

MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

Sekce Fyzika

Biofyzikální centrum

**Ovlivnění ultrazvukem vyvolané hemolýzy suspenze
erytrocytů fyzikálně-chemickými vlastnostmi
disperzního prostředí.**

Diplomová práce

Brno 2006

Lukáš Gorčík

Ovlivnění ultrazvukem vyvolané hemolýzy suspenze erytrocytů fyzikálně-chemickými vlastnostmi disperzního prostředí

Abstrakt:

Cílem studie bylo zjistit jaký vliv má změna vlastností disperzního prostředí na hemolýzu suspenze erytrocytů vyvolanou ultrazvukem. Pro posouzení vlivu prostředí byly vybrány dvě vlastnosti. Viskozita a povrchové napětí. K měření obou veličin byly použity poměrové měřiče: Ostwaldův viskozimetr k určení viskozity a stalagmometr k stanovení povrchového napětí.

Pokusy probíhaly na terapeutickém generátoru BTL-07p v kontinuálním režimu při intenzitách 0,2 a 0,5W/cm² a délky ozvučení se pohybovaly do 10 minut..

Změny viskozity a povrchového napětí při hemolýze se ukázaly jako málo transparentní. Při měření viskozity v závislosti na koncentraci látek zvyšujících viskozitu byly získány zajímavé výsledky.

Klíčová slova: ultrazvuk, hemolýza, erytrocyty, viskozita, povrchové napětí

The influence of ultrasound produced haemolysis of erythrocyte suspension by physico-chemical properties of dispersion medium

Abstract:

The aim of this study was to find out what influence have changes of dispersion medium on ultrasound induced haemolysis in erythrocyte suspension. For assessment of the influence of this changes, two quantities were chosen: viscosity and surface tension. We have used relative measurement methods of viscosity and surface tension: the Ostwald viscometer for determination of viscosity and the stalagmometer for determination of surface tension.

Therapeutic generator BTL-07p was used as a source of ultrasound intensity from 0.2 to 0.5W/cm² and durations of continuous wave sonication up to 10 minutes.

The changes of viscosity and surface tension during haemolysis can be characterised as little significant. We obtained interesting results when measuring viscosity in dependence on concentration of substances increasing the medium viscosity.

Key words: ultrasound, haemolysis, erythrocytes, viscosity, surface tension

Prohlašuji, že jsem práci na téma: *Ovlivnění ultrazvukem vyvolané hemolýzy suspenze erytrocytů fyzikálně-chemickými vlastnostmi disperzního prostředí* vypracoval sám, jen s využitím literatury v práci uvedené.

Chtěl bych poděkovat především své vedoucí MUDr. Lence Forýtkové, CSc. za seznámení s problematikou týkající se ultrazvuku a za vedení při práci. Neméně díky patří mému školiteli prof. RNDr. Vojtěchu Mornsteinovi, CSc. za odborné rady a celou řadu cenných nápadů. V neposlední řadě děkuji laborantkám paní Svatavě Modrové a paní Jarmile Suttnerové, které zajistily dostatek biologického materiálu a vytvořily optimální podmínky pro provádění experimentů.

OBSAH

1. Úvod	7
2. Teoretická část	8
2.1. Ultrazvuk	8
2.1.1. Fyzikální popis ultrazvuku	8
2.1.2. Typy ultrazvukových vln	9
2.1.3. Způsob šíření vln	9
2.1.4. Rychlost šíření ultrazvukových vln	10
2.1.5. Energie a intenzita	12
2.1.6. Útlum ultrazvukových vln	13
2.1.7. Ultrazvukové zdroje	14
2.1.8. Vyzařování ultrazvukových měničů	15
2.1.8.1. Vzdálené pole (Frauenhoferova oblast)	15
2.1.8.2. Blízké pole (Fresnelova oblast)	15
2.2. Působení ultrazvuku na biologické systémy	17
2.2.1. Vliv fyzikálních faktorů	17
2.2.1.1. Primární účinky	17
2.2.1.2. Sekundární účinky	17
2.2.2. Biologické účinky ultrazvuku	18
2.2.3. Účinek ultrazvuku na erythrocyty	18
2.2.3.1. Hemolytické účinky	19
2.2.3.2. Nehemolytické účinky	19
2.3. Viskozita	20
2.4. Povrchové napětí	21
2.5. Erythrocyty	22
3. Materiál a metody	24
3.1. Použité chemikálie	24
3.2. Zdroj ultrazvuku a způsob jeho aplikace	24
3.3. Příprava suspenze erythrocytů	25
3.4. Měření viskozity a povrchového napětí	26
3.5. Analýza velikosti hemolýzy	27
3.6. Výpočty a statistické zpracování	29

3.6.1. Kalibrační křivka	29
3.6.2. Viskozita při $I = 0,2$ a $0,5\text{W}/\text{cm}^2$	29
3.6.3. Viskozita ovlivněná přidavkem látek TELEBRIX a IOPAMIDOLUM	30
3.6.4. Povrchové napětí	30
4. Cíl práce	32
5. Výsledky	33
5.1. Kalibrační křivky	33
5.2. Měření viskozity	37
5.2.1. Intenzita $0,2\text{W}/\text{cm}^2$	37
5.2.2. Intenzita $0,5\text{W}/\text{cm}^2$	41
5.2.3. Látky zvyšující viskozitu	44
5.2.4. TELEBRIX 30	45
5.2.5. IOPAMIDOLUM	47
5.3. Měření povrchového napětí	50
6. Diskuze	52
6.1. Krev	52
6.2. Metodika ozvučování	52
6.3. Měření	53
6.3.1. Koncentrace suspenze erytrocytů	53
6.3.2. Kalibrační křivky	53
6.3.3. Viskozita při $I=0,2$ a $0,5\text{W}/\text{cm}^2$	54
6.3.4. Látky ovlivňující viskozitu	55
6.3.5. Viskozita ovlivněná přidavkem látek	55
6.3.6. Povrchové napětí	56
7. Závěr	57
8. Použitá literatura	58
9. Příloha	60

1. Úvod

Od doby vzniku sonaru (r.1916) došlo k rozšíření ultrazvuku do mnoha odvětví každodenního života. Je například důležitým prvkem diagnostických a terapeutických metod v řadě medicínských oborů. Je proto nutné detailně znát jeho interakci s biologickými systémy. I přes velkou snahu vědců zabývajících se tímto problémem, není dosud jasně řečeno, které faktory ultrazvukového pole jsou odpovědné za biologický účinek. Zvláště v medicíně je aplikace ultrazvuku spojená s možným rizikem negativního působení na tkáň. Z tohoto důvodu byla zvolena krev jako zkoumaný biologický objekt.

Tato práce navazuje na bakalářskou práci stejného autora, která se věnovala vlivu osmotického tlaku na hemolýzu suspenze erytrocytů vyvolanou ultrazvukem.

Cílem této předložené práce je získat znalosti o vlivu jiných vlastností disperzního prostředí, než je osmotický tlak, na hemolýzu vyvolanou ultrazvukem. Pozornost je věnována zejména změně viskozity, vlivem přídavku různých látek a povrchového napětí.

2. Teoretická část

2.1. Ultrazvuk

2.1.1. Fyzikální popis ultrazvuku

Ultrazvuk můžeme obecně definovat jako mechanické vlnění s frekvencí vyšší než 20kHz. Jde tedy o oblast lidskému uchu neslyšitelných frekvencí.

Ultrazvuk lze zkoumat z mnoha hledisek. Jedním z nich je například účinek ultrazvuku v závislosti na výkonu. *Pasivní* ultrazvuk je charakteristický nízkým výkonem a využití nachází v defektoskopii, měřící technice a v lékařské diagnostice. Naproti tomu výkonově silnější vlnění *aktivního* ultrazvuku se projevuje fyzikálními nebo chemickými účinky. Využívá se pro čištění, svařování, tvorbu suspenzí a pro medicínskou terapii. Věnujme se nyní pasivnímu ultrazvuku uplatňujícímu se v lékařské diagnostice.

Obecně pro vlnění s malými hodnotami amplitudy můžeme psát vlnovou rovnici ve tvaru (Cheeke 2002)

$$\frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} = \frac{1}{c^2} \cdot \frac{\partial^2 \psi}{\partial t^2} \quad [7]$$

Partikulárním řešením pro rovinnou vlnu je pak rovnice

$$\psi = A \cdot \sin k(x - ct + \phi) \quad [8]$$

kde A.. amplituda výchylky

k...vlnové číslo

c...rychlost šíření vlny

ϕ ..počáteční fázový úhel

x...souřadnice polohy

S využitím vztahu $\omega = c \cdot k$, kde ω je kruhová frekvence můžeme rovnici [8] přepsat na tvar

$$\psi = A \cdot \sin(kx - \omega t + \phi) \quad [9]$$

Ve vztazích [8] a [9] lze vidět, že ultrazvuková vlna je charakterizována amplitudou A, kruhovou frekvencí ω a vlnovým číslem k. Úhlovou rychlost ω a z ní frekvenci f lze vyjádřit jako

$$\omega = 2\pi \cdot f \quad [10]$$

$$f = \frac{c}{\lambda} \quad [11]$$

kde λ je vlnová délka.

V ultrazvukové diagnostice se frekvence f pohybuje v rozmezí hodnot 20kHz, což je prahová hodnota udávaná pro ultrazvuk a přibližně $5 \cdot 10^7$ Hz. Rychlosti šíření ultrazvukových vln bude věnován odstavec 2.1.3.

2.1.2. Typy ultrazvukových vln

V závislosti na stavu prostředí a jeho mechanických vlastnostech se ultrazvukové vlnění šíří různým způsobem. Podle směru kmitavého pohybu jednotlivých bodů vzhledem ke směru postupu vlny lze rozdělit vlny následovně:

a) podélné (longitudinální) vlny

Jsou to nejznámější a nejběžnější ultrazvukové vlny vyznačující se přímočarým kmitáním částic rovnoběžně se směrem postupu vlny. Dochází ke střídavé změně hustoty částic a z toho plynoucí změně objemu v ose vlny. Podélné vlny se mohou šířit pevným, kapalným i plynným prostředím neomezeně. Podmínkou ale je, aby vlnová délka byla mnohonásobně kratší než rozměry uvažovaného prostředí.

b) příčné (transverzální) vlny

Příčné vlny se šíří v důsledku smykového namáhání prostředí. Proto je lze pozorovat jen v pevných látkách nebo velmi viskózních kapalinách. Jsou polarizované (kmitání jen v jednom směru) v transverzální rovině. Rychlost šíření je menší než u vln podélných. Podmínkou je opět kratší vlnová délka vzhledem k rozměrům prostředí.

c) ostatní druhy vln

Méně rozšířené jsou vlny *Rayleighovy* a *Loveovy*. Šíří se po povrchu tuhé látky do hloubky úměrné vlnové délce. Jsou druhem příčných vln. V prostředích jejichž aspoň jeden rozměr je srovnatelný s vlnovou délkou (např. desky) mohou vznikat *Lambovy* vlny.

2.1.3. Způsob šíření vln

V neohraničeném prostředí se ultrazvuková vlna od zdroje šíří do okolního prostředí tak, že sousední body mají stejnou fázi a tvoří vlnoplochu. Tato může nabývat různých tvarů vzhledem k použitému zdroji vlnění. Tyčové nebo válcové zdroje vytvářejí ve svém okolí tzv. *válcovou* vlnu, kterou lze popsat následující rovnicí (Obraz 1984).

$$\psi(\vec{r}, t) = \frac{A}{\sqrt{r}} \sin(\vec{k}\vec{r} - \omega t + \phi) \quad [12] \quad \text{kde } \vec{r} \dots \text{polohový vektor}$$

Plošný zdroj ultrazvukového vlnění vytváří nad svým povrchem tzv. *rovinnou* vlnu popsanou rovnicí

$$\psi(x, t) = A \sin(kx - \omega t + \phi) \quad [13]$$

V případě malého bodového zdroje ultrazvukového vlnění lze pozorovat tzv. *kulové* vlny popsané vztahem

$$\psi(\vec{r}, t) = \frac{A}{r} \sin(\vec{k}\vec{r} - \omega t + \phi) \quad [14]$$

Při průchodu ultrazvukové vlny prostředím vzniká akustický tlak. Lze vyjádřit vztahem

$$p = z \cdot c \quad [15] \quad \text{kde } z \dots \text{akustická impedance}$$

V tabulce č. 1 jsou uvedeny akustické parametry některých vybraných tkání.

Vztah [15] je někdy označován akustickým Ohmovým zákonem.

Médium	c[m/s]	Z[Pa.s/m]
vzduch	331	$0,4 \cdot 10^3$
dest. voda	$1,53 \cdot 10^3$	$1,53 \cdot 10^6$
krev	$1,57 \cdot 10^3$	$1,66 \cdot 10^6$
kosti	$2,5-4,7 \cdot 10^3$	$4-7,5 \cdot 10^6$
tuk	$1,45 \cdot 10^3$	$1,33 \cdot 10^6$

Tab. č. 1

V případě postupné rovinné nebo kulové vlny nazýváme akustickou impedanci akustickým vlnovým odporem $\rho \cdot c$. Prochází-li ultrazvuková vlna prostředím s vlnovým odporem $\rho \cdot c$, vzniká v něm akustický tlak daný výrazem

$$p = Ac\omega\rho \cdot \cos\omega\left(t - \frac{x}{c}\right) \quad [15]$$

kde $Ac\omega\rho$...amplituda akustického tlaku a $A\omega$...amplituda akustické rychlosti

Lze zavést efektivní veličiny amplitud akustického tlaku a akustické rychlosti

$$p_{ef} = \frac{P}{\sqrt{2}} \quad [16] \quad v_{ef} = \frac{V}{\sqrt{2}} \quad [17]$$

2.1.4. Rychlost šíření ultrazvukových vln

Rychlost a způsob šíření vln jsou závislé na meziatomových vazebných silách mezi částicemi látky. Největší síly působí v tuhých látkách a můžou se v nich šířit všechny

typy ultrazvukových vln (Obraz 1984). Rychlost šíření podélných vln závisí na poměru vlnové délky a rozměrů prostředí.

V prostorově neohraničeném tuhém prostředí se podélné vlny šíří rychlostí danou vztahem [18].

$$c = \sqrt{\frac{E}{\rho} \cdot \frac{1-\mu}{(1+\mu)(1-2\cdot\mu)}} \quad [18] \quad c = \sqrt{\frac{E}{\rho}} \quad [19] \quad c = \sqrt{\left(\frac{E}{\rho} \cdot \frac{1}{2(1-\mu)}\right)} \quad [20]$$

kde E...dynamický modul pružnosti v tahu

ρ ..hustota

μ ..Poissonovo číslo

V prostředí ohraničeném ze dvou stran se podélné vlny šíří rychlostí podle rovnice [19].

Rychlost šíření příčných vln v tuhém prostředí je dána vztahem [20].

Kapaliny jsou charakteristické tím, že nekladou významný odpor smykovému namáhání, a proto se v nich šíří jen podélné vlny (Obraz 1984). Změna tlaku a hustoty kmitajících částic probíhá adiabaticky, proto je rychlost šíření dána vztahem

$$c = \sqrt{\frac{K}{\rho}} = \sqrt{\frac{1}{\beta_{ad}\rho}} = \sqrt{\frac{\chi}{\beta_{iz}\rho}} \quad [21]$$

kde K ...adiabatický modul objemové pružnosti

P ...tlak

V_0 ...objem

β_{ad} ...adiabatická stlačitelnost

β_{iz} ... izotermická stlačitelnost [Pa^{-1}]

χpoměr měrného tepla při konstantním tlaku p a objemu V (Poissonova konst.)

Rychlost šíření ultrazvukových vln závisí na teplotě podle vztahu

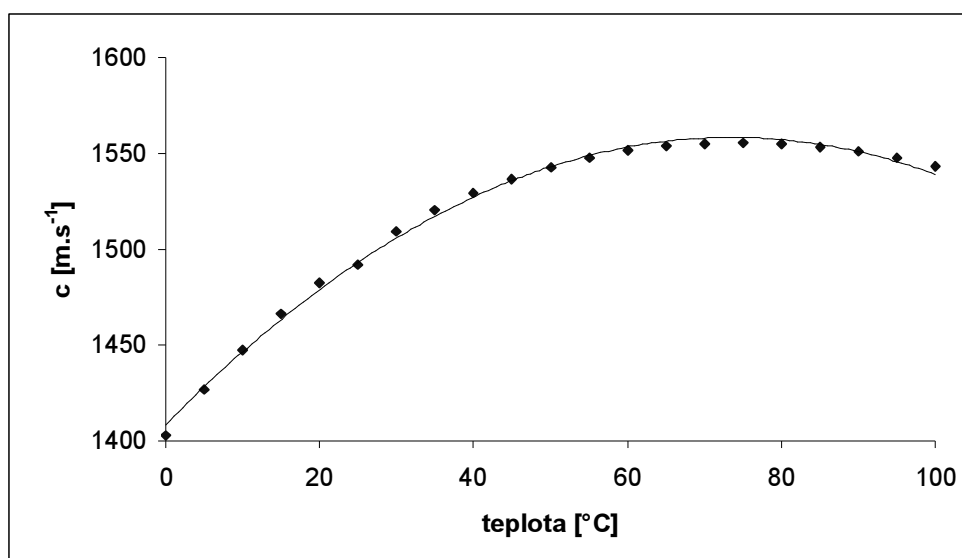
$$c(T) = c_0 + b \cdot (T - T_0) = c_0 \cdot [1 + b' \cdot (T - T_0)] \quad [22]$$

kde c_0 ...rychlost při počáteční teplotě T_0

b ... absolutní teplotní součinitel

b' .. relativní teplotní součinitel

Jako příklad je uvedena závislost rychlosti šíření ultrazvukové vlny na teplotě pro destilovanou vodu (viz graf č. 1).



graf č. 1 Závislost rychlosti šíření ultrazvukové vlny na teplotě pro destilovanou vodu (Obraz 1984).

Důležitá je otázka šíření vlnění v suspenzi obsahující buňky. Pokud je vlnová délka větší než rozměry mikroobjektů, pak lze pro rychlost šíření psát

$$c = \frac{c_1}{\sqrt{\left[\left[1 + q' \left(\frac{\rho_2}{\rho_1} - 1 \right) \right] \left[1 - q' \left(1 - \frac{\rho_1 c_1^2}{\rho_2 c_2^2} \right) \right] \right]}} \quad [23]$$

kde c_1, c_2 popř. ρ_1, ρ_2 jsou rychlosti, popř. hustoty kapaliny a částic,
 q' ...objemová koncentrace částic

2.1.5. Energie a intenzita

Při průchodu ultrazvukové vlny látkovým prostředím dochází k pohybu a deformaci elementů prostředí. Lze to charakterizovat kinetickou a potenciální energií. Pokud uvažujeme harmonickou vlnu, můžeme pro kinetickou energii psát

$$\Delta W_k = \frac{1}{2} \cdot \Delta m \cdot v^2 = \frac{1}{2} \cdot \rho \cdot \Delta V \cdot \left[A \omega \cdot \cos \omega \cdot \left(t - \frac{x}{c} \right) \right]^2 \quad [24]$$

kde ΔV ...element objemu

Lze dokázat, že potenciální energie je v každém okamžiku stejná jako kinetická energie (Škorpíková 1999). Můžeme tedy pro celkovou energii psát

$$\Delta W = \Delta W_k + \Delta W_p = 2\Delta W_k = \rho \cdot \Delta V A^2 \omega^2 \cos^2 \omega \cdot \left(t - \frac{x}{c} \right) \quad [25]$$

Střední časová hodnota energie v libovolném elementu je dána vztahem

$$\Delta \bar{W} = \frac{1}{T} \int_0^T \Delta W \cdot dt = \frac{1}{2} \rho \cdot \Delta V A^2 \omega^2 \quad [26] \quad w = \frac{\Delta \bar{W}}{\Delta V} = \frac{1}{2} \rho \cdot \omega^2 A^2 \quad [27]$$

Hustota energie je pak dána vztahem [27].

Intenzitu ultrazvukového vlnění definujeme jako průchod energie malou plochou za čas t .

$$I = \frac{\Delta W}{\Delta t \cdot \Delta S} \quad [28]$$

S využitím vztahu mezi hustotou energie a intenzitou $I = c \cdot w$ lze psát

$$I = \frac{1}{2} \rho \cdot c \cdot \omega^2 A^2 = \frac{1}{2} \rho \cdot c \cdot V^2 \quad [29]$$

2.1.6. Útlum ultrazvukových vln

Při průchodu ultrazvukové vlny prostředím klesá její energie, a tím i její akustický tlak v závislosti na vlastnostech prostředí. Příčinou tohoto útlumu je (Obraz 1984):

- absorpce ultrazvukových vln, kdy se v důsledku vnitřního tření mění mechanická energie na tepelnou.
- odraz, lom, ohyb a rozptyl. Příčinou rozptylu je dopad vln na jednotlivá rozhraní v nehomogenní látce.

Při šíření rovinné ultrazvukové vlny homogenním prostředím dochází postupně ke snižování intenzity. Pokles je exponenciální podle vztahu (Škorpíková 1999)

$$I_x = I_0 \cdot e^{-2\alpha x} \quad [30] \quad \text{kde } \alpha \dots \text{činitel útlumu}$$

V kapalinách závisí útlum na ztrátách α_v způsobených viskozitou a na ztrátách α_T vznikajících vlivem tepelné vodivosti kapalin. Lze jej popsat vztahem (Obraz 1984)

$$\alpha = \alpha_v + \alpha_T = \frac{2\pi^2}{\rho c^3} \left[\frac{4}{3} \eta + \lambda_T \left(\frac{1}{c_v} - \frac{1}{c_p} \right) \right] f^2 = a f^2 \quad [31]$$

kde ρ ...hustota

c ...rychlost ultrazvuku

η ...dynamická viskozita

λ_T ...tepelná vodivost

c_v, c_p ... měrné teplo při stálém objemu a stálém tlaku

Z výrazu je vidět, že útlum v kapalinách je úměrný druhé mocnině frekvence. Charakteristikou útlumu je ztrátové číslo $a = \alpha / f^2$ nezávislé na frekvenci. V kapalinách ztrátové číslo a závisí převážně na ztrátách viskozitních a platí tedy $\alpha_v \gg \alpha_T$

Útlum ultrazvuku je závislý na teplotě prostředí, a to většinou v opačné závislosti, než je tomu s rychlostí šíření ultrazvukových vln. Zatímco s teplotou rychlost šíření v kapalinách (kromě vody) klesá a jejich útlum stoupá, útlum vody s teplotou klesá (Obraz 1984).

Jak bylo řečeno výše, v nehomogenních prostředích, jako je lidský organismus, dochází ke ztrátám rozptylem. Jednotlivé tkáně, charakteristické různými akustickými impedancemi, nejsou rozloženy rovnoměrně a mají základní význam pro posouzení energetických poměrů při dopadu ultrazvukové vlny na akustické rozhraní (Škorpíková 1999). Pro lom a odraz platí přibližně stejné zákony jako při šíření světla v geometrické optice.

2.1.7. Ultrazvukové zdroje

Pro generování ultrazvukových vln k medicínským účelům se v současnosti používají výhradně piezoelektrické měniče. Nebylo tomu tak vždy. Historicky nejstarší používané generátory byly *mechanické* v podobě píšťal a sirén. Nevýhodou byla nízká průměrná dosažitelná frekvence pohybující se kolem 40kHz. Větší praktické využití měly měniče využívající *magnetostrikční jev*. Podstatou tohoto jevu je mechanická deformace magnetostrikční látky v magnetickém poli. Jako magnetostrikční látky jsou vhodné feromagnetické materiály (nikl, kobalt) a tzv. ferity (nekovové práškové materiály slinuté do vhodného tvaru). V magnetickém poli jsou tyto materiály rozkmitány na frekvenci podle vztahu

$$f_k = \frac{n}{2L} \sqrt{\frac{E}{\rho}} \quad [32]$$

kde E...modul pružnosti

n...řád kmitu, tj. pořadové číslo vyšších harmonických kmitočtů

L...délka materiálu

ρ ...hustota

Ze vztahu [32] plyne frekvenční omezení magnetostrikčních generátorů. Používaný rozsah 16-100kHz. Lze dosáhnout i vyšších frekvencí, ale jen za cenu prudkého poklesu intenzity. V lékařství se využívají tam, kde je potřeba nízkých frekvencí a vysokého výkonu (buněčné dezintegrátory, čističky) (Hrazdira 1978).

Při lékařských aplikacích jsou však využívány především frekvence převyšující 800kHz, které lze generovat pouze piezoelektrickými měniči. Podstatou piezo-

elektrického jevu je deformace materiálu, přeskupení jeho iontů a vytvoření elektrických dipólových momentů. Měníče využívají nepřímého piezoelektrického jevu, což je obrácený přímý jev. Na vhodný materiál se přivede napětí a vlivem deformace dojde ke vzniku vlnění. Pokud kmitá měnič v podélném směru, lze pro frekvenci psát

$$f_L = \frac{1}{2L} \sqrt{\frac{E''}{\rho}} \quad [33]$$

kde E'' ..modul pružnosti odpovídající typu a orientaci vzorku

Ldélka materiálu

ρ hustota

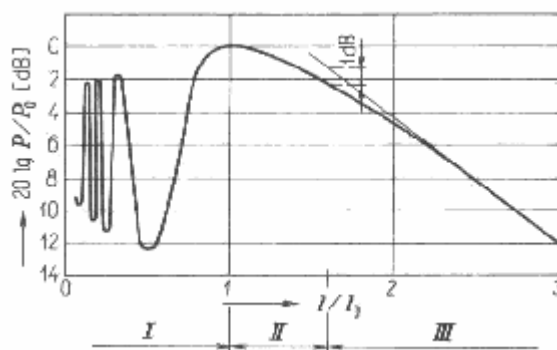
Jako piezoelektrické materiály lze použít anizotropní krystaly (křemen, turmalín), umělá polykrystalická feroelektrika (titaničitan barnatý, niobáty) a další.

2.1.8. Vyzařování ultrazvukových měničů

Vyzařování zdrojů je velmi široká oblast. Proto bude provedeno základní rozdělení a přiblížena bude pouze oblast, ve které probíhaly experimenty.

2.1.8.1. Vzdálené pole (Fraunhoferova oblast)

Vzdálené pole začíná za posledním maximem akustického tlaku na ose zdroje, kde dochází k rovnoměrnému poklesu. Na rozdíl od blízkého pole nezůstává průřez ultrazvukového svazku konstantní, nýbrž dochází k jeho rozbíhání (Obraz 1984).



Obr. č.1 Poměrný průběh akustického tlaku na ose kruhového zdroje. I – blízké pole, II – přechodná oblast, III – vzdálené pole. (Obraz 1984)

Z obrázku č.1 je vidět, že vzdálené pole nezačíná hned za posledním maximem akustického tlaku, ale v místě, od kterého je pokles lineární.

2.1.8.2. Blízké pole (Fresnelova oblast)

Podle geometrie měniče si lze představit několik typů vyzařovaných vln. V okolí bodového zdroje se šíří kulová vlna, v okolí deskového zdroje rovinná vlna.

Elementární ploška kmitající desky o ploše dS elektroakustického měniče vysílá do prostoru před sebou akustický tlak dp , daný v bodě ve vzdálenosti r výrazem (Obraz 1984)

$$dp = p_0 dS \frac{\exp(-j\omega r / c)}{\lambda r} \quad [34]$$

kde p_0 ...akustický tlak v prostředí těsně u kmitající desky
 r ...vzdálenost od zdroje.

Po integraci vztahu [34] pro desku nebo otvor kruhového tvaru, dostaneme pro amplitudu akustického tlaku P v ose zdroje výraz

$$P = 2P_0 \sin \left\{ \frac{\pi}{\lambda} \left[\sqrt{\left(\frac{D^2}{4} + l^2 \right)} - l \right] \right\} \quad [35]$$

kde P_0 ...amplituda počátečního akustického tlaku,

D ...průměr zdroje,

l ... vzdálenost na ose

Jak je vidět ze vztahu [35], střídají se na ose vyzařování maxima a minima akustického tlaku. Vzdálenosti těchto míst jsou určeny vztahy [36] a [37].

$$l_{n\max} = \frac{D^2 - \lambda^2 (2n+1)^2}{4\lambda(2n+1)} \quad n=0,1,2,3... \quad [36]$$

$$l_{n\min} = \frac{D^2 - 4\lambda^2 n^2}{8n\lambda} \quad n=1,2,3... \quad [37]$$

kde D ...průměr zdroje

l ...vzdálenost na ose

Vzdálenost posledního maxima, ze kterým končí blízké pole lze určit podle vztahu (Obraz 1984)

$$l_o = \frac{D^2 - \lambda^2}{4\lambda} \quad [38]$$

Vznik maxim a minim akustického tlaku, která se vyskytují nejen na ose, nýbrž v celém blízkém poli, lze vysvětlit interferencemi ultrazvukových kmitů, přicházejících do určitého místa z různých bodů zdrojů s různou fází. Akustický tlak v blízkém poli je výslednicí amplitud a fází všech dílčích vln. Z toho plynou složité amplitudové a fázové poměry. Nedochází v něm ale k rozbíhání ultrazvukového svazku.

2.2. Působení ultrazvuku na biologické systémy

2.2.1. Vliv fyzikálních faktorů

Biologické objekty jsou nehomogenní a se složitou strukturou. Jak bylo řečeno v předchozích kapitolách, v nehomogenním prostředí se projevuje vliv rozptylu vlnění a další jevy a popis ultrazvukového pole se tak stává velmi komplikovaným. Projevuje se několik různých úkazů, které lze rozdělit do následující kategorií.

2.2.1.1. Primární účinky

Vyplývají z mechanického a periodického charakteru ultrazvukových vln a z vysoké frekvence kmitů. Vedle silových účinků a zrychlení je velmi významným jevem kavitace.

2.2.1.2. Sekundární účinky

Zahrnují jiné druhy energie, ve které se přeměnila mechanická energie vlnění. Patří sem tepelná, chemická či elektrická energie.

Tepelná energie je výsledkem absorpce akustické energie. Jejím vlivem dochází k rotacím a vibracím malých molekul v kapalném prostředí a následnému zvýšení teploty. Nárůst teploty je jevem lokálním. Dochází k němu v místech zhuštění prostředí vlivem periodického opakování. Vznik tepla je také vázán homogenitou biologických objektů. Na rozhraní, kde se od sebe výrazně liší hodnoty akustických impedancí dochází k selektivnímu zvýšení teploty (Pospíšilová a kol. 1963). Tepelná energie se šíří u kapalin kondukcí a konvekcí.

Chemická energie je spjata především se vznikem volných radikálů a má úzkou souvislost s jevem kavitace, což bude nastíněno v dalším odstavci.

Při ozvučování biologických objektů vyššími intenzitami ultrazvuku bývá jako příčina morfologických a funkčních změn daných objektů nejčastěji uváděna *kavitace*. Kavitace je mechanickým jevem ultrazvukového pole a příčinnou jejího vzniku jsou změny akustického tlaku při šíření ultrazvukových vln kapalným prostředím. Při šíření tlakové ultrazvukové vlny kapalinou dochází v negativní fázi tlakové vlny k silnému napětí uvnitř kapaliny, což má za následek porušení continuity kapaliny a vznik kavitačních bublin. Tyto kavitační bubliny vznikají jen za určitých podmínek a jsou naplněny plyny původně rozpuštěnými v kapalině nebo vodními parami. Probíhá zde řada chemických procesů, jako je například tvorba a rekombinace volných radikálů a jejich reakce. Při vyšších intenzitách dochází k rychlému zvětšování poloměru bublin a k jejich následnému kolapsu. V tomto případě hovoříme o kavitaci přechodné, kolapsové.

Za nižší intenzity ultrazvukového pole dochází jen k oscilacím již existujících bublin. Tento stav označujeme jako kavitaci stabilní, rezonanční.

2.2.2. Biologické účinky ultrazvuku

Biologické účinky ultrazvuku mohou být buď pozitivní nebo negativní, resp. stimulační nebo inhibiční. Rozdělení do značné míry souvisí s charakteristikou použitého ultrazvukového pole. Je patrný vliv intenzity, režimu provozu (kontinuální, pulzní), délky ozvučení, frekvence a charakteristiky ozvučovaného objektu. Obecně lze tvrdit, že delší expozice, vyšší intenzita a pulzní režim mají na biologické objekty destruktivnější účinek. Vliv má i vlnová délka. Pokud její hodnota odpovídá řádově velikosti biologických objektů, pak se může uplatnit celá amplituda tlaku a zrychlení a účinek je největší.

Stimulační účinky ultrazvuku lze charakterizovat minimálními strukturními změnami a jsou spíše reverzibilní. Za hlavní mechanismus stimulace ultrazvukem se vedle tepelného účinku považuje mechanický stres, který vyvolává mikroproudění uvnitř i vně buněk a ovlivňuje difuzi či permeabilitu membránových struktur (Hrazdira 1979). Stimulačních účinků se využívá například při ultrazvukové terapii.

Inhibiční účinky se v závislosti na stoupající intenzitě ultrazvuku dělí na reverzibilní a ireverzibilní. Reverzibilní změny se projevují zpomalením nebo dočasnou zástavou životních pochodů buňky. Morfologické změny jsou diskrétní, mají koloidně-osmotický charakter a tyto buňky jsou schopny plné regenerace. Ireverzibilní změny se projevují trvalou zástavou životních funkcí buňky a velmi často vedou ke smrti. Tyto ireverzibilní změny jsou spojeny se změnami buněčných struktur, zejména membránových systémů.

2.2.3. Účinek ultrazvuku na erythrocyty

Erythrocyty nejsou „pravé“ buňky, protože nemají jádro. Jsou uzpůsobeny k přenosu molekul kyslíku a odpovídá tomu jejich morfologie a fyziologie. Působením ultrazvuku může dojít k roztržení erythrocytární membrány a úniku hemoglobinu (hemolýza) nebo jen k funkčním a strukturním změnám (subhemolytické účinky). Hranice mezi nimi je dána intenzitou ultrazvuku a vlastnostmi suspenze erythrocytů.

2.2.3.1. Hemolytické účinky

Průběh hemolýzy je závislý především na koncentraci erytrocytů. Zředěnější suspenze vyžaduje nižší intenzitu a kratší dobu ozvučení. U suspenzí o koncentraci nižší než 2% je nejdůležitějším hemolyzujícím faktorem kavitace. Ta ale nastupuje až při intenzitě kolem 1 W/cm^2 (Hrazdira 1979). Při nižších intenzitách hrají roli pravděpodobně jiné mechanické faktory. U koncentrovanějších suspenzí než 2% se význam kavitace snižuje a vstupují třecí síly a tlakový spád (nejvíce se uplatní ve vrstvě sedimentovaných erytrocytů). Význam v hemolytickém účinku ultrazvuku má i různá citlivost erytrocytů v průběhu 24 hodinového cyklu (Forýtková 1992).

Naopak ochranný účinek před hemolytickým působením ultrazvuku mají plasmatické bílkoviny, které zvyšují viskozitu suspenze a selektivní absorpcí omezují interakci ultrazvuku s erytrocyty.

2.2.3.2. Nehemolytické účinky

Projevují se morfologickými a funkčními změnami. Například po krátkém ozvučení (4 minuty při intenzitě nižší než $0,5 \text{ W/cm}^2$) má část erytrocytů ostnitý tvar (důsledek koloidně-osmotických změn). Vliv ultrazvuku na permeabilitu erytrocytární membrány některé práce potvrzují, některé vyvracejí. Část autorů uvádí, že dříve než by došlo ke změnám permeability, erytrocyty by zhemolyzovaly. Jiní popisují vznik propustnosti membrány pro vodu a zbobtnání erytrocytů po ozvučení. Je však zřejmé, že erytrocytární membrána má fyzikálně osmotický charakter selektivně propustné membrány. Je propustná pro vodu a anionty a nepropustná pro kationty. Značkováním erytrocytů bylo ukázáno, že polopropustný charakter membrány je po ozvučení zesílen (větší propustnost pro anionty a menší pro kationty). S funkčním stavem membrány souvisí i chování erytrocytů v hypotonických roztocích. Po ozvučení jsou krvinky osmoticky odolnější. Při delším ozvučení se rozdíly v osmotické odolnosti snižovaly. Stupeň osmotické hemolýzy závisí na vlastnostech erytrocytů a krevní plasmy. Důležité je stáří krvinek. Mladé erytrocyty jsou osmoticky odolnější než staré (souvislost s intenzitou metabolismu) (Hrazdira 1979).

2.3. Viskozita

Kapaliny mají určitou viskozitu, která se projevuje při jejich toku. Vysvětlit ji můžeme představou o posouvání rovnoběžných vrstev kapaliny, při němž se uplatňuje vnitřní tření mezi těmito vrstvami. Je charakterizována koeficientem η , jehož význam plyne ze vztahu (Brdička 1977)

$$F = \eta \cdot S \cdot \frac{dv}{dx} \quad [39]$$

kde F ...síla působící mezi rovnoběžnými vrstvami kapaliny o stykové ploše S

dx ..vzdálenost ploch

dv ..rozdíl rychlostí sousedních vrstev

Na vnitřním tření závisí objem kapaliny V , který proteče kapilární trubicí o délce L , poloměru r za čas t při tlakovém spádu Δp . Vztah odvodil Poiseuille z představy, že kapalina proudí trubicí v koaxiálních válcových vrstvách. Poiseuilleovu rovnici pro výpočet viskozity lze psát jako

$$\eta = \frac{\pi \cdot r^4 \Delta p}{8VL} \cdot t \quad [40]$$

Po vyjádření času t z rovnice [40], dosazení za Δp ($\Delta h = \Delta l$) a úpravě dostaneme (Mornstein a kol. 1996)

$$t = \frac{\eta}{\rho} \cdot \frac{8 \cdot V}{\pi \cdot r^4 \cdot g} = \nu \cdot k \quad [41]$$

kde g ...tíhové zrychlení

ρ ..hustota kapaliny

ν ...kinematická viskozita

k ...hodnota konstantní pro daný viskozimetr

Často určujeme kinematickou viskozitu srovnáním s jinou kapalinou jejíž viskozitu známe (např. destilovaná voda). Musí platit vztah [42]. Pro kinematickou viskozitu neznámé kapaliny pak platí [43].

$$k = \frac{t_0}{\nu_0} = \frac{t}{\nu} \quad [42] \qquad \nu = \frac{t}{t_0} \cdot \nu_0 \quad [43]$$

kde t_0 ...doba průtoku srovnávací kapaliny

ν_0 ...kinematická viskozita srovnávací kapaliny

Viskozita kapalin se poměrně značně mění s teplotou. Na rozdíl od plynů nevzrůstá její hodnota úměrně s druhou odmocninou z absolutní teploty, ale naopak klesá. Důvod je ten, že se molekuly kapaliny při nižších teplotách shlukují a zvyšují tak vnitřní tření. Teplotní závislost lze vyjádřit vztahem

$$\log \eta = AT^{-1} + B \quad [41]$$

kde A,B...individuální konstanty pro danou kapalinu

Přibližně lze říci, že viskozita kapalin klesá zhruba o 2% při zvýšení teploty o 1°C.

2.4. Povrchové napětí

Povrchové napětí souvisí se soudržností molekul. Uvnitř kapaliny působí na molekulu síly ve všech směrech stejné. Jejich výslednice je nulová. Na rozhraní mezi kapalinou a plynným okolím však nejsou tyto síly kompenzovány ze strany plynné fáze a molekuly v povrchu jsou vtahovány dovnitř kapaliny. Dochází ke stlačování celého povrchu velkými silami, které působí tak, aby v povrchu bylo co nejméně molekul, tedy aby kapalina zaujímala co nejmenší povrch. Nejmenší povrch má kapalina tehdy, pokud zaujímá kulový tvar. Proto každá kapalina jeví tendenci nabýt kulového tvaru, pokud na ní nepůsobí rušivé gravitační nebo jiné vnější síly (Brdička 1977).

Zvětšíme-li plochu povrchu nějaké kapaliny, musíme vykonat práci právě kvůli povrchovému napětí. Povrchové napětí je tedy definováno i jako práce potřebná k zvětšení plochy vydělená plochou, která při tom vznikne navíc. Lze použít i tvrzení, že je to hustota povrchové energie (Hrazdira, Mornstein 2001).

Povrchové napětí je silně závislé na teplotě. Zavedeme-li molární povrchovou energii ω , můžeme s využitím vztahu pro objem koule psát

$$\omega = \Gamma \cdot S = \Gamma \cdot \left[36\pi \cdot (M/\rho)^2 \right]^{\frac{1}{3}} \approx \Gamma \cdot (M/\rho)^{\frac{2}{3}} \quad [42]$$

kde Γ ...povrchová energie jednotky povrchu

M...molární hmotnost

ρ ...hustota

Mezi vztahem [42] a teplotou existuje empirický vztah [43] platný přibližně pro všechny kapaliny (Brdička 1977).

$$\omega_t = A[t_k - (t + 6)] \quad [43]$$

kde A...konstanta

t_k ...kritická teplota

Tato rovnice vyhovuje dobře až na teploty blízké kritické, při nichž se experimentálně získaná závislost odchyluje od přímky směrem k nule.

Povrchové napětí lze měřit více způsoby. Jedním z nich je kapková metoda. Je založena na tom, že kapalina pomalu vytékající z kapiláry stalagmometru vytváří na jeho spodním okraji kapku, která se odtrhne tehdy, když její tíha překoná sílu povrchového napětí (Mornstein a kol. 1996). Těsně před odtržením kapky platí

$$m \cdot g = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot \sigma \quad [44]$$

kde m ...hmotnost kapky

g ...tíhové zrychlení

r ...poloměr zabroušeného zakončení stalagmometru

σ ...povrchové napětí

Kapková metoda je metoda srovnávací. Stanovení povrchového napětí neznámé kapaliny využívá znalost povrchového napětí jiné kapaliny. Můžeme tedy psát

$$\sigma_2 = \frac{m_2}{m_1} \cdot \sigma_1 \quad [45]$$

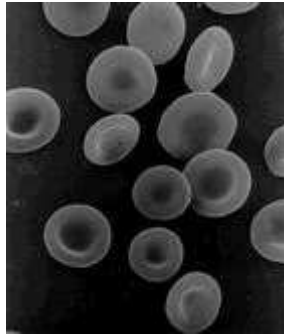
2.5. Erytrocyty

Součástí krve jsou mimo jiné tzv. krevní elementy: erytrocyty, leukocyty, lymfocyty a trombocyty.

Lidský erytrocyt se liší od ostatních buněk tím, že nemá buněčné jádro, není schopen syntetizovat DNA, RNA, proteiny, lipidy ani sacharidy.

Úkolem erytrocytů je transport kyslíku z plic do tkání a odsun oxidu uhličitého z tkání do plic a vazba nebo uvolnění těchto molekul. Erytrocyty nemají jádro, ani interní membrány a organely (např. mitochondrie). Jsou jakýmsi „dopravcem“ pro hemoglobin. Erytrocyty si udržují svůj bikonkávní diskoidní tvar o průměru asi 7 μm (viz obr. č. 2). Strukturu tvoří buněčná membrána jejíž integrální proteiny nemohou difundovat fosfolipidovou dvojvrstvou a jsou víceméně uniformě rozloženy v membráně. Erytrocytový cytoskelet tvoří hustý fibrilární obal pod celou plasmatickou membránou, ke které je připojen v místě integrálních proteinů. Tím dostává plasmatická membrána erytrocytů velkou pevnost a zároveň velmi dobrou flexibilitu. Charakteristický je také malý obsah jiných intracelulárních bílkovin.

Protože erythrocyty nemají mitochondrie, nemohou energii získávat oxidací pomocí kyslíku (nemají oxidační fosforylaci), ale veškerou energii získávají z anaerobní glykolýzy.



Obr. č. 2 Erythrocyty (zdroj: Encyklopedie Wikipedia)

Membrána erythrocytů se chová jako perfektní osmometr. Při koncentraci NaCl 154mmol/l si erythrocyty udržují svůj normální tvar a objem. Při koncentraci nižší dochází k bobtnání (hypertonie) a při koncentraci vyšší ke sraštění erythrocytů (hypotonie) (Hrazdira, Mornstein 2001).

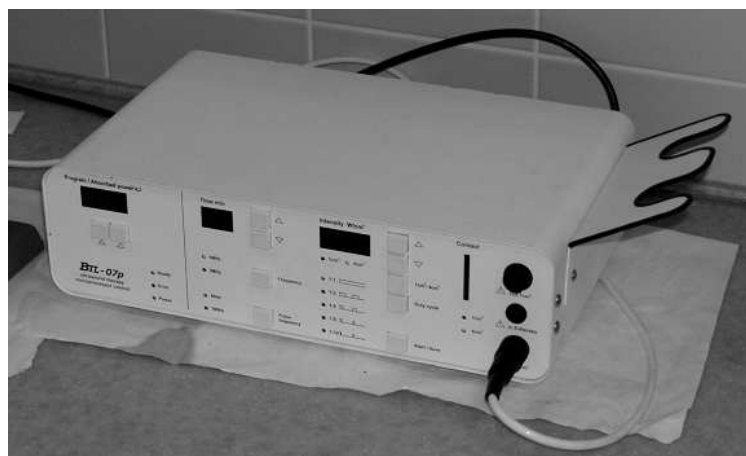
3. Materiál a metody

3.1. Použité chemikálie

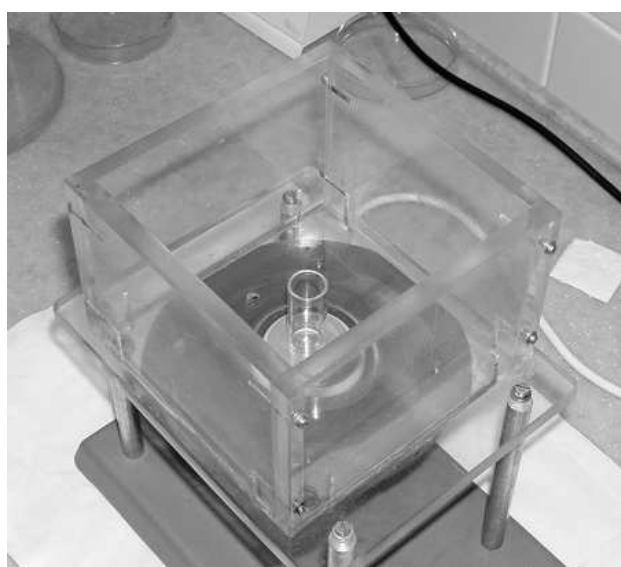
- TELEBRIX 30 Meglumine (šarže 04TM029A, výrobce: Guerbet, Francie, 300mg/ml)
- IOPAMIDOLUM (šarže PD0806, výrobce: Sanochemia, Scanlux ®, 370mg/ml)
- Natrium citricum 3,8 % (výrobce: Hoechst-Biotika spol. s.r.o., Martin)
- NaCl (výrobce: Penta, Praha)
- Polysorbát 80 (výrobce: RNDr. Jan Kulich, Říčany)
- Polysorbát 20 (výrobce: RNDr. Jan Kulich, Říčany)
- Dextran (Mr = 150.000)
- Dextran (Mr = 500.000)
- Želatina

3.2. Zdroj ultrazvuku a způsob jeho aplikace

K měření byl používán terapeutický generátor BTL-07p (BEUTYLINE BTL s.r.o. Praha) používaný v nemocnicích pro léčbu a rehabilitaci (viz obr. č.2). Ultrazvukové vlnění vzniká v piezoelektrickém měniči zabudovaném v připojené ozvučovací hlavici s efektivní vyzařovací plochou 4cm^2 . Na hlavici stála skleněná válcová ozvučovací nádobka o průměru 12mm s plochým skleněným dnem stejného průměru jako stěna nádoby. Objemem byl 7ml (viz obr. č.3). Prostředí zajišťující dostatečně účinný přenos akustické energie mezi zkumavkou a hlavici zajišťoval parafinový olej. Generátor umožňuje ozvučovat kontinuálně nebo pulzně při frekvencích 1MHz a 3MHz . Výkon (intenzitu) lze měnit v rozsahu $0,1 - 2,0\text{W}/\text{cm}^2$. Po optimalizaci nastavení ultrazvuku vzhledem k použité koncentraci suspenze erytrocytů jsem se rozhodl provádět experimenty v kontinuálním režimu s frekvencí 1MHz a intenzitou v rozmezí $0,2$ až $0,5\text{W}/\text{cm}^2$. Ozvučování suspenze erytrocytů probíhalo v blízkém ultrazvukovém poli v objemu 6ml při laboratorní teplotě. Nebylo používáno chlazení.



Obr. č. 2 Ultrazvukový terapeutický generátor BTL-07p



Obr. č. 3 Ozvučovací hlavice s nádobkou

3.3. Příprava suspenze erytrocytů

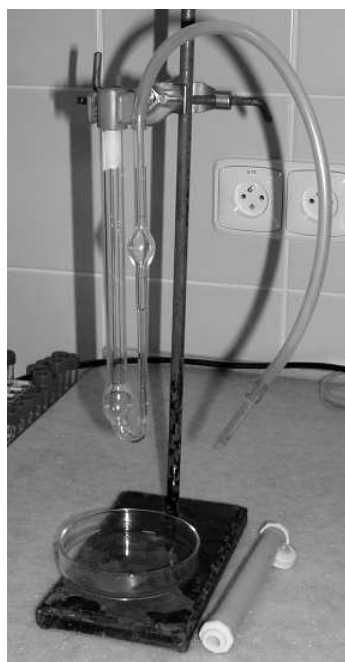
Pro všechny experimenty byla používána koňská krev. Její odběr prováděl pracovník Kliniky chorob koní na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně. Krev byla odebírána do roztoku citrátu (4ml 3,8 % Natrium citricum do 100ml krve), aby bylo zaručeno její nesražení a následně převezena do Biofyzikálního centra k dalšímu zpracování. Krev se zcentrifugovala při 2000 ot./min. po dobu 10 min. a stáhla se plazma. Po doplnění sterilním fyziologickým roztokem na původní objem se krev promíchala a opět zcentrifugovala. Výše uvedený postup se opakuje třikrát. Po proprání byla získána masa erytrocytů, resp. 100 % suspenze erytrocytů. Pro samotné experimenty byla 100 % suspenze erytrocytů naředěna fyziologickým roztokem na 10 % suspenzi erytrocytů.

3.4. Měření viskozity a povrchového napětí

K měření viskozity byl použit Ostwaldův viskozimetr (viz obr. č.4), který funguje jako poměrové měřidlo. Dokážeme s ním stanovit viskozitu neznámé kapaliny, pokud známe viskozitu jiné kapaliny (v našem případě destilované vody). Je to zásobník kapaliny se dvěma ryskami a připojená kapilára, kterou protéká roztok definovaného objemu. Měří se doba, za kterou kapalina proteče mezi ryskami. K měření doby průtoku byly použity elektronické stopky.

Povrchové napětí lze měřit několika způsoby. Jako technicky nejlépe proveditelná se ukázala možnost využít stalagmometr. Je to kapilára v horní části rozšířená a tvořící tak zásobník kapaliny (viz obr. č.5). Funguje jako poměrové měřidlo. Pokud známe povrchové napětí nějaké kapaliny (v našem případě destilované vody) a určíme hmotnost definovaného počtu kapek, pak dokážeme vypočítat viskozitu neznámé kapaliny. Stačí k tomu určit pouze hmotnost odpovídajícího množství kapek. K určení hmotnosti byly použity analytické váhy.

Postup přípravy k měření viskozity obsahoval vhodné naředění vzorku, temperaci na požadovanou teplotu, stanovení viskozity, ozvučení, temperaci, opětovné stanovení viskozity a změření absorbance. Měření povrchového napětí vyžadovalo naředění vzorku, ozvučení, temperaci a stanovení povrchového napětí.



Obr. č. 4 Viskozimetr



Obr. č. 5 Stalagmometr

3.5. Analýza velikosti hemolýzy

Existuje několik možností jak stanovit velikost hemolýzy. Jednou z nich je počítání erytrocytů v Bürkerově komůrce pomocí optického mikroskopu. Vzhledem k velkému množství provedených experimentů se však jedná o velmi zdlouhavý proces. Efektivnějším způsobem je využití toho, že u hemolyzovaných erytrocytů dochází k mechanickému poškození plasmatické membrány a uvolnění krevního barviva hemoglobinu do okolního prostředí. Množství uvolněného barviva je přímo úměrné počtu zhemolyzovaných erytrocytů. Velikost hemolýzy tedy určíme stanovením absorbance na spektrofotometru (viz obr. č.6). Pro hemoglobin bylo naměřeno maximum absorbance při vlnové délce 575nm. Nutnou součástí stanovení velikosti hemolýzy měřením absorpce procházejícího světla je sestavení kalibrační křivky závislosti absorbance na stupni hemolýzy. Kalibrační křivka je uvedena v sekci Výsledky.

Nicméně i pro stanovení kalibrační závislosti je potřeba určit odpovídající počet erytrocytů (pro naměřenou absorbanci). K počítání krvinek byla použita Bürkerova komůrka (viz obr. č.7). Jedná se o malý prostor mezi krycím mikroskopovým sklíčkem a speciálně upraveným podložním sklem (vzdálenost 0,1mm), které je opatřeno dvěma sektory s hustou sítí čar tvořících čtverce různých velikostí (viz obr. č.8). K výpočtu používané čtverce mají plochu 0,0025mm². Kvůli eliminaci chyb vznikajících náhodným uspořádáním erytrocytů na ploše komůrky je potřeba provést součet aspoň v 20 čtvercích optickým mikroskopem (viz obr. č.9) podle Bürkerova pravidla. Pravidlo určuje, které erytrocyty se do součtu zahrnují, a které ne. Započítávají se ty, které leží uvnitř a na dvou sousedních vzájemně kolmých stranách čtverce (nutné počítat pro všechny čtverce stejně). Součtem všech erytrocytů získáme jejich počet ve 20 čtvercích. Abychom získali počet erytrocytů v 1mm³, použijeme vztah:

$$N = \frac{n.z}{S.h.x} \quad [46]$$

kde n...součet erytrocytů v x čtvercích

z...řadění,

S...plocha jednoho čtverce (0,0025mm²)

h...výška Bürkerovy komůrky

Kvůli možnosti erytrocytů ovlivňovat se navzájem (aglutinovat) nebo se překrývat je vhodné naředit vzorek tak, aby v každém počítaném čtverci bylo přibližně pět červených krvinek.

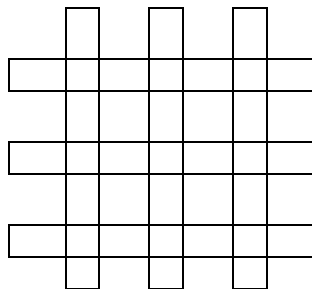
Posuzovat působení ultrazvuku pomocí absolutního počtu červených krvinek je nepřehledné, proto zavádíme tzv. *stupeň hemolýzy*. Je to počet zhemolyzovaných erytrocytů vzhledem k celkovému počtu erytrocytů před ozvučením (v 1mm^3). Udává se v procentech.



Obr. č. 6 Spektrofotometr



Obr. č. 7 Bürkerova komůrka



Obr. č. 8 Síť čtverců v Bürkerově komůrce



Obr. č. 9 Optický mikroskop

3.6. Výpočty a statistické zpracování

Po analýze způsobu měření dat jsem shledal, že se jedná o nezávislé náhodné proměnné s normálním rozdělením. Rozdělení je charakterizováno dvěma reálnými parametry. Střední hodnotou a střední kvadratickou odchylkou.

$$\mu = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N x_i \quad [47]$$

$$\delta\mu = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{x} - x_i)^2}{n(n-1)}} \cdot S \quad [48]$$

kde \bar{x} ...aritmetický průměr

n ...počet měření

S ...Studentův koeficient (hladina pravděpodobnosti 68,3%)

3.6.1. Kalibrační křivka

Z každých pěti měření charakteristických stejnou intenzitou ultrazvuku a stejnou dobou ozvučení byl proveden aritmetický průměr počtů erytrocytů n ve 20 čtvercích a aritmetický průměr absorbance A . Podle vztahu [46] byl určen počet erytrocytů N v 1mm^3 a stupeň hemolýzy.

3.6.2. Viskozita při $I = 0,2$ a $0,5\text{W/cm}^2$

Pro každou konfiguraci intenzity a doby ozvučení bylo provedeno deset měření doby průtoku. Podle vztahu [47] byla určena průměrná hodnota a podle vztahu [48] pak směrodatná odchylka. Výpočet dynamické viskozity proběhl podle vztahu [49].

$$\nu = \frac{t}{t_0} \cdot \nu_0 \equiv \frac{t}{t_0} \cdot \frac{\eta_0}{\rho_0} \quad [49]$$

kde t ... doba průtoku viskozimetrem

t_0 ...doba průtoku destilované vody viskozimetrem

η_0 ...kinematická viskozita destilované vody

ρ_0 ...hustota destilované vody

Ze zákona šíření chyb byla určena směrodatná odchylka dynamické viskozity ve tvaru:

$$\delta v \equiv \sqrt{\left(\frac{\partial v}{\partial t}\right)^2 \cdot \delta t^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial t_0}\right)^2 \cdot \delta t_0^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial \eta_0}\right)^2 \cdot \delta \eta_0^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial \rho_0}\right)^2 \cdot \delta \rho_0^2 \cdot S} \quad [50]$$

kde S ...studentův koeficient

Z pětkrát opakovaného měření absorpance byla určena střední hodnota podle vztahu [47] a podle vztahu [48] směrodatná odchylka. Od střední hodnoty absorpance je nutné odečíst absorpaci slepého (neozvučeného) vzorku. Směrodatná odchylka absorpance zmenšená o absorpaci slepého vzorku je výstupem vztahu [51].

$$\delta A \equiv \sqrt{\delta A_i^2 + \delta A_0^2} \quad [51]$$

kde δA_0 ...směrodatná odchylka slepého vzorku

Počet krvinek v 1 mm^3 a stupeň hemolýzy určíme odečtem z kalibračních závislostí 1 a 2.

3.6.3. Viskozita ovlivněná přidávkem látek TELEBRIX a IOPAMIDOLUM

Pro každou koncentraci přidané látky zvyšující viskozitu bylo provedeno osm měření doby průtoku před a po ozvučení. Metodologie zpracování naměřených dat je identická jako v případě 3.6.2.

3.6.4. Povrchové napětí

Pro každou ozvučovací délku byla určena hmotnost 75 kapek suspenze erytrocytů na analytických váhách. Hmotnost byla stanovována až po ozvučení. Směrodatná odchylka byla určena jako 1mg. Povrchové napětí se vypočítá ze vztahu [52].

$$\sigma \equiv \frac{m}{m_0} \cdot \sigma_0 \quad [52]$$

kde σ_0 povrchové napětí destilované vody

m_0 hmotnost 75 kapek destilované vody

Ze zákona šíření chyb byla určena směrodatná odchylka povrchového napětí.

$$\delta \sigma \equiv \sqrt{\left(\frac{\partial \sigma}{\partial m}\right)^2 \cdot \delta m^2 + \left(\frac{\partial \sigma}{\partial m_0}\right)^2 \cdot \delta m_0^2 + \left(\frac{\partial \sigma}{\partial \sigma_0}\right)^2 \cdot \delta \sigma_0^2 \cdot S} \quad [53]$$

kde S ...studentův koeficient

Měření absorbance bylo opakováno pětkrát. Byla určena střední hodnota podle vztahu [47] a podle vztahu [48] směrodatná odchylka. Od střední hodnoty absorbance je nutné odečíst absorbanci slepého (neozvučeného) vzorku. Určení počtu erytrocytů v 1mm^3 a stupeň hemolýzy je stejné jako v případě 3.6.2.

4. Cíl práce

Výsledkem této práce mělo být posouzení vlivu změn disperzního prostředí na hemolýzu erytrocytů způsobenou ultrazvukem.

Shrnutí cílů:

1. Výběr veličin charakterizujících disperzní prostředí a volba vhodných měřících metod.
2. Optimalizace vybraných metod.
3. Nalezení vhodných látek měřících vlastnosti disperzního prostředí.
4. Posouzení vlivu ultrazvuku na suspenzi erytrocytů z hlediska změny vlastností disperzního prostředí.
5. Statistické zpracování sad měření.

5. Výsledky

Vysvětlivky k tabulkám č. 2 až 9 jsou uvedeny v příloze.

5.1. Kalibrační křivky

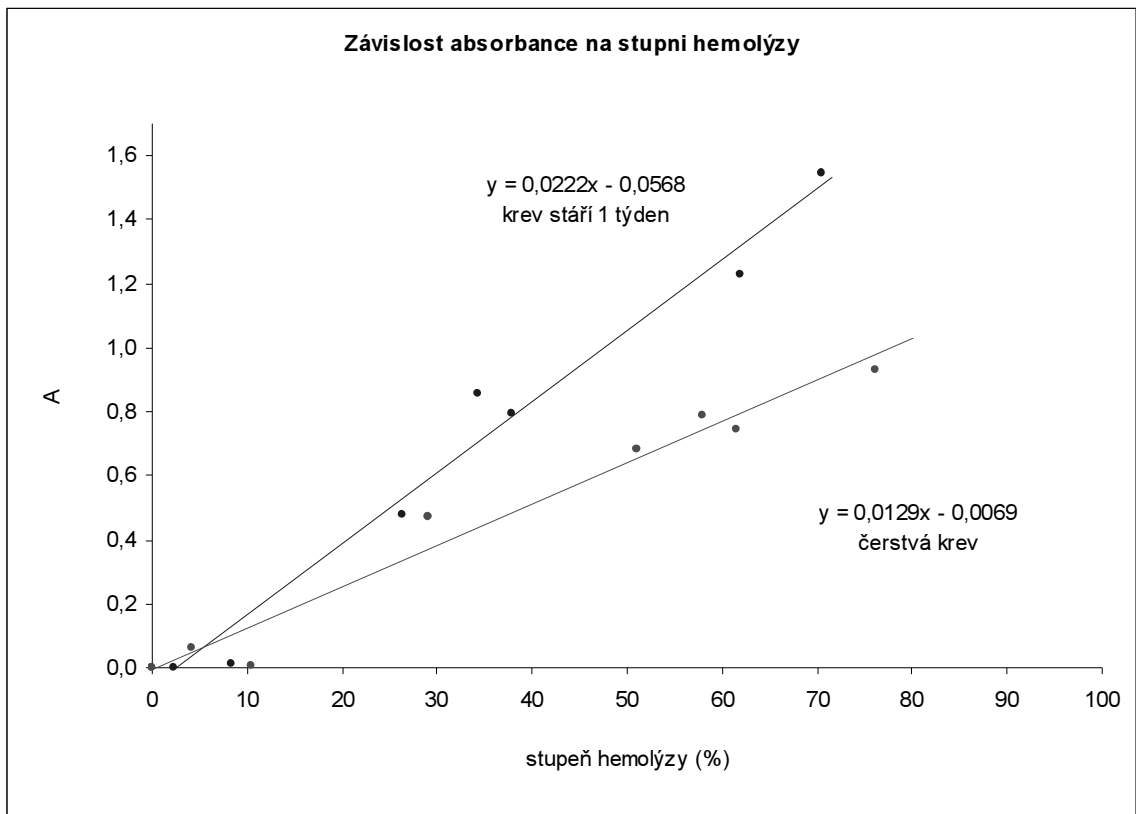
Z dříve provedených experimentů bylo zjištěno, že krev různého stáří má poněkud odlišné vlastnosti. Proto byly naměřeny dvě kalibrační závislosti. Jedna pro čerstvou krev a druhá pro krev starou jeden týden. Obě kalibrační křivky byly měřeny pro 10 % suspenzi erytrocytů. Použitá intenzita ultrazvuku byla $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ a sčítání erytrocytů v Bürkerově komůrce probíhalo ve 20 čtvercích. Do grafů byla vynesena závislost absorbance na počtu nezhemolyzovaných erytrocytů a závislost absorbance na stupni hemolýzy. Závislosti se ukázaly jako lineární, proto byly naměřenými body proloženy přímkami (metodou nejmenších čtverců) a určeny jejich rovnice.

n	t(s)	n	n _{průměr}	A	A _{průměr}	A - A _o	N.10 ⁶ (1/mm ³)	stupeň hemolýzy(%)
1	0	188	188,0	0,000	0,000	0,000	7,520	0,00
2	15	177	172,2	0,011	0,010	0,010	6,888	8,40
3	15	172		0,006				
4	15	158		0,003				
5	15	169		0,013				
6	15	185		0,016				
7	30	187	183,8	0,000	0,000	0,000	7,352	2,23
8	30	205		0,000				
9	30	161		0,000				
10	30	186		0,000				
11	30	180		0,000				
12	60	155	138,6	0,476	0,478	0,478	5,544	26,28
13	60	130		0,479				
14	60	130		0,480				
15	60	136		0,476				
16	60	142		0,481				
17	120	125	123,6	0,867	0,859	0,859	4,944	34,26
18	120	126		0,833				
19	120	124		0,870				
20	120	112		0,866				
21	120	131		0,861				
22	150	118	116,8	0,798	0,795	0,795	4,672	37,87
23	150	127		0,797				
24	150	116		0,798				
25	150	109		0,785				
26	150	114		0,797				
27	300	66	71,4	1,213	1,230	1,230	2,856	62,02
28	300	67		1,234				
29	300	88		1,239				
30	300	71		1,231				
31	300	65		1,232				
32	480	48	55,4	1,566	1,544	1,544	2,216	70,53
33	480	58		1,530				
34	480	52		1,560				
35	480	60		1,533				
36	480	59		1,530				

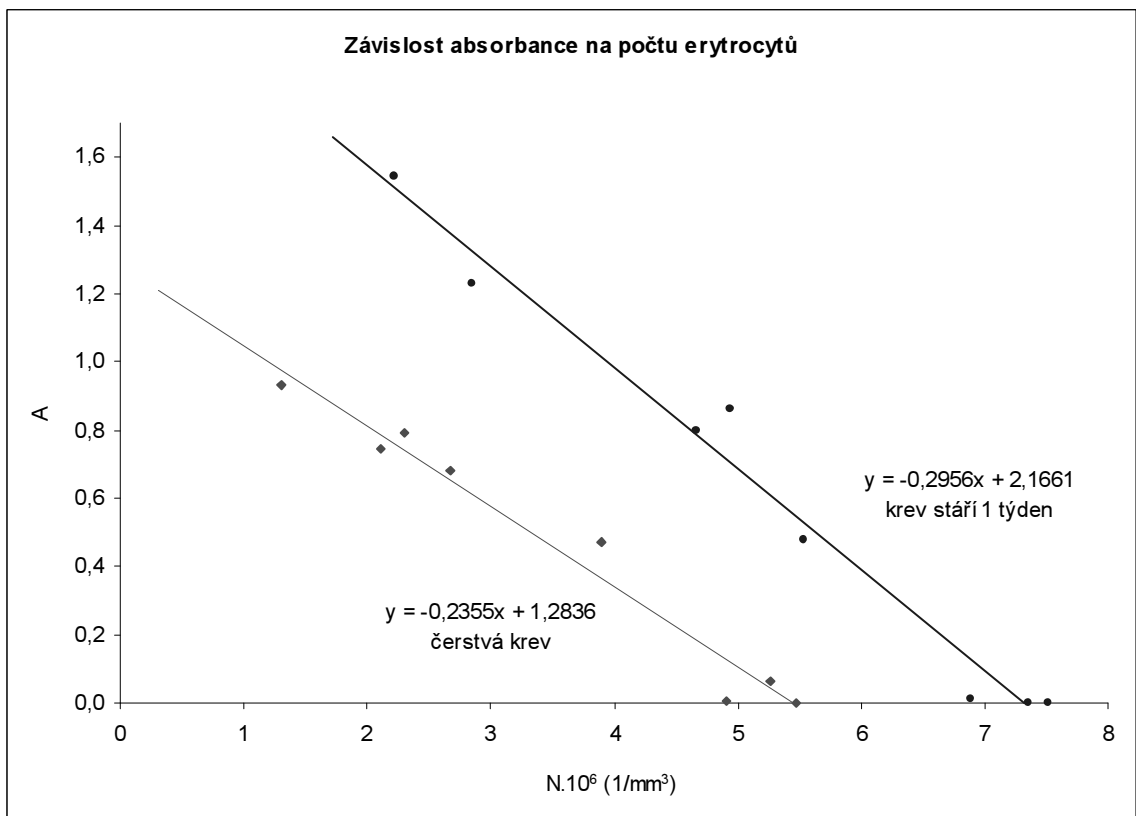
Tab č.2 Krev stáří jeden týden

n	t(s)	n	n _{průměr}	A	A _{průměr}	A - A _o	N.10 ⁶ (1/mm ³)	stupeň hemolýzy(%)
1	0	137	137,0	0,038	0,039	0,000	5,480	0,00
2	0	138		0,042				
3	0	141		0,034				
4	0	134		0,037				
5	0	135		0,043				
6	30	129	131,4	0,100	0,103	0,064	5,256	4,09
7	30	114		0,098				
8	30	139		0,114				
9	30	140		0,105				
10	30	135		0,096				
11	60	85	97,2	0,511	0,513	0,474	3,888	29,05
12	60	98		0,520				
13	60	91		0,513				
14	60	92		0,510				
15	60	120		0,509				
16	90	70	67,0	0,720	0,721	0,682	2,680	51,09
17	90	64		0,716				
18	90	74		0,720				
19	90	63		0,723				
20	90	64		0,728				
21	120	62	57,6	0,830	0,829	0,790	2,304	57,96
22	120	55		0,835				
23	120	48		0,837				
24	120	69		0,822				
25	120	54		0,823				
26	210	33	32,6	0,965	0,969	0,930	1,304	76,20
27	210	35		0,963				
28	210	30		0,981				
29	210	34		0,971				
30	210	31		0,966				
31	300	44	52,6	0,782	0,783	0,744	2,104	61,61
32	300	65		0,780				
33	300	31		0,783				
34	300	61		0,787				
35	300	62		0,783				
36	60	92	122,8	0,046	0,047	0,008	4,912	10,36
37	60	123		0,053				
38	60	134		0,048				
39	60	133		0,044				
40	60	132		0,042				

Tab. č.3 Čerstvá krev



Graf č. 2



Graf č. 3

5.2. Měření viskozity

Práh biologicky účinné intenzity se v literatuře uvádí jako $0,1\text{W}/\text{cm}^2$. S ohledem na to a z předchozích zkušeností byly pro pokusy zvoleny intenzity $0,2$ a $0,5\text{W}/\text{cm}^2$ a ozvučování probíhalo v blízkém ultrazvukovém poli. Suspenze erytrocytů byla vždy 10%.

5.2.1. Intenzita $0,2\text{W}/\text{cm}^2$

parametry měření: teplota $t = 38,2^\circ\text{C}$ (při měření viskozity)

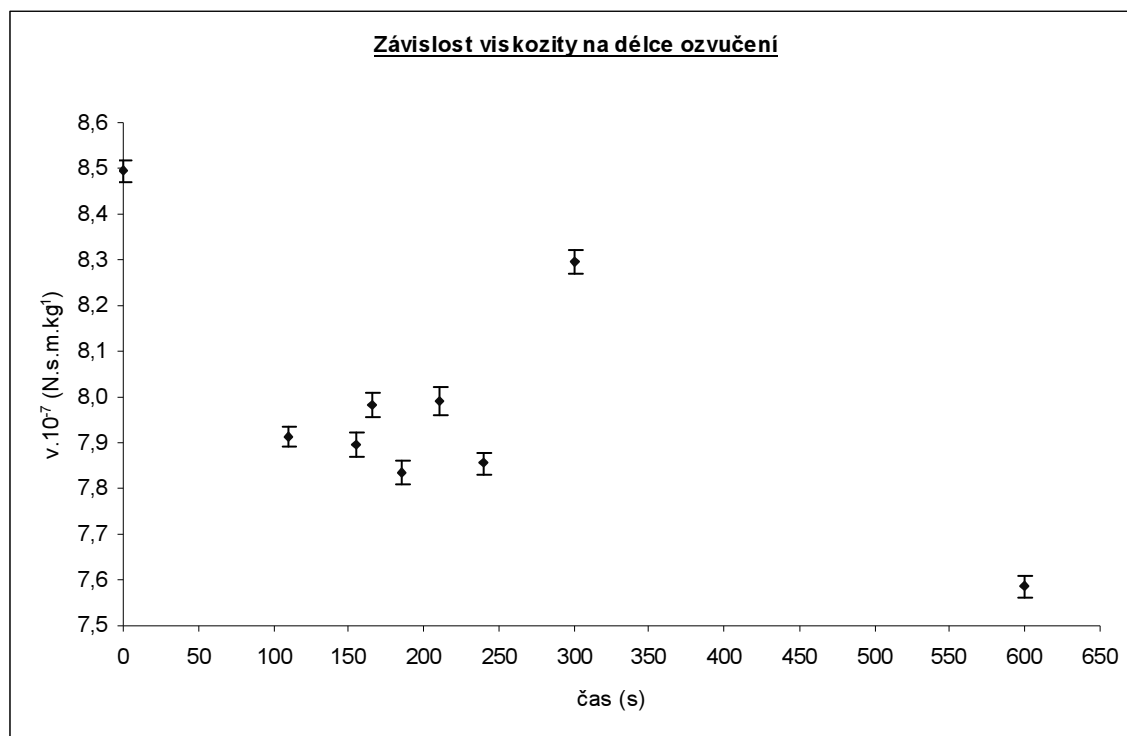
čerstvá krev

n	$t_{\text{ozv.}}$ (s)	$t_{\text{průtok}}$ (s)	$t_{\text{průtok}}$ prům.(s)	$v \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg^{-1})	A	$N \cdot 10^6$ ($1/\text{mm}^3$)	stupeň hemolýzy(%)
1	0	8,47			0,047		
2	0	8,46			0,009		
3	0	8,56			0,006		
4	0	8,46			0,008		
5	0	8,48			0,009		
6	0	8,47					
7	0	8,49			$A_{\text{průměr}}$		
8	0	8,49			$0,016 \pm 0,009$		
9	0	8,52	$8,495 \pm$	$7,555 \pm$	$A - A_0$	$5,388 \pm$	$1,682 \pm$
10	0	8,55	0,012	0,024	$0,000 \pm 0,013$	0,053	0,975
11	110	7,87			0,107		
12	110	7,92			0,098		
13	110	7,93			0,095		
14	110	7,89			0,105		
15	110	7,89			0,109		
16	110	7,92					
17	110	7,89			$A_{\text{průměr}}$		
18	110	7,95			$0,103 \pm 0,003$		
19	110	7,90	$7,912 \pm$	$7,037 \pm$	$A - A_0$	$5,030 \pm$	$8,207 \pm$
20	110	7,96	0,010	0,022	$0,087 \pm 0,009$	0,037	0,675
21	155	7,82			0,250		
22	155	7,86			0,260		
23	155	7,82			0,254		
24	155	7,89			0,257		
25	155	7,87			0,257		
26	155	7,88					
27	155	7,89			$A_{\text{průměr}}$		
28	155	7,95			$0,256 \pm 0,002$		
29	155	8,01	$7,895 \pm$	$7,022 \pm$	$A - A_0$	$4,402 \pm$	$19,667 \pm$
30	155	7,96	0,021	0,027	$0,240 \pm 0,009$	0,037	0,675

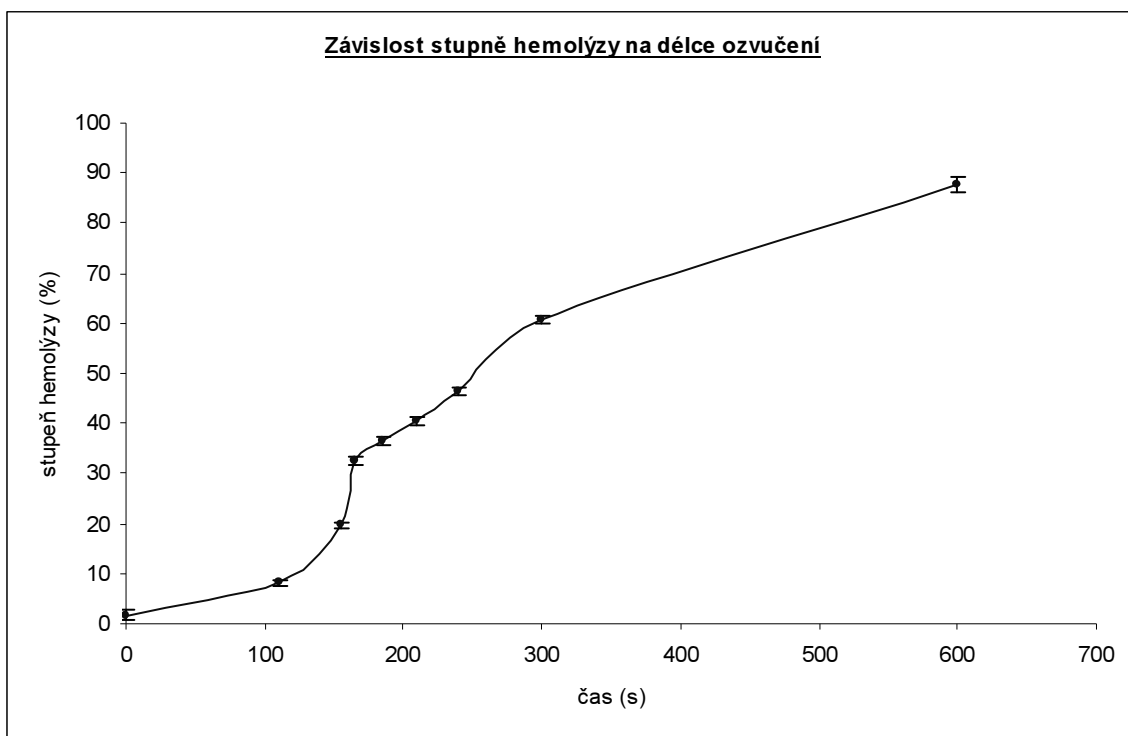
n	t _{ozv.} (s)	t _{průtok} (s)	t _{průtok} prům.(s)	v.10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	A	N.10 ⁶ (1/mm ³)	stupeň hemolýzy(%)
31	165	7,91			0,412		
32	165	7,99			0,428		
33	165	7,92			0,436		
34	165	7,95			0,430		
35	165	7,92			0,431		
36	165	8,02					
37	165	8,01			A_{průměr}		
38	165	8,04			0,427 ± 0,005		
39	165	8,04	7,983 ±	7,100 ±	A - A₀	3,696 ±	32,553 ±
40	165	8,03	0,018	0,026	0,412 ± 0,010	0,041	0,750
41	185	7,76			0,460		
42	185	7,80			0,488		
43	185	7,84			0,479		
44	185	7,75			0,483		
45	185	7,88			0,483		
46	185	7,91					
47	185	7,85			A_{průměr}		
48	185	7,84			0,479 ± 0,006		
49	185	7,82	7,834 ±	6,967 ±	A - A₀	3,486 ±	36,393 ±
50	185	7,89	0,018	0,025	0,463 ± 0,011	0,045	0,825
51	210	7,86			0,518		
52	210	7,89			0,537		
53	210	7,91			0,539		
54	210	8,03			0,537		
55	210	8,03			0,535		
56	210	8,05					
57	210	8,05			A_{průměr}		
58	210	8,00			0,533 ± 0,004		
59	210	8,05	7,992 ±	7,108 ±	A - A₀	3,261 ±	40,488 ±
60	210	8,05	0,025	0,030	0,517 ± 0,010	0,041	0,750
61	240	7,80			0,617		
62	240	7,76			0,622		
63	240	7,85			0,618		
64	240	7,85			0,601		
65	240	7,85			0,612		
66	240	7,88					
67	240	7,86			A_{průměr}		
68	240	7,90			0,614 ± 0,004		
69	240	7,90	7,855 ±	6,986 ±	A - A₀	2,929 ±	46,548 ±
70	240	7,90	0,015	0,024	0,598 ± 0,010	0,041	0,750

n	t _{ozv.} (s)	t _{průtok} (s)	t _{průtok} prům.(s)	v.10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	A	N.10 ⁶ (1/mm ³)	stupeň hemolýzy(%)
71	300	8,22			0,810		
72	300	8,22			0,786		
73	300	8,24			0,807		
74	300	8,30			0,809		
75	300	8,30			0,805		
76	300	8,32					
77	300	8,38			A_{průměr}		
78	300	8,36			0,803 ± 0,005		
79	300	8,26	8,296 ±	7,378 ±	A - A₀	2,151 ±	60,753 ±
80	300	8,36	0,020	0,027	0,788 ± 0,010	0,041	0,750
81	600	7,54			1,150		
82	600	7,50			1,129		
83	600	7,61			1,140		
84	600	7,55			1,230		
85	600	7,56			1,146		
86	600	7,64					
87	600	7,59			A_{průměr}		
88	600	7,58			1,159 ± 0,021		
89	600	7,68	7,585 ±	6,746 ±	A - A₀	0,677 ±	87,648 ±
90	600	7,60	0,017	0,024	1,146 ± 0,023	0,095	1,725

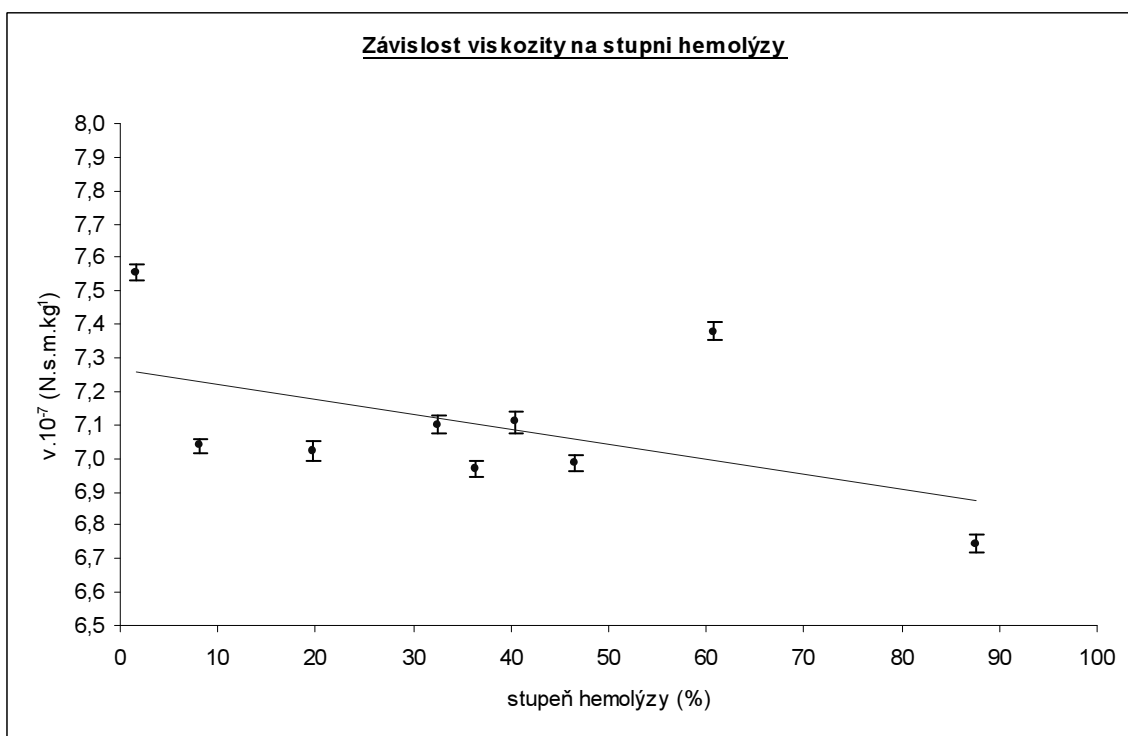
Tab. č. 4 Měření viskozity při intenzitě 0,2W/cm².



Graf č. 4



Graf č. 5



Graf č. 6

5.2.2. Intenzita $0,5\text{W}/\text{cm}^2$

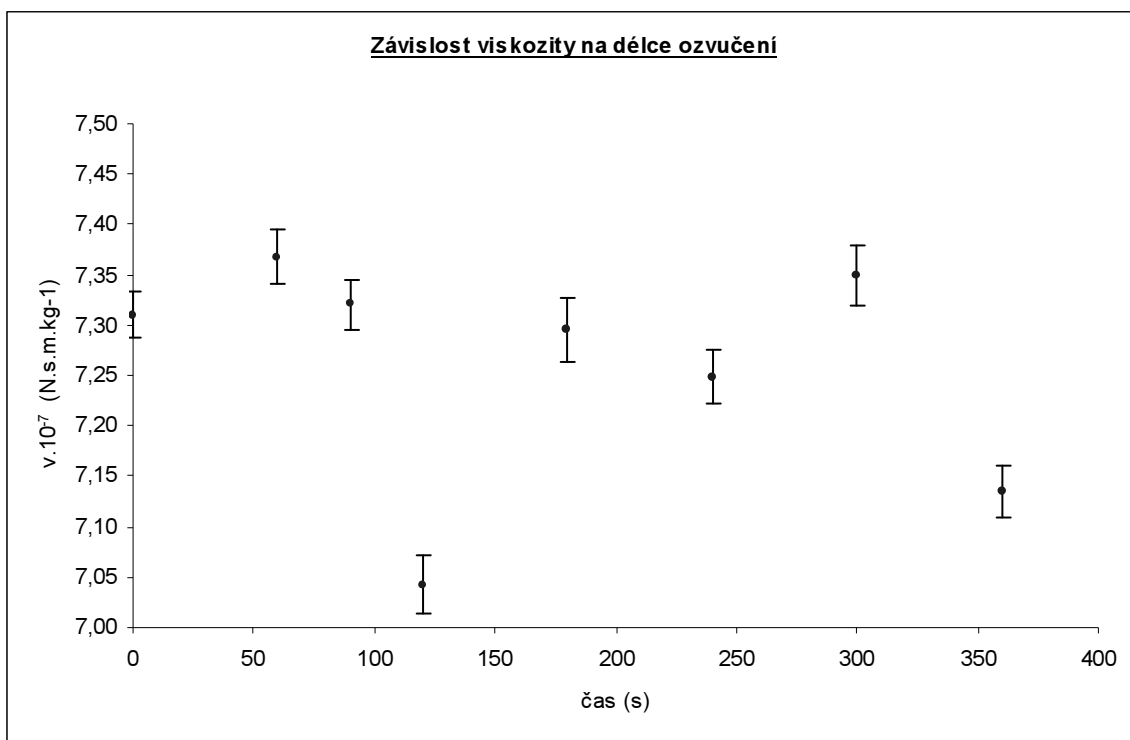
parametry měření: teplota $t = 38,8^\circ\text{C}$ (při měření viskozity),

čerstvá krev

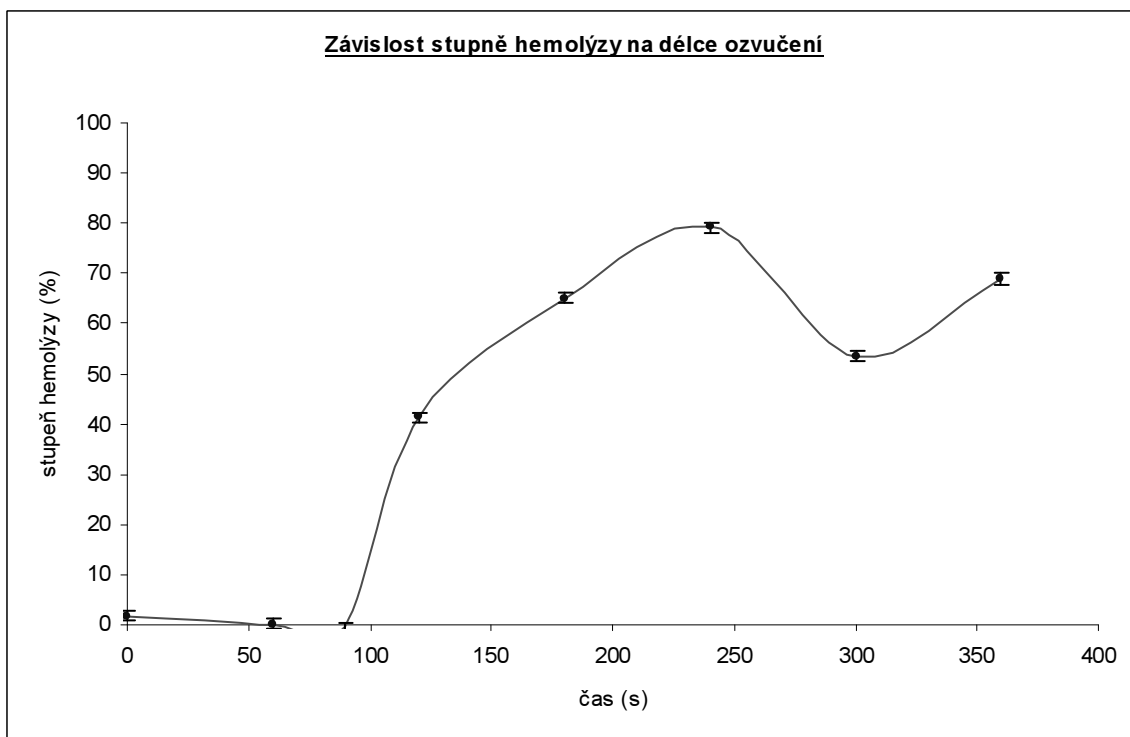
n	$t_{\text{ozv.}}$ (s)	$t_{\text{průtok}}$ (s)	$t_{\text{průtok}}$ prům.(s)	$v \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg^{-1})	A	$N \cdot 10^6$ ($1/\text{mm}^3$)	stupeň hemolýzy(%)
1	0	8,25			0,074		
2	0	8,23			0,072		
3	0	8,18			0,105		
4	0	8,17			0,122		
5	0	8,24			0,075		
6	0	8,20					
7	0	8,24			A_{průměr}		
8	0	8,25			$0,090 \pm 0,012$		
9	0	8,20	$8,219 \pm$	$7,310 \pm$	A - A₀	$5,388 \pm$	$1,682 \pm$
10	0	8,23	0,010	0,023	$0,000 \pm 0,014$	0,058	1,050
11	60	8,18			0,074		
12	60	8,22			0,093		
13	60	8,30			0,055		
14	60	8,27			0,055		
15	60	8,31			0,071		
16	60	8,28					
17	60	8,30			A_{průměr}		
18	60	8,35			$0,070 \pm 0,008$		
19	60	8,33	$8,285 \pm$	$7,368 \pm$	A - A₀	$5,470 \pm$	$0,182 \pm$
20	60	8,31	0,017	0,026	$-0,020 \pm 0,014$	0,058	1,050
21	90	8,23			0,073		
22	90	8,15			0,057		
23	90	8,17			0,056		
24	90	8,23			0,057		
25	90	8,28			0,058		
26	90	8,24					
27	90	8,20			A_{průměr}		
28	90	8,25			$0,060 \pm 0,004$		
29	90	8,26	$8,232 \pm$	$7,321 \pm$	A - A₀	$5,511 \pm$	$-0,568 \pm$
30	90	8,31	0,016	0,025	$-0,030 \pm 0,013$	0,053	0,975
31	120	7,92			0,634		
32	120	7,84			0,606		
33	120	7,84			0,618		
34	120	7,92			0,618		
35	120	7,90			0,615		
36	120	7,85					
37	120	8,02			A_{průměr}		
38	120	7,93			$0,618 \pm 0,005$		
39	120	7,92	$7,918 \pm$	$7,042 \pm$	A - A₀	$3,218 \pm$	$41,283 \pm$
40	120	8,04	0,023	0,029	$0,528 \pm 0,013$	0,053	0,975

n	t _{ozv.} (s)	t _{průtok} (s)	t _{průtok} prům.(s)	v.10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	A	N.10 ⁶ (1/mm ³)	stupeň hemolýzy(%)
41	180	8,10	8,204 ± 0,027	7,296 ± 0,032	0,935	1,915 ± 0,049	65,058 ± 0,900
42	180	8,07			0,939		
43	180	8,22			0,934		
44	180	8,15			0,933		
45	180	8,17			0,932		
46	180	8,20					
47	180	8,29			A_{průměr}		
48	180	8,27			0,935 ± 0,001		
49	180	8,28			A - A₀		
50	180	8,29			0,845 ± 0,012		
51	240	8,08	8,151 ± 0,019	7,249 ± 0,027	1,126	1,142 ± 0,049	79,158 ± 0,900
52	240	8,11			1,117		
53	240	8,10			1,125		
54	240	8,12			1,125		
55	240	8,13			1,123		
56	240	8,26					
57	240	8,13			A_{průměr}		
58	240	8,21			1,123 ± 0,002		
59	240	8,20			A - A₀		
60	240	8,17			1,033 ± 0,012		
61	300	8,17	8,263 ± 0,024	7,349 ± 0,030	0,778	2,548 ± 0,053	53,508 ± 0,975
62	300	8,13			0,782		
63	300	8,22			0,770		
64	300	8,24			0,790		
65	300	8,30			0,784		
66	300	8,32					
67	300	8,29			A_{průměr}		
68	300	8,29			0,781 ± 0,004		
69	300	8,33			A - A₀		
70	300	8,34			0,691 ± 0,013		
71	360	7,89	8,023 ± 0,019	7,135 ± 0,026	0,968	1,705 ± 0,066	68,883 ± 1,200
72	360	7,98			0,984		
73	360	8,03			0,991		
74	360	8,01			0,970		
75	360	8,07			1,019		
76	360	8,05					
77	360	8,05			A_{průměr}		
78	360	8,10			0,986 ± 0,011		
79	360	8,03			A - A₀		
80	360	8,02			0,896 ± 0,016		

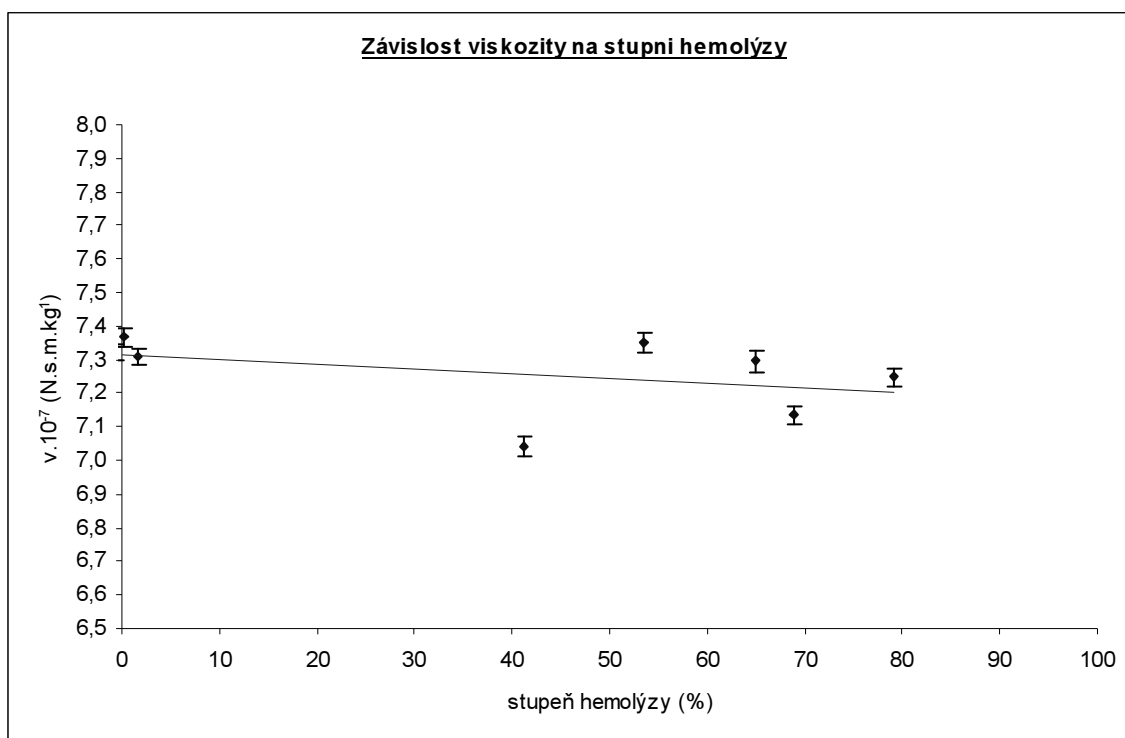
Tab. č. 5 Měření viskozity při intenzitě 0,5W/cm².



Graf č. 7



Graf č. 8



Graf č. 9

5.2.3. Látky zvyšující viskozitu

Ke studiu vlivu ultrazvuku na suspenzi erytrocytů v prostředí o vyšší viskozitě než má fyziologický roztok bylo potřeba nalézt vhodnou látku. Kritériem byla schopnost zvýšit viskozitu suspenze bez vedlejších efektů na červené krvinky jako je změna citlivosti, změna struktury, atd. V tabulce č. 6 je shrnutí vyzkoušených látek a jejich interakce se suspenzí erytrocytů.

látka	interakce se suspenzí erytrocytů
Polysorbát 20	po několika hodinách samovolná 100% hemolýza
Polysorbát 80	mírně ostnitý tvar erytrocytů, erytrocyty nelze zhemolyzovat
Dextran ($M_r=150000$)	1,5% roztok hemolyzuje už při $I=0,1W/cm^2$ po čase 15s
Dextran ($M_r=500000$)	1,5% roztok samovolně hemolyzuje
Želatina	5% roztok vykazuje mírnou koagulaci
TELEBRIX 30	vhodná látka bez negativních efektů
IOPAMIDOLUM	vhodná látka bez negativních efektů

Tab. č. 6

Následující experimenty s přidavkem látek zvyšujících viskozitu (4.2.4., 4.2.5.) probíhaly v ultrazvukovém poli s intenzitou $0,5W/cm^2$. Doba ozvučení byla zvolena, po předchozí optimalizaci, na 165s a suspenze erytrocytů měla opět koncentraci 10%. Jediná veličina, která se tak v průběhu měření měnila byla koncentrace přidavné látky.

5.2.4. TELEBRIX 30

parametry měření: teplota $t = 36,5^{\circ}\text{C}$ (při měření viskozity)

čerstvá krev

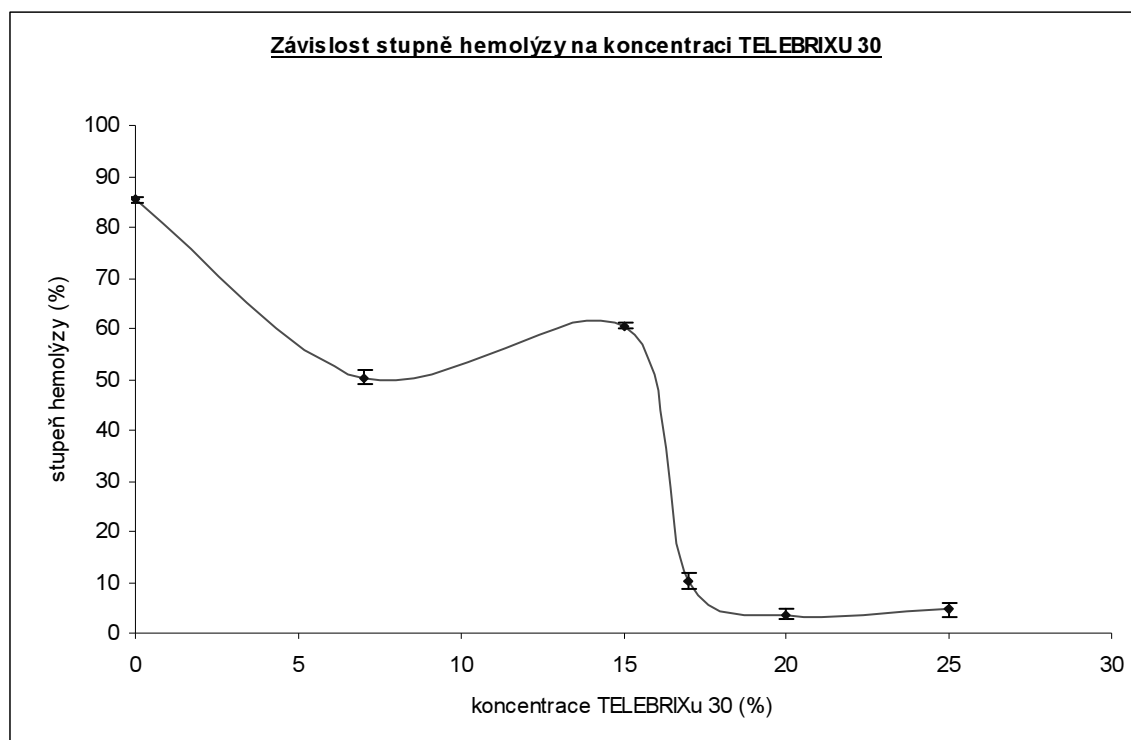
intenzita $I=0,5\text{W}/\text{cm}^2$

délka ozvučení $t=165\text{s}$

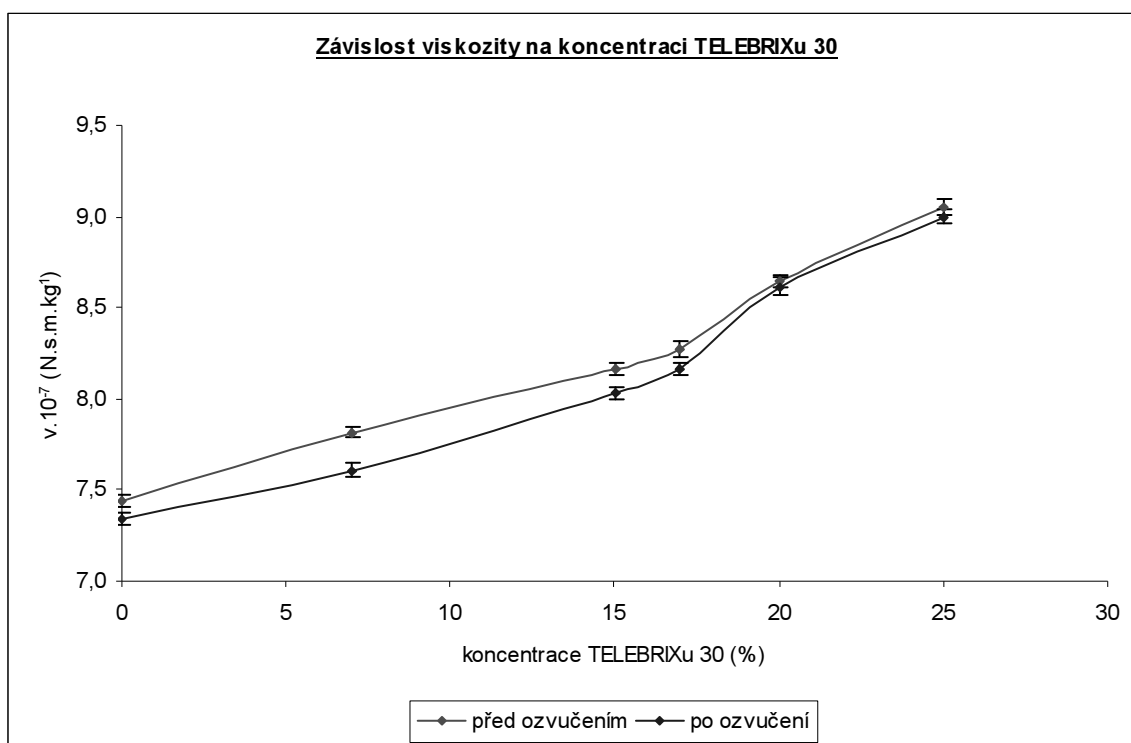
n	C_{TEL} (%)	$t_{1\text{průtok}}$ (s)	$t_{1\text{průtok}}$ prům.(s)	$t_{2\text{průtok}}$ (s)	$t_{2\text{průtok}}$ prům.(s)	A	A - A ₀	stupeň hemolýzy(%)
1	0	8,25	8,366 ±	8,15	8,255 ±	1,242	1,115 ±	N.10 ⁶ (1/mm ³) 0,805 ± 85,308 ± 0,525
2	0	8,29	0,028	8,16	0,029	1,239	0,007	
3	0	8,34	$v_1 \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg ⁻¹)	8,24	$v_2 \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg ⁻¹)	1,249	0,029	
4	0	8,36		8,21		1,244		
5	0	8,38	8,31	8,31	1,253	0,029		
6	0	8,42	7,440 ±	8,34	7,342 ±	A _{prům}	0,805 ±	
7	0	8,42	0,033	8,33	0,033	1,245 ±	0,029	
8	0	8,47		8,30		0,003		
9	7	8,71	8,785 ±	8,51	8,554 ±	0,773	0,649 ±	N.10 ⁶ (1/mm ³) 2,720 ± 50,358 ± 1,350
10	7	8,74	0,021	8,47	0,029	0,785	0,018	
11	7	8,82	$v_1 \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg ⁻¹)	8,50	$v_2 \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg ⁻¹)	0,784	0,029	
12	7	8,78		8,48		0,806		
13	7	8,76	8,57	8,57	0,788	0,788	0,029	
14	7	8,76	7,813 ±	8,67	7,608 ±	A _{prům}	2,720 ±	
15	7	8,87	0,029	8,59	0,034	0,787 ±	0,074	
16	7	8,84		8,64		0,006		
17	15	9,13	9,181 ±	8,94	9,031 ±	0,908	0,783 ±	N.10 ⁶ (1/mm ³) 2,170 ± 60,408 ± 0,600
18	15	9,18	0,023	8,94	0,027	0,925	0,008	
19	15	9,15	$v_1 \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg ⁻¹)	8,99	$v_2 \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg ⁻¹)	0,897	0,027	
20	15	9,12		9,04		0,924		
21	15	9,14	9,03	9,03	0,911	0,911	0,027	
22	15	9,20	8,165 ±	9,08	8,032 ±	A _{prům}	2,170 ±	
23	15	9,23	0,031	9,12	0,033	0,913 ±	0,033	
24	15	9,30		9,11		0,006		
25	17	9,17	9,299 ±	9,12	9,180 ±	0,303	0,112 ±	N.10 ⁶ (1/mm ³) 4,927 ± 10,082 ± 1,500
26	17	9,19	0,039	9,10	0,022	0,211	0,020	
27	17	9,21	$v_1 \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg ⁻¹)	9,16	$v_2 \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg ⁻¹)	0,250	0,022	
28	17	9,30		9,16		0,230		
29	17	9,35	9,17	9,17	0,217	0,217	0,022	
30	17	9,40	8,270 ±	9,24	8,164 ±	A _{prům}	4,927 ±	
31	17	9,32	0,042	9,24	0,030	0,242 ±	0,078	
32	17	9,45		9,25		0,019		

n	C _{TEL} (%)	t _{1průtok} (s)	t _{1průtok} prům.(s)	t _{2průtok} (s)	t _{2průtok} prům.(s)	A	A - A ₀	stupeň hemolýzy(%)	
33	20	9,64	9,721 ±	9,57	9,688 ±	0,182	0,027 ±	3,707 ± 0,975	
34	20	9,66	0,026	9,57	0,046	0,171	0,013		
35	20	9,72	v ₁ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	9,61	v ₂ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	0,136	N.10 ⁶ (1/mm ³)		
36	20	9,68		9,63		0,134			
37	20	9,67		9,74		0,163			
38	20	9,80		8,646 ±		9,66			8,616 ±
39	20	9,79	0,034	9,85	0,052	0,157 ±	0,045		
40	20	9,81		9,87		0,011			
41	25	10,06	10,176 ±	9,97	10,121 ±	0,182	0,039 ±		4,607 ± 1,275
42	25	10,10	0,042	10,04	0,038	0,166	0,017		
43	25	10,11	v ₁ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	10,04	v ₂ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	0,177	N.10 ⁶ (1/mm ³)		
44	25	10,04		10,10		0,185			
45	25	10,29		10,15		0,172			
46	25	10,23		9,050 ±		10,23		9,001 ±	
47	25	10,32	0,045	10,25	0,042	0,176 ±	0,016		
48	25	10,26		10,19		0,004			

Tab. č. 7



Graf č. 10



Graf č. 11

5.2.5. IOPAMIDOLUM

parametry měření: teplota $t = 36,4^{\circ}\text{C}$ (při měření viskozity)

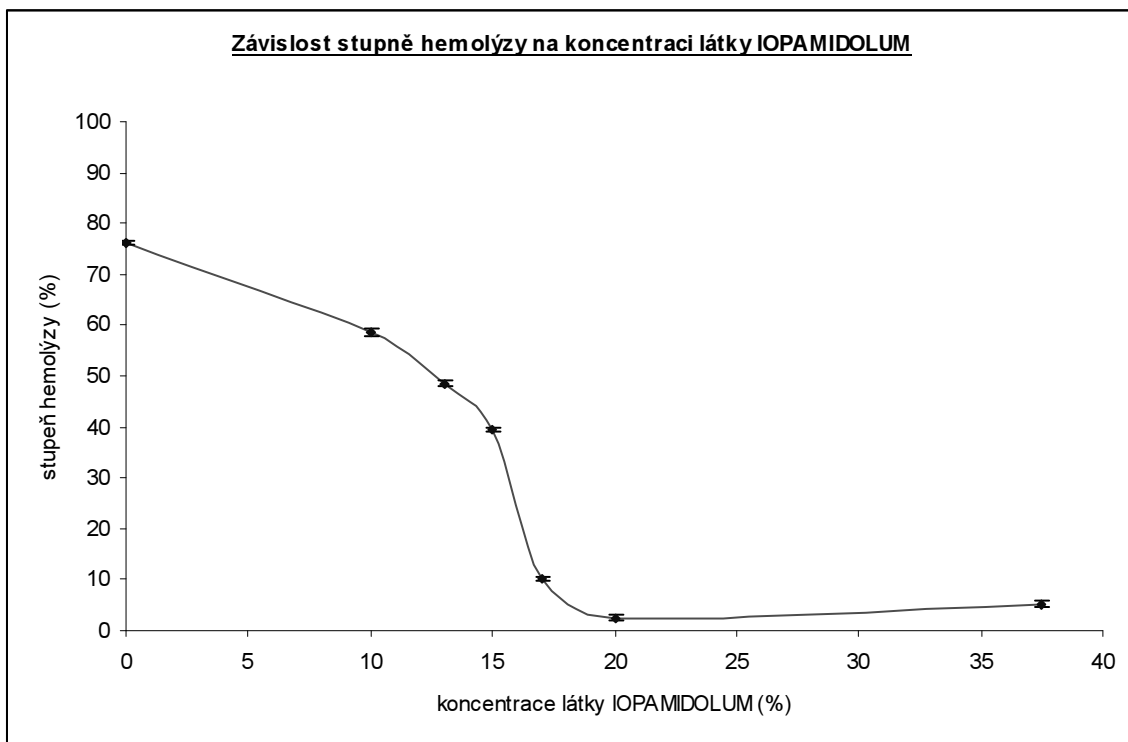
krev stárí přibližně 1 týden

intenzita $I=0,5\text{W}/\text{cm}^2$, délka ozvučení $t=165\text{s}$

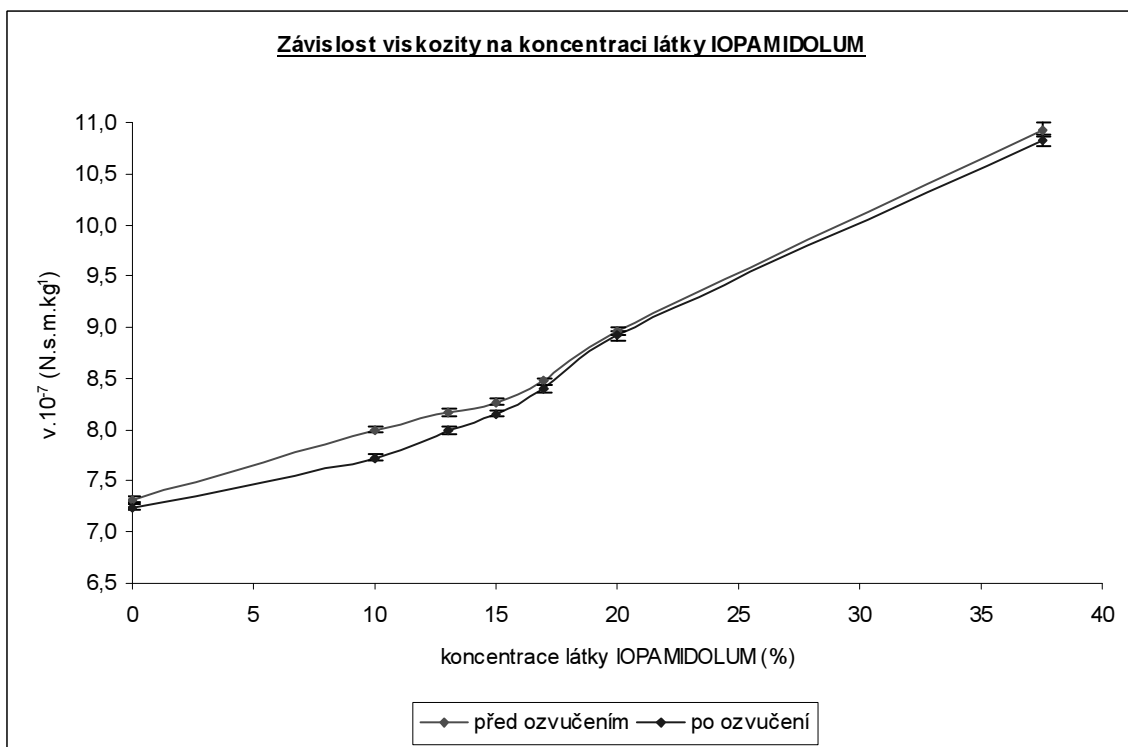
n	C_{IOP} (%)	$t_{1\text{průtok}}$ (s)	$t_{1\text{průtok}}$ prům.(s)	$t_{2\text{průtok}}$ (s)	$t_{2\text{průtok}}$ prům.(s)	A	A - A ₀	stupeň hemolýzy(%)
1	0	8,17	8,235 ±	8,08	8,141 ±	1,715	1,659 ±	76,170 ± 0,572
2	0	8,20	0,015	8,08	0,022	1,748	0,013	
3	0	8,21	$v_1 \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg ⁻¹)	8,08	$v_2 \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg ⁻¹)	1,737	$N \cdot 10^6$ (1/mm ³)	
4	0	8,27		8,20		1,703		
5	0	8,25		8,13		1,747		
6	0	8,27		7,324 ±		8,17		
7	0	8,23	0,025	8,17	0,028	1,730 ±	0,043	
8	0	8,28		8,22		0,010		
9	10	8,83	8,998 ±	8,56	8,689 ±	1,299	1,260 ±	58,609 ± 0,616
10	10	9,00	0,030	8,62	0,027	1,345	0,014	
11	10	9,02	$v_1 \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg ⁻¹)	8,74	$v_2 \cdot 10^{-7}$ (Nsmkg ⁻¹)	1,337	$N \cdot 10^6$ (1/mm ³)	
12	10	8,97		8,65		1,320		
13	10	8,98		8,73		1,353		
14	10	9,05		8,003 ±		8,74		
15	10	9,03	0,035	8,73	0,032	1,331 ±	0,046	
16	10	9,10		8,74		0,011		

n	C _{IOF} (%)	t _{1průtok} (s)	t _{1průtok} prům.(s)	t _{2průtok} (s)	t _{2průtok} prům.(s)	A	A - A ₀	stupeň hemolýzy(%)
17	13	9,14	9,184 ±	8,82	8,979 ±	1,120	1,031 ±	48,530 ± 0,660
18	13	9,10	0,022	8,97	0,036	1,067	0,015	
19	13	9,15	v ₁ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	8,91	v ₂ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	1,128	N.10 ⁶ (1/mm ³)	
20	13	9,20		8,95		1,092		
21	13	9,20	8,96	8,96	1,106	A _{prům}	3,870 ±	
22	13	9,16	8,168 ±	9,05	7,986 ±	1,103 ±	0,050	
23	13	9,24	0,030	9,13	0,039	0,012		
24	13	9,28		9,04				
25	15	9,21	9,303 ±	9,13	9,170 ±	0,897	0,825 ±	39,464 ± 0,440
26	15	9,19	0,028	9,14	0,022	0,906	0,010	
27	15	9,29	v ₁ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	9,07	v ₂ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	0,904	N.10 ⁶ (1/mm ³)	
28	15	9,27		9,16		0,881		
29	15	9,36	8,274 ±	9,20	8,155 ±	0,895	4,552 ±	
30	15	9,36	0,034	9,18	0,030	A _{prům}	0,033	
31	15	9,38		9,22		0,897 ±		
32	15	9,36		9,26		0,005		
33	17	9,44	9,525 ±	9,34	9,449 ±	0,224	0,160 ±	10,195 ± 0,396
34	17	9,53	0,023	9,36	0,033	0,240	0,009	
35	17	9,47	v ₁ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	9,35	v ₂ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	0,233	N.10 ⁶ (1/mm ³)	
36	17	9,51		9,47		0,230		
37	17	9,48	8,471 ±	9,49	8,404 ±	0,231	6,753 ±	
38	17	9,58	0,032	9,53	0,038	A _{prům}	0,030	
39	17	9,61		9,50		0,232 ±		
40	17	9,58		9,55		0,003		
41	20	9,96	10,085 ±	9,83	10,024 ±	0,059	-0,014 ±	2,537 ± 0,440
42	20	10,00	0,032	9,96	0,037	0,051	0,010	
43	20	10,09	v ₁ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	9,97	v ₂ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	0,068	N.10 ⁶ (1/mm ³)	
44	20	10,05		10,05		0,051		
45	20	10,08	8,969 ±	10,07	8,915 ±	0,058	7,329 ±	
46	20	10,15	0,038	10,12	0,041	A _{prům}	0,033	
47	20	10,12		10,10		0,057 ±		
48	20	10,23		10,09		0,004		
49	37,5	12,03	12,288 ±	11,89	12,174 ±	0,107	0,045 ±	5,133 ± 0,572
50	37,5	12,14	0,062	12,03	0,057	0,104	0,013	
51	37,5	12,20	v ₁ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	12,20	v ₂ .10 ⁻⁷ (Nsmkg ⁻¹)	0,141	N.10 ⁶ (1/mm ³)	
52	37,5	12,26		12,15		0,128		
53	37,5	12,36	10,929 ±	12,24	10,827 ±	0,103	7,134 ±	
54	37,5	12,34	0,063	12,24	0,059	A _{prům}	0,043	
55	37,5	12,45		12,27		0,117 ±		
56	37,5	12,52		12,37		0,009		

Tab. č. 8



Graf č. 12



Graf č. 13

5.3. Měření povrchového napětí

parametry měření: teplota při temperaci $t = 36,8^{\circ}\text{C}$

čerstvá krev

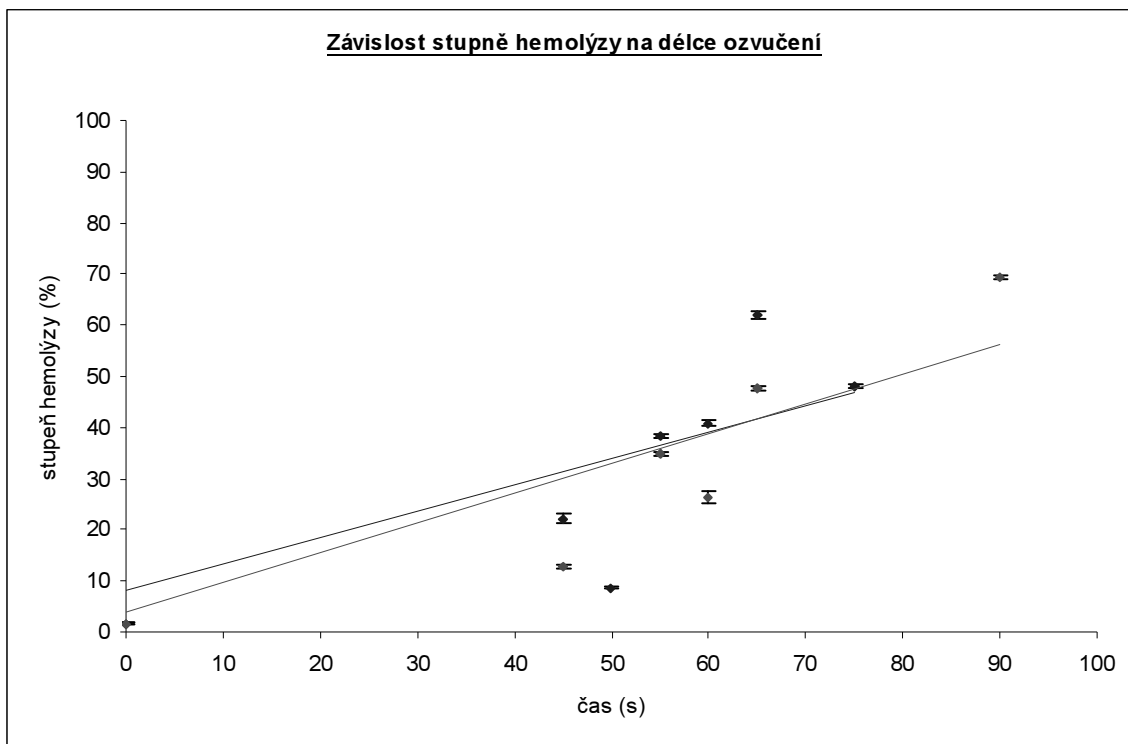
intenzita $I=0,2\text{W}/\text{cm}^2$

n	t_{ozv} (s)	$m_{75\text{kapek}}$ (g)	$\sigma \cdot 10^{-2}(\text{N} \cdot \text{m}^{-1})$	A	$N \cdot 10^6(1/\text{mm}^3)$	st.hemolýzy(%)
1	0	5,578	$7,261 \pm 0,065$	$0,000 \pm 0,004$	$5,388 \pm 0,016$	$1,682 \pm 0,300$
2	45	5,568	$7,248 \pm 0,065$	$0,274 \pm 0,012$	$4,262 \pm 0,049$	$22,232 \pm 0,900$
3	50	5,576	$7,258 \pm 0,065$	$0,092 \pm 0,003$	$5,010 \pm 0,012$	$8,582 \pm 0,225$
4	55	5,554	$7,230 \pm 0,065$	$0,491 \pm 0,005$	$3,370 \pm 0,021$	$38,508 \pm 0,375$
5	60	5,488	$7,144 \pm 0,064$	$0,522 \pm 0,009$	$3,242 \pm 0,037$	$40,833 \pm 0,675$
6	65	5,513	$7,176 \pm 0,064$	$0,804 \pm 0,009$	$2,083 \pm 0,037$	$61,983 \pm 0,675$
7	75	5,547	$7,221 \pm 0,065$	$0,620 \pm 0,006$	$2,840 \pm 0,025$	$48,183 \pm 0,450$

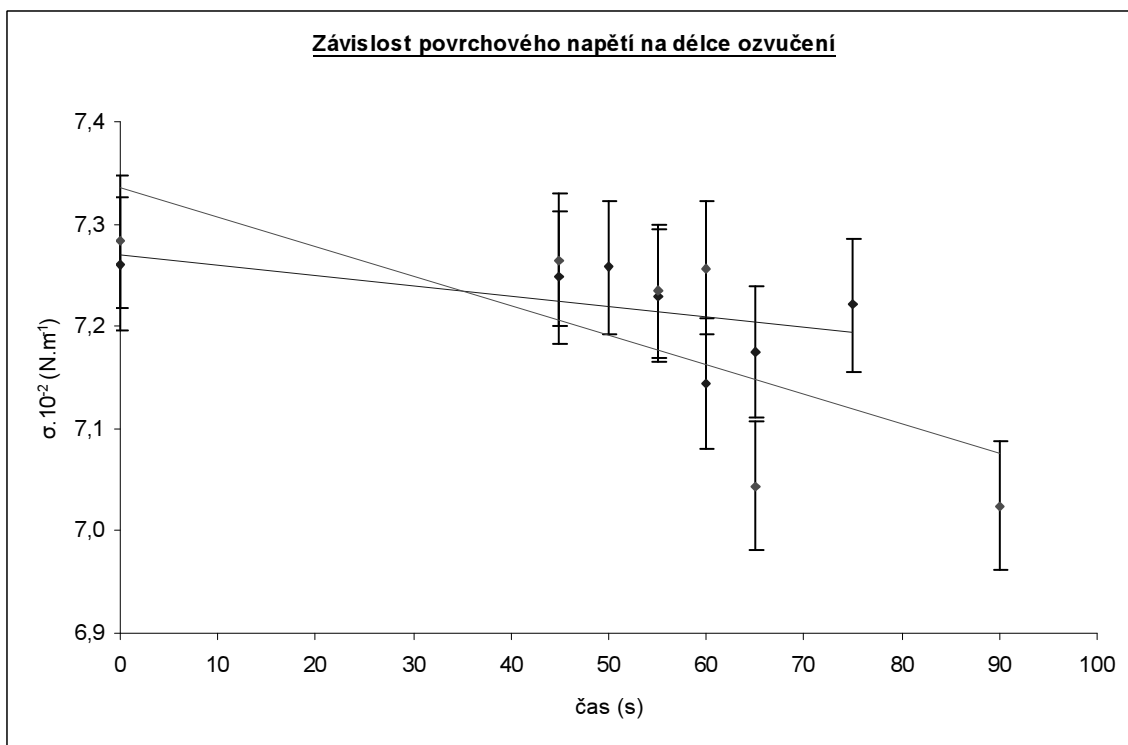
n	t_{ozv} (s)	$m_{75\text{kapek}}$ (g)	$\sigma \cdot 10^{-2}(\text{N} \cdot \text{m}^{-1})$	A	$N \cdot 10^6(1/\text{mm}^3)$	st.hemolýzy(%)
8	0	5,595	$7,283 \pm 0,065$	$0,000 \pm 0,003$	$5,388 \pm 0,012$	$1,682 \pm 0,225$
9	45	5,581	$7,265 \pm 0,065$	$0,147 \pm 0,004$	$4,784 \pm 0,016$	$12,707 \pm 0,300$
10	55	5,558	$7,235 \pm 0,065$	$0,444 \pm 0,004$	$3,563 \pm 0,016$	$34,983 \pm 0,300$
11	60	5,575	$7,257 \pm 0,065$	$0,330 \pm 0,003$	$4,032 \pm 0,012$	$26,432 \pm 0,225$
12	65	5,411	$7,044 \pm 0,063$	$0,612 \pm 0,005$	$2,872 \pm 0,021$	$47,583 \pm 0,375$
13	90	5,397	$7,025 \pm 0,063$	$0,903 \pm 0,007$	$1,676 \pm 0,029$	$69,408 \pm 0,525$

Tab. č.9

Tabulka č. 9 obsahuje měření povrchového napětí ve dvou blocích dva dny následující po sobě.



Graf č. 14



Graf č. 15

6. Diskuze

6.1. Krev

Jak již bylo zmíněno v odstavci 3.3., k měření byla používána koňská krev. Jedním z důvodů byla skutečnost, že Biofyzikální centrum LF má s Klinikou chorob koní na Veterinární a farmaceutické univerzitě v oblasti dodávání krve dobré zkušenosti již několik let. Bylo by nepochybně lepší, z hlediska účelu studie pro klinickou praxi, používat lidskou krev. Ta je ale potencionálně vysoce infekčním materiálem a práce s ní vyžaduje zvláštní hygienická opatření a povolení.

Použití koňské krve má řadu výhod i nevýhod. Za výhodu lze považovat množství červených krvinek v 1mm^3 krve, které se pohybuje v rozmezí $6-9 \cdot 10^6$ (Mornstein a kol. 1996) a je tedy přibližně srovnatelné s množstvím erytrocytů u zdravého lidského jedince, které se pohybuje mezi $4,5-5 \cdot 10^6$ (Pěgřím, Valachovič 1969). Velkou nevýhodou je nemožnost odebrání krve z jednoho zdroje, neboť měření probíhalo několik měsíců. Navíc každý kůň, ze kterého byla krev odebrána, trpěl nějakou chorobou a její následky se mohly projevit i v aktuálním složení krve a její citlivosti. Některé práce (Forýtková 1992) dokonce uvádějí, že krev v oběhovém systému má během 24 hodinového denního cyklu různou citlivost a záleží tak i na tom, kdy k odběru dojde. Z výše uvedeného je patrné, že nebylo technicky zvládnutelné zajistit naprostou uniformitu všech krevních suspenzí a to se mohlo při porovnávání jednotlivých sad měření negativně projevit.

6.2. Metodika ozvučování

Ozvučování probíhalo ve skleněné nádobce s plochým dnem (viz obr. č. 3). Zpočátku proběhly pokusy i se speciálně upravenou nádobkou, která měla dno nahrazeno krycím mikroskopickým sklíčkem. Důvodem měl být menší útlum ultrazvukového vlnění. Tento efekt se ale při určení velikosti hemolýzy nepotvrdil, a proto byla používána nádobka s plochým dnem. Příčinu lze hledat pravděpodobně ve způsobu ozvučování, kdy zkumavka byla ve vertikální poloze, přes parafinový olej, přímo v kontaktu s ozvučovací hlavicí.

Mezi sekundární fyzikální účinky ultrazvuku patří mimo jiné přeměna mechanické energie na tepelnou. Při měření je tedy důležité pozorovat, jestli hemolýzu neovlivňuje prudký nárůst teploty. Byl učiněn předpoklad, že nedojde k velkému nárůstu teploty, protože ozvučování délka při experimentech nepřesáhla 6 minut. Pouze v jednom případě

to bylo 10 minut z důvodu snahy o dosažení 100% hemolýzy. Navíc ozvučování probíhalo v blízkém poli, které se vyznačuje nehomogenitou a rozbíhavostí ultrazvukových vln. Docházelo by ke zvýšení teploty i v okolí a chlazení by bylo málo účinné. Byly provedeny zkušební pokusy k posouzení vlivu teploty na hemolýzu a to bez chlazení a s chlazením vodní lázní s přídavkem ledu. Výsledkem byl jen malý nárůst teploty a prakticky stejná velikost hemolýzy v obou případech. Z toho důvodu při měření nebylo použito chlazení. Většina autorů ve svých pracích využívá vzdáleného ultrazvukového pole a homogenní vlnění směřuje přímo do ozvučovacího prostoru. Vzorek ozvučuje déle než deset minut a využívá tak chlazení (např. Vaškovicová 2005).

Ultrazvukové vlny vystupující z hlavice jsou na několika fázových rozhraních odrazeny a ztlumeny. Odraz může nastat i od hladiny krevní suspenze a vzniká tak stojaté vlnění. V maximech tohoto vlnění může interferencí vzniknout až dvojnásobná intenzita vlnění proti intenzitě nesené postupujícími vlnami (Mornstein 1994).

6.3. Měření

6.3.1. Koncentrace suspenze erytrocytů

Prvním úkolem bylo zjistit optimální koncentraci suspenze erytrocytů vhodnou k provádění pokusů. V práci Gorčíka (2003) byla použita 2% suspenze, ale ozvučování probíhalo na výkonově slabším ultrazvukovém zdroji. Pro naše pokusy byla 2% suspenze málo koncentrovaná. Již po několika desítkách sekund při intenzitě $0,2\text{W}/\text{cm}^2$ docházelo k 100% hemolýze. Byly provedeny zkušební experimenty i s koncentracemi 5, 10 a 20%. Nejnižší koncentrace vhodná k experimentům se ukázala 10%, protože čas potřebný k 100% hemolýze je v řádu minut a to je již dostatečně dlouhá doba pro průkazné výsledky. Proto je ve všech experimentech použita 10% suspenze erytrocytů.

6.3.2. Kalibrační křivky

Z prací mnoha autorů je známo, že starší buňky jsou citlivější. Tento fenomén byl pozorován jako rychlejší nástup hemolýzy u experimentů se starší krví. Byly naměřeny a sestrojeny kalibrační křivky pro krvinky čerstvé a stáří jeden týden. V grafech č. 2 a 3 lze sledovat pouze rozdílné počáteční množství erytrocytů v čerstvé a jeden týden staré krvi. Tento rozdíl není dán stářím krve, ale podílí se na něm především fyziologický stav koně, ze kterého vzorek pochází. Průběh hemolýzy je již podobný. Abychom mohli zvolit správnou kalibrační křivku, bylo nutné u každého nového vzorku krve stanovit počet

erytrocytů. Ve třetím sloupci tabulek č. 2 a 3 je vidět poměrně značný rozptyl spočítaných erytrocytů v Bürkerově komůrce od průměrné hodnoty. Tento jev trochu snižuje kvalitu kalibračních křivek. Příčinou může být nehomogenita suspenze, vzájemné ovlivňování se erytrocytů či jiné neznámé efekty.

6.3.3. Viskozita při $I=0,2$ a $0,5\text{W/cm}^2$

Z tabulek č. 4 a 5 lze vysledovat několik zajímavých tendencí. Doby průtoků vykazují relativní chyby menší než 0,5%. A to i přes to, že průchod dolního menisku kapaliny přes rysku nezaznamenávalo optické čidlo, ale byl odhadován zrakem. Z přesnosti měření doby průtoku plyne i přesnost určení viskozity opět s relativní chybou menší než 0,5%.

Grafy č. 4 a 7 zobrazují závislost viskozity na délce ozvučení. Jak je vidět, až na pár výjimek, získané hodnoty viskozity se vzájemně překrývají chybovými úsečkami a nelze tedy vysledovat jak se mění viskozita s délkou ozvučení.

Více signifikantní výsledky poskytují grafy č. 6 a 9, které zobrazují závislost viskozity na stupni hemolýzy. Grafy při obou intenzitách vykazují klesající průběh, což je naprosto ve shodě s teorií. Viskozitu způsobují dispergované látky a částice obsažené v suspenzi, jako jsou erytrocyty, jejichž počet při stoupající hemolýze klesá. Mechanickým poškozením membrány (tlakovým spádem, třecími či stříhovými silami) erytrocyty lyzují a snižuje se tak jejich vliv na viskozitu. Jiné látky suspenze neobsahuje, a tak lze usoudit, že na snižování viskozity mají vliv jen hemolyzované erytrocyty. Lze uvažovat i příspěvek bílkovin uvolněných ze zlyzovaných erytrocytů. Pro obhajobu tohoto tvrzení byl proveden experiment s ozvučením fyziologického roztoku, kterým je suspenze ředěna. Výsledkem byla nezměněná viskozita.

Zcela podle očekávání vypadá závislost stupně hemolýzy na délce ozvučení vynesena v grafech č. 5 a 8. S narůstajícím časem se zvyšuje stupeň hemolýzy. Při obou intenzitách je pozoruhodné to, že po určitou dobu od začátku ozvučování téměř nedochází k hemolýze. Erytrocyty po dobu přibližně 50s odolávají působení ultrazvuku a až po této době nastává rychlý nástup hemolýzy.

Měření lze shrnout tak, že rozdíly ve viskozitě jsou velmi malé. Dokonalejším zařízením než je Ostwaldův viskozimetr by bylo asi možné stanovit viskozitu přesněji, bez překrývání chybových úseček, ale i tak by změna viskozity nebyla vhodným dozimetrem ultrazvukové hemolýzy.

6.3.4. Látky ovlivňující viskozitu

Dalším objektem zájmu se stala ultrazvuková hemolýza suspenze erytrocytů s přidavkem látky zvyšující viskozitu. Důvodem byla snaha o simulaci podobných podmínek jako jsou *in vivo*. Vysoká viskozita krve, která je 4,5 až 5 krát vyšší než u vody, je způsobena nejen erytrocyty, ale i bílkovinami krevní plasmy.

Byla hledána látka, která zvýšení viskozity zajistí, ale bude zcela inertní, tj. nebude ovlivňovat morfologii ani citlivost erytrocytů. Výsledky pokusů jsou shrnuty v tabulce č. 6. Jediné dvě vyzkoušené látky s požadovanými vlastnostmi byla kontrastní rentgenová činidla používaná v medicíně (TELEBRIX 30 a IOPAMIDOLUM). Ostatní látky (viz tab. č. 6) hemolyzovaly krvinky přímo, po několika hodinách nebo po velmi krátké době v ultrazvukovém poli.

6.3.5. Viskozita ovlivněná přidavkem látek

Měření bylo provedeno postupně s látkami TELEBRIX 30 a IOPAMIDOLUM. V sérii zkušebních pokusů byl optimalizován poměr mezi délkou ozvučení, koncentrací přidané látky, zvýšením viskozity a mírou hemolýzy. Délka ozvučování pak byla stanovena na 165s. Koncentrace byly voleny v rozmezí 0 až 40%.

Rozdílem oproti měření viskozity v 5.2.1. a 5.2.2. byl fakt, že doba průtoku byla měřena před ozvučením i po něm. Důvodem byla zkouška jiného přístupu k určení působení ultrazvuku pouze na látku zvyšující viskozitu. Z grafů č. 11 a 13 lze vyvodit, že ultrazvuk nemá na samotné látky zvyšující viskozitu žádný vliv. Mírný, ale konstantní, pokles doby průtoku (patrný z výše uvedených grafů i z tabulek č. 7 a 8) je způsoben menším napipetovaným objemem měřené suspenze do viskozimetru. Pokles objemu je patrně vlivem ztrát způsobených manipulací se suspenzí a je u všech pokusů přibližně stejný. Tendence v závislosti viskozity na koncentraci TELEBRIXu 30 a látky IOPAMIDOLUM je před ozvučením i po něm stejná.

Měření dob průtoků je přesné, s relativní chybou do 1% (viz tabulky č. 7 a 8). Intervaly dané chybovými úsečkami se nepřekrývají a závislosti jsou tedy průkaznější než v případě závislostí v grafech č. 4 a 7.

Zajímavý výsledek poskytlo měření stupně hemolýzy v závislosti na koncentraci přidaných látek, jak je vidět v grafech č. 10 a 12. Se zvyšující se koncentrací dochází k očekávanému poklesu stupně hemolýzy. Důvodem je pravděpodobně menší schopnost ultrazvukového pole „kmitat“ s erytrocyty vlivem vyšší viskozity. Ta bude

pravděpodobně mít i určitý „ochranný“ efekt podobně jako krevní plasma. Práce Abramowicze a kol. (2003) uvádí i vliv vyšší viskozity na snížení tvorby kavitačních bublin. Při určité koncentraci dochází k prudkému snížení množství zhemolyzovaných erytrocytů, resp. k snížení stupně hemolýzy. S tímto snížením stupně hemolýzy koresponduje i mírné zvýšení viskozity, které je způsobeno větším množstvím nezhemolyzovaných erytrocytů (viz grafy č. 11 a 13). Po prudkém poklesu stupně hemolýzy následuje oblast, která je charakteristická zanedbatelnou, téměř konstantní, hemolýzou, i přes další zvyšování koncentrace. Ultrazvukové pole už v této oblasti není schopné zlyzovat erytrocyty i při expozici delší než 10 minut, což bylo zjištěno v nezávislém pokusu.

6.3.6. Povrchové napětí

Měření povrchového napětí bylo provedeno ve dvou téměř identických sériích lišících se od sebe nepatrně délkou ozvučování a provedením druhé série o dva dny později. Z tabulky č. 9 je vidět, že relativní chyby povrchového napětí se pohybují kolem 1%, což by ukazovalo na dobrou přesnost měření. Nicméně, jak je patrné z grafu č. 15, intervaly dané chybovými úsečkami se překrývají a rozdíly povrchových napětí pro různé délky ozvučení jsou minimální (v rámci statistické chyby). Graf č. 14 potvrzuje teorii a ukazuje nárůst stupně hemolýzy v závislosti na délce ozvučení.

Výsledkem experimentů je prakticky nezměněné povrchové napětí vlivem ultrazvukového pole. Důvody mohou být následující:

1. Účinek uvolněných bílkovin z erytrocytů na povrchové napětí je slabý
2. Zvolená metoda je dynamická, během tvorby kapky se nestihá vytvořit rovnováha mezi povrchově aktivními bílkoviny v roztoku a v mezifázi. V budoucnu bude možno odlišit pomocí jiné (např. odtrhovací) metody měření povrchového napětí.

7. Závěr

Cílem této práce bylo zjistit, jaký vliv má disperzní prostředí na hemolýzu vyvolanou ultrazvukem. Za veličiny charakterizující disperzní prostředí byly vybrány dvě. Viskozita a povrchové napětí.

V první sérii měření byla zkoumána změna viskozity v průběhu hemolýzy. Výsledky ukazují, že v průběhu tohoto děje dochází jen k velmi malému poklesu viskozity a rozdíly jsou těsně nad hranicí statistické chyby. Měření viskozity tak není vhodným parametrem pro posouzení ultrazvukové hemolýzy.

V druhé sérii se studie zaměřila na posouzení vlivu vyšší viskozity, vlivem přidaných látek, na hemolýzu erytrocytů. Bylo zde dosaženo zajímavých výsledků. Nárůst viskozity se projevil, při určité koncentraci, prudkým poklesem až zastavením hemolýzy, což má velký praktický dopad. Vzhledem, k tomu, že pokusy s vyšší viskozitou měly simulovat vlastnosti plné krve, byl potvrzen fakt, že při určité viskozitě krve se neprojeví vliv ultrazvuku na erytrocyty. To je další z důkazů relativní odolnosti krve vůči působení ultrazvuku v medicíně.

V poslední sérii pokusů byl hledán vztah mezi velikostí ultrazvukové hemolýzy a povrchovým napětím. Byly změřeny jen velmi nepatrné změny v povrchovém napětí, které jsou v rámci statistické chyby. Závěrem lze říct, že povrchové napětí se při hemolýze suspenze erytrocytů téměř nemění.

Tato práce přinesla mnoho zajímavých podnětů pro další výzkum. Především výsledky měření viskozity s přidavkem látek jsou cenné. Pro klinickou praxi nemají měření až tak velkou vypovídací hodnotu, neboť pokusy probíhaly s 10% suspenzí erytrocytů a ne s plnou krví.

8. Použitá literatura

- Abramowicz, J.S., Miller, M.W., Battaglia, L.F., Mazza, S.:** Comparative hemolytic effectiveness of 1MHz ultrasound on human and rabbit blood *in vitro*, University of Rochester, Rochester, NY, USA, 2003
- Brdička, R., Dvořák, J.:** Základy fyzikální chemie, Academia, Praha, 1977
- Cheeke J.D.N.:** Fundamentals and applications of ultrasonic waves. CRC Press LLC, 2002
- Čech, E. a spol.:** Ultrazvuk v lékařské diagnostice a terapii, Avicenum, 1982
- Deng, Ch.X., Sielinf, F., Pan, H., Cui, J.:** Ultrasound-induced cell membrane porosity, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA, 2003
- Forýtková, L.:** Vliv ultrazvuku na syntézu DNA nádorových buněk, kandidátská disertační práce, Brno, 1992
- Gorčík, L.:** Vliv osmotického tlaku na hemolýzu suspenze erytrocytů vyvolanou ultrazvukem, Bakalářská práce, Brno, 2004
- Hrazdira I.:** Biofyzikální analýza interakcí ultrazvuku s buněčnými systémy. Disertační práce, Brno, 1979
- Hrazdira, I., Mornstein, V.:** Lékařská biofyzika a přístrojová technika, Neptun, 2001
- Kawai, N., Iino, M.:** Molecular damage to membrane proteins induced by ultrasound, Department of Precision Engineering, Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, Chiba, Japan, 2003
- Kratochvíl, B.:** Chemická dozimetrie kavitačního ultrazvuku a ionizujícího záření, doktorská disertační práce, Brno, 2002
- Miller, M.V., Battaglia, L.F., Mazza, S.:** Biological and environmental factors affecting ultrasound -induced hemolysis *in vitro*: Medium tonicity, University of Rochester, Rochester, NY, USA, 2002
- Miller, M.V., Battaglia, L.F.:** The relevance of cell size on ultrasound-induced hemolysis in mouse and human blood *in vitro*, University of Rochester, Rochester, NY, USA, 2003
- Mornstein a kol.,** Biofyzikální praktikum, Brno, 1996
- Mornstein, V., Davadorzh, C., Franc, P., Šponer, J.:** Effect of low-frequency ultrasound cavitation on concentrated solutions of selected organic compounds, Brno, 1992

- Mornstein, V.:** Ultrazvuková kavitace: využití, problémy a rizika v biologii a lékařství, Habilitační práce, Brno, 1994
- Obraz, J.:** Ultrazvuk v měřící technice. SNTL-Nakladatelství technické literatury Praha, 1984
- Pěgrím, R., Valachovič, A.:** Somatologie, Státní zdravotnické nakl., Praha, 1969
- Pospíšilová, J., Hrazdira, I., Pospíšil, M.:** Wasserdurchlässigkeitsänderungen in vitro, Rehabilitation 16, 1963
- Škorpíková, J.:** Ultrazvukem indukované změny buněčných struktur, Habilitační práce, Brno, 2000
- Vaškovicová, N.:** Morfologické změny membrán po účinku ultrazvuku, Diplomová práce, Brno, 2005

9. Příloha

Vysvětlivky k tabulkám:

Tab. č. 2 a 3:

t...délka ozvučení (s)

n...počet erytrocytů ve 20 čtvercích Bürkerovy komůrky

A...absorbance

A - A_o...průměrná absorbance zmenšená o absorbanci „slepého“ vzorku

N.10⁶ ...počet erytrocytů v 1mm³ plné krve

Tab. č. 4 a 5:

t_{ozv}...délka ozvučení (s)

t_{průtok}...doba průtoku kapaliny viskozimetrem (s)

v.10⁻⁷...viskozita (Nsmkg⁻¹)

A...absorbance

N.10⁶ ...počet erytrocytů v 1mm³ plné krve

Tab. č. 7 a 8:

C_{IOP} a C_{TEL}...koncentrace látek zvyšujících viskozitu

t_{1průtok}...doba průtoku viskozimetrem před ozvučením (s)

t_{2průtok}...doba průtoku viskozimetrem po ozvučení (s)

A...absorbance

A - A_o...průměrná absorbance zmenšená o absorbanci „slepého“ vzorku

Tab. č. 9:

t_{ozv}...délka ozvučení (s)

m_{75kapek}...hmotnost 75 kapek odkapaných ze stalagmometru (g)

σ.10⁻²...povrchové napětí (N.m⁻¹)

A...absorbance

N.10⁶ ...počet erytrocytů v 1mm³ plné krve