A pumpa lehetővé teszi akár 450 egységnyi inzulin tárolását és adagolását. Az inzulin bőrre juttatásához speciális csatorna elrendezésű mikrofluidikai eszköz áll majd rendelkezésünkre, amely minél egyenletesebb adagolást biztosít, miközben igyekszik maximálisan lefedni a transzducer alatti bőrfelületet. Az inzulin tartály a vezérlő fölött helyezkedik el és 12 megközelítőleg $100\ \mu\text{m}$ átmérőjű csatornában folytatódik. A csatornák hossza elhelyezkedésük szerint eltérő.



5.6. ábra. Csatorna elrendezés. Az egyes csatornák (piros) átmérője megközelítőleg $100\ \mu\text{m}$ -esek.

A fenti pumpa további eleme egy apró hidrofon (ez az ábrán nincs feltüntetve), amely a rendszer bekapcsolása esetén folyamatos akusztikai monitorozást fog végezni. A hidrofon mellett a pumpa elengedhetetlen része lesz a rádiófrekvenciás vevő illetve továbbító egység, amely a bejuttatni kívánt hatóanyag mennyiségének szabályozásában tölt be központi szerepet. A pumpa által regisztrált és küldött adatok feldolgozást egy külső eszköz végzi. Ennek okostelefonnal vagy karórával való megvalósítására található szabadalmi példa. A gyakorlatban főként az előbbi mód van elterjedőben.

A rendszer egyik előnye, hogy az inzulin nem érintkezik folyamatosan a bőrfelülettel, így csak annyi inzulin van közvetlenül kitéve ultrahangnak, amennyi egy-egy bejuttatás során szükséges. Ez egy fontos szempont a szonoforézis alapú készülékek megalkotása során, ugyanis az ultrahang inzulinra gyakorolt hatása nem pontosan feltérképezett. Az eszköz további előnyeikhez tartozik mindaz, amit ezen dolgozat fő motivációjaként fogalmaztunk meg, ugyanis egy fájdalommentes, tű nélküli inzulin adagolási módot tesz lehetővé.

6. fejezet

Konklúzió

A dolgozat során áttekintettük mindazokat a módszereket és eszközöket, melyeket egy megbízható inzulin adagolórendszer kialakítása érdekében használhatunk. A kísérletek során a humán bőr modellezésére használt modelleken az ultrahang alkalmazását követően az inzulin bejutására alkalmas, akár 400 μm átmérőjű lyukakat figyelhattunk meg, melyek feltehetően a kavitációs hatás eredményeként keletkeztek.

A klinikai használat szempontjából a túl nagy átmérőjű pórusok nemcsak a bejuttatni kívánt hatóanyag számára biztosítanak szabad utat, hanem a kórokozóknak is. Ez az átmérő azonban könnyedén csökkenthető a frekvencia növelésével (100kHz).

A sertésbőrrel végzett kísérletek eredményeként sikerült bebizonyítani, hogy szonoforézissel valóban növelhető a bőr permeabilitása egy adott anyagra nézve.

Nagy előrelépést jelent, hogy sikerült egy olyan elrendezésű rendszert kialakítanunk ("inzulinadagoló prototípus"), amelybe a sertésbőrt csavarokkal rögzítve egyszerűbb módon tudjuk vizsgálni a kavitációs hatást, szemben az ultrahangos káddal, amely a szimultán hatóanyag bejuttatást nem teszi lehetővé. Az még nem ismert pontosan, hogy az ultrahangnak milyen inzulin károsító hatása van.

Mind az ultrahangos kád, mind pedig az "inzulinadagoló prototípus" által kibocsátott jelek analizálása során megfigyelhattunk kavitációra utaló komponenseket, mint amilyenek az al- és felharmonikusok, továbbá a 250-350 kHz-es tartományban jelentkező szélessávú zaj. Ami nagyobb nehézséget jelent, az a bevitt hatóanyag kellő mélységre történő bejutásának vizsgálata. Az inzulinnak - jelenlegi tudomásunk szerint - nincs specifikus festéke, így egy rendelkezésünkre álló fehérje festéket alkalmaztunk, amely különösen nagy hatékonyságot mutatott főként az Actrapid inzulin esetében. Mindez azonban egy további kérdést vet fel, ugyanis nem ismerjük pontosan a festék inzulinhoz való kötődésének és hatásának mechanizmusát,

azonban ha a módszer hatékonynak bizonyul (például az inzulinhoz való kapcsolódást követően nem kapcsolódik további fehérjéhez, nem befolyásolja az inzulin szerkezetét és hatását), akkor a szövettani vizsgálatok során használt immunhisztokémiai jelöléssel szemben meglehetősen költséghatékony módon tudnánk igazolni a hatóanyag bejutásának tényét.

Az inzulinpumpa áramköri terve és a csatorna maszkterve alkalmas nyomtatásra, a panel-terv megfelelő konverzió után egy 3D nyomtató segítségével kerül majd elsőként kivitelezésre.

Mindezek biztató eredmények, ennek alapján úgy gondoljuk, hogy jó kiindulási pontot jelentenek a jövőbeli kutatásainkra nézve.

7. fejezet

Továbblépési lehetőségek

A jövőben a fő hangsúlyt a kavitáció követésére szeretnénk helyezni, ugyanis számos szonoforézis alapú rendszer létezik már, viszont jelentős részük nem rendelkezik megfelelő monitorozással, amely lehetővé tenné az eszköz mindennapi biztonságos használatát. [15, 37, 14]

Az akusztikai méréseken alapuló monitorozási technikával szeretnénk képet kapni a kavitáció mértékéről. A monitorozás során számunkra releváns frekvenciatartomány a szélessávú zaj tartományába esik (azaz kb. 250-350 kHz), ugyanis a felharmonikusok nemcsak a kavitációból származhatnak, hanem az ultrahangnak kitett szövet válaszából is, így a detektált jelek megteveszthetők lehetnek, nem vezetnének pontos eredményre. A szélessávú zaj esetében azonban nem áll fenn ennek a veszélye, a bőrnek nincs szélessávú jelet generáló válasza az ultrahangos kezelés során.

A diabétesz terápiának egy meglehetősen fontos paramétere a bejuttatott inzulinmennyiség pontos ismerete, főleg gyerekek esetében, ahol az egységnyi inzulin törtrésze is jelentős hatással van a vércukor értékére. Ezért is fontos egy megbízható rendszer kialakítása során a nemkívánatos jelek kiszűrése.

A hatóanyag-bejuttató rendszer egyik fontos eleme lenne egy beintegrált hidrofon, ami a jelek felvételét végezné. A felvett jelek ezt követően rádiófrekvencián közvetlenül egy külső eszközre (például okostelefonra) juttathatók, ahol megfelelő szoftver segítségével feldolgozhatók, és a kapott eredmény függvényében következtethetünk a bejutott inzulin mennyiségére.

A bejutott inzulinnak a bőr felszínétől számítva kb. 100-200 μm mélyre kell eljutnia. Ahhoz, hogy igazolni tudjuk, hogy az általunk alkalmazott technikával elérhető ez az érték, kontrollként a továbbiakban is sertésbőrt szeretnénk használni, melybe bejuttatjuk az inzulint.

Ezt követően kb. 5 μm vastagságú szeleteket vágunk mikrotóm segítségével (ez a szöveti festések során alkalmazott szelet vastagság), majd immunhisztokémiai úton az inzulinra specifikus antitestes jelölést használva fülreszcens fény alatt kimutatható a bejuttatás ténye.

A kísérleteink eredményei számos kérdéskört vetnek fel:

- Hogyan hat az ultrahang az inzulinra?
- Van-e az inzulinak kavitációt befolyásoló hatása?
- Mik azok az ultrahang paraméterek, amelyek teljes mértékben kiküszöbölik a szöveti károsodást?
- Mi a legmegfelelőbb inzulinjelölési módszer, amely kizárólag az inzulinra specifikus és költséghatékony is?
- Hogyan tudjuk minél pontosabban meghatározni a szélessávú zajból a bejuttatott inzulin mennyiségét?

Mindezen kérdések megválaszolása nagyon fontos eleme a jövőbeli munkáknak. A legnagyobb célunk egy hordozható, megfelelő akusztikus monitorozással, kifinomult dozírozással rendelkező eszköz megalkotása, amely a vércukor folyamatos mérését (akár mikrofluidikai úton) is lehetővé tenné. Az eszköz mind a beadott inzulinegységek, mind pedig a vércukorértékek tárolására is alkalmas lehetne, így biztosítva azok könnyed visszakeresését és folyamatos kontrollját. Az első, ehhez hasonló eszköz kezdetleges tervét ezen dolgozatban szemléltettük, azonban a pontos dozírozási paraméterek beállítása, a megfelelő frekvencia és intenziátás megválasztása megoldandó feladatot jelentenek.

Irodalomjegyzék

- [1] E. G. Moser, A. A. Morris, and S. K. Garg, „Emerging diabetes therapies and technologies,” *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 97, pp. 16–26, 2012.
- [2] J. C. Pickup, „Management of diabetes mellitus: is the pump mightier than the pen?” *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 8, pp. 425–433, July 2012.
- [3] R. A. Harvey and Y. Wang, „Quest of artificial pancreas,” *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, vol. 29, pp. 53–62, 2010.
- [4] C. Cobelli, „Diabetes: Models, signals, and control,” *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, vol. 2, pp. 54–69, 2009.
- [5] D. T. Hidvégi, *Az inzulinpumpa kezelés elmélete és gyakorlata*. Melánia Kiadó Kft. ISBN: 978-963-9740-16-7, 2009.
- [6] A. Fonyó, *Élettan gyógyszerészhallgatók részére*, K. Györgyné, Ed. Medicina, 2003.
- [7] M. Redondo and G. Eisenbarth, „Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes and associated disorders,” *Diabetologia*, vol. 45, p. 605–622, 2002.
- [8] K. Lukács, „Az 1-es típusú diabetes mellitus genetikai háttere, patogenezise és a legújabb prevenciók kutatások helyzete,” *Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle*, vol. 1, no. 2, pp. 51–62, április 2007.
- [9] L. Korányi and P. Pánczél, „A diabetes mellitus genetikája,” *LAM-TUDOMÁNY*, vol. 14, pp. 495–505, 2004.
- [10] I. Douek, K. Gillespie, R. Dix, P. Bingley, and E. Gale, „Three generation of autoimmune diabetes: an extended family study,” *Diabetologia*, vol. 46, pp. 1313–8, 2003.
- [11] S. Howell, *Insulin biosynthesis and secretion*, J. Pickup and G. Williams, Eds. Oxford: Blackwell Sci Publ, 1991.

- [12] K. Stewart, M. Wilson, and J. Rider, „Insulin delivery devices,” *J Pharm Pract*, vol. 17, pp. 8–20, 2004.
- [13] O. M. Al-Bataineh, K. Lweesy, and L. Fraiwan, „In-vivo evaluation of a noninvasive transdermal insulin delivery system utilizing ultrasound transducers,” *Journal of Medical Imaging and Healths Information*, vol. 1, no. 3, pp. 267–270, 2011.
- [14] Boucaud, L. Tessier, L. Machet, L. Vaillant, and F. Patat, „Transdermal delivery of insulin using low frequency ultrasound,” *IEEE Ultrasonic Symposium*, vol. 2, pp. 1453–1456, 2000.
- [15] M. R. Prausnitz, S. Mitragotri, and R. Langer, „Current status and future potential of transdermal drug delivery,” *Nature Reviews*, vol. 3, pp. 115–124, 2004.
- [16] A. Tezel, A. Sens, and S. Mitragotri, „Investigations of the role of cavitation in low-frequency sonophoresis using acoustic spectroscopy,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 61, no. 2, pp. 444–453, 2002.
- [17] D. Levy, J. Kost, Y. Meshulam, and R. Langer, „Effect of ultrasound on transdermal drug delivery to rats and guinea pigs,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 83, pp. 2974–2978, 1989.
- [18] K. Saroha and B. Sharma, „Sonophoresis: An advanced tull in transdermal delivery system,” *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, vol. 3, pp. 1–9, 2011.
- [19] H. Kalluri and A. K. Banga, „Transdermal delivery of proteins,” *Review, AAPS PharmaSciTech*, vol. 12, no. 1, pp. 431–439, March 2011.
- [20] J. J. Escobar-Chávez, D. Bonilla-Martínez, M. A. Villegas-González, I. M. Rodríguez-Cruz, and C. L. Domínguez-Delgado, „The use of sonophoresis in the administration of drugs throughout the skin,” *J Pharm Pharmaceut Sci*, vol. 12, pp. 88–115, 2009.
- [21] J. Chávez, „The use of sonophoresis in the administration of drugs throughout the skin,” *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, vol. 12, pp. 88–115, 2009.
- [22] T. Terahara and S. Mitragotri, „Dependence of low-frequency sonophoresis on ultrasound parameters; distance of the horn and intensity,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 235, pp. 35–42, 2002.

- [23] B. Polat, D. Hart, R. Langer, and D. Blankschtein, „Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: Mechanisms, scope, and emerging trends,” *Journal of Controlled Release*, vol. 152, p. 330–348, 2011.
- [24] I. R. Henderson, Ed., *Piezoelectric ceramics, Principles and Applications*, 2nd ed. APC International, Ltd., 2012.
- [25] A. Tezel, A. Sens, and J. Tuchscherer, „Frequency dependence of sonophoresis,” *Pharmaceutical Research*, vol. 18, pp. 1694–1700, 2001.
- [26] S. Mitragotri, J. Farrell, H. Tang, T. Terahara, and J. Kost, „Determination of threshold energy dose for ultrasound-induced transdermal drug transport,” *Journal of Controlled Release*, vol. 63, pp. 41–52, 2000.
- [27] V. GmbH, *Ultrasound in Chemistry-Analytical Applications*, 1st ed., J.-L. Capelo-Martínez, Ed. Wiley-VCH, November 2008. [Online]. Available: <http://www.wiley-vch.de>
- [28] T. J. Mason and J. P. Lorimer, *Sonochemistry: theory, applications and uses of ultrasound in chemistry Ellis Horwood series in physical chemistry*. Ellis Horwood, 1988.
- [29] „Transdermal specialties to unveil breakthrough insulin patch technology,” *American Diabetes Associations 72nd Scientific Session*, vol. 1, pp. 1–2, 2012.
- [30] C. M. Schoellhammera, B. E. Polata, J. Mendenhall, R. Maaa, and B. Jonesb, „Rapid skin permeabilization by the simultaneous application of dual-frequency, high-intensity ultrasound,” *Journal of Controlled Release*, vol. 163, pp. 154–160, 2012.
- [31] B. E. Polat, D. Blankschtein†, and R. Langer, „Low-frequency sonophoresis: application to the transdermal delivery of macromolecules and hydrophilic drugs, review,” *Expert Opin. Drug Deliv. (2010) 7(12)*, vol. 7, pp. 1415–1432, 2010.
- [32] M. Gyöngy, „Passive cavitation mapping for monitoring ultrasound therapy,” Ph.D. dissertation, Department of Engineering Science University of Oxford, 2010.
- [33] J. Condliffe, „Particle characterization by acoustic microscopy following needle-free injection,” Ph.D. dissertation, Department of Engineering Science, University of Oxford, 2009.

- [34] ADA, „Lantus,” *Diabetes Forecast*, vol. 1, pp. 1–12, 2007. [Online]. Available: www.lantus.com
- [35] *Actrapid 10mL vial Consumer Medicine Information*, Novo Nordisk Pharmaceuticals Ltd., New Zealand, December 2002.
- [36] *General information about Levemir*, Novo Nordisk Inc., 100 College Road West, Princeton, New Jersey 08540 1-800-727-6500, June 2005.
- [37] M. Ogura, S. Paliwal, and S. Mitragotri, „Low-frequency sonophoresis: Current status and future prospects,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, pp. 1218–1223, 2008.