

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta strojního inženýrství

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2020

Ondřej Piňos



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ENERGETICKÝ ÚSTAV

ENERGY INSTITUTE

TRANSPORT LÉČIV POMOCÍ MIKROBUBLIN

DRUG TRANSPORT USING MICROBUBBLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ondřej Piňos

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Pavel Rudolf, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Ústav: Energetický ústav
Student: **Ondřej Piňos**
Studijní program: Strojírenství
Studijní obor: Základy strojírenství
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Rudolf, Ph.D.**
Akademický rok: 2019/20

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

Transport léčiv pomocí mikrobublin

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Aktuálně zkoumaným tématem je tzv. cílená doprava léčiv až k místu, kde by měla působit (např. nádor). Pozitivním efektem by kromě vyšší účinnosti léčby mělo být omezení vedlejších účinků. Jednou z možností je doprava léčiv za pomoci mikrobublin a jejich aktivace v cíli s využitím kavitace vyvolané ultrazvukovým generátorem.

Cíle bakalářské práce:

Cílem bakalářské práce bude řešit dané problematiky doplněná jednoduchými výpočty týkajícími se chování bubliny v proměnném tlakovém poli a podmínkami kolapsu bublin.

Seznam doporučené literatury:

WANG, Tzu-Yin, Katheryne E. WILSON, Steven MACHTALER a Jürgen K. WILLMANN. Ultrasound and Microbubble Guided Drug Delivery: Mechanistic Understanding and Clinical Implications. Curr Pharm Biotechnol. 2014, 8(14).

BHATTACHARYA, Sankha, Bhupendra G PRAJAPATI a Arindam A PAUL. A Conceptual Review on Micro Bubbles. Biomed J Sci & Tech Res. 2017, 2(1), 1-7.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2019/20

V Brně, dne

L. S.

doc. Ing. Jiří Pospíšil, Ph.D.
ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
děkan fakulty

Abstrakt

Tato bakalářská práce je rešerší současného stavu poznání v oblasti lékařského využití mikrobublin se zaměřením na ultrazvukem iniciovanou kavitaci mikrobublin naplněných léčivou látkou. Zmíněny budou technologie výroby mikrobublin, chemická složení, efekt kavitovaných mikrobublin na tkáň a popis mechanismů, které při aplikaci tohoto terapeutického prostředku vystupují. Druhá část bude zaměřena na matematický aparát, který popisuje chování mikrobublin v nekonečném prostředí a to pomocí Rayleigh-Plesetovy rovnice a rovnice popisující chování mikrobubliny s membránou. Zároveň bude v této části prezentován MATLAB skript pro výpočet základních veličin mikrobubliny zatížené akustickou vlnou.

Summary

This bachelor thesis deals with the research in field of medical usage of microbubbles, specially focused on ultrasound initiated cavitation of microbubbles filled with drugs. Thesis includes technology of manufacturing, chemical composition, effects of cavitated microbubbles on tissue and description of mechanism that occurs during the application of ultrasound triggered microbubbles. Second part deals with mathematical description of microbubble under acoustic pressure using the Rayleigh-Plesset equation and equation for microbubble with membrane are presented. The MATLAB script for calculation of physical parameters describing state of microbubble is also explained.

Klíčová slova

mikrobubliny, transport, léčiva, kavitace

Keywords

microbubbles, transportation, drugs, cavitation

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma "Transport léčiv pomocí mikrobublin" vypracoval samostatně a s použitím uvedené literatury a pramenů.

Ondřej Piňos

Poděkování patří panu doc. Ing. Pavlu Rudolfovi, Ph.D. za odborné vedení této práce, rady a připomínky jak k obsahové tak formální části. Dále děkuji své rodině za touhu po znalostech, kterou mi vstúpili a také Sáře, která přežila všechny moje tvůrčí stavy.

Ondřej Piňos

Obsah

1	Úvod	3
2	Analýza problému a cíl práce	5
3	Současný stav poznání	7
3.1	Používané technologie výroby buněk	7
3.2	Materiály pro výrobu buněk[1]	8
3.2.1	Proteinové štěny[2]	9
3.2.2	Lipidové stěny[2]	9
3.2.3	Polymerové stěny[3]	9
3.2.4	Ligandy[4],[5],[6]	10
3.2.5	Plnicí plyny[7][5]	11
3.3	Interakce buněk s mikrobulinami	12
3.4	Tepelný efekt[8][9]	12
3.5	Netepelné efekty	12
3.5.1	Kavitace[10],[11]	13
	Kavitace kolapsová[9][12]	13
	Kavitace rezonanční[12]	13
3.5.2	Proudění vyvolané zvukem[13][14]	14
3.6	Výzkum	15
4	Výpočty chování bublin v tlakovém poli	17
4.1	Okrajové podmínky[15]	17
4.2	Podmínky kolapsu mikrobuliny[16][17]	19
4.3	Rayleigh–Plessetova rovnice[10][15]	20
4.3.1	Resonanční frekvence[18]	21
4.4	Rovnice pro mikrobulinu s membránou[10][15]	22
4.4.1	Resonanční frekvence pro mikrobulinu s membránou	23
4.5	Veličiny popisující chování mikrobulin	23
4.5.1	Objemový modul[19]	23
4.5.2	Koeficient tření[19]	23
4.5.3	Echogenita[19]	24
4.5.4	Mechanický index[11][20]	25
4.5.5	Termický index[20][21]	25
4.6	Implementace do prostředí MATLABu	26
4.6.1	Vstupní hodnoty pro výpočty v MATLABu	27
4.6.2	Odchytky MATLABovského kódu	28
4.6.3	Výsledky MATLABu	28

5 Závěr	31
Literatura	33
Seznam symbolů a jednotek	37

1. Úvod

První použití mikrobublin v lékařském prostředí datujeme do roku 1968. Mikrobubliny jako kontrastní látky zvyšují kvalitu vyšetření ultrazvukem. Užívají se při vyšetřeních průtoku krve primárně v srdci, a také v dalších silně prokrvených orgánech, méně často také v perifériích. Problém u tohoto způsobu vyšetření je na snadě. Je to obranyschopnost těla, která působí na mikrobubliny dvěma způsoby. A to jak pomocí imunitního systému, který část mikrobublin rozloží, tak i játry a slezinou, které mikrobubliny zadržují a nepustí dále do krevního řečiště. Navíc část mikrobublin jejichž poloměr je příliš velký neprojde skrze plicní sklípky.

Do popředí zájmu vědců se nyní dostává využití mikrobublin pro dopravu léčiv. Léčivo může být připojeno na povrch, vpraveno do membrány, popřípadě uzavřeno v mikrobublině. Mikrobubliny mohou být na povrchu osazeny ligandy, které inklinují k určitému typu buněk, čímž se zvýší koncentrace mikrobublin v místě, kde bude mít léčivo po uvolnění z mikrobublin největší účinek. Jakmile mikrobubliny dostatečně saturují problematické tkáně přichází čas pro sonoporaci. Pro tento účel se používá ultrazvuk s frekvencí v řádech jednotek MHz.

Mimo působení uvolněného léčiva způsobuje sonoporace mikrobubliny po velmi krátký čas extrémní fyzikální podmínky, které mají významný vliv na okolní buňky. Buňky jsou také vystaveny citelnému zásahu samotné postupující zvukové vlny. Kombinace těchto faktorů způsobuje nesnadné určení, které mechanismy zodpovídají za které procesy při léčbě. Složitě je také určení, které procesy jsou kruciólní pro funkční léčbu, a které jsou marginální, popřípadě přímo nevhodné. V těchto oblastech probíhá výzkum, avšak konsenzus na významnosti daných mechanismů zatím nenastal.

2. Analýza problému a cíl práce

Koncept mikrobublin a jejich použití v medicíně je znám už od 70. let [22]. V oblasti diagnostické jsou používány jako prostředek pro dosažení vyššího kontrastu při ultrazvukových vyšetřeních. Pro svou vysokou zvukovou odrazivost vzhledem k měkkým tkáním a tělesným tekutinám se používají pro měření průtoku krve orgány, nejčastěji srdcem a játry.

Méně prozkoumanou zůstává oblast terapeutická, v ní jsou mikrobubliny zkoumány pro více potenciálních využití [9]. Zásadním tématem pro tuto práci je možnost doručení léčiva, které je ukryté uvnitř mikrobubliny, na místo určení. Následně proběhne vypuštění léčiva v požadovaném místě pomocí zaměřeného ultrazvuku, který protrhne obal mikrobubliny. To zajistí maximální účinek na postiženém místě a minimální zatížení zbytku organismu. Zvláště užitečná je schopnost mikrobublin projít hematoencefalickou bariérou. Dále je také studováno využití mikrobublin jako zesilovačů účinku rehabilitace HIFU (High Intensity Focused Ultrasound) tj. vysoce intenzivního cíleného ultrazvuku.

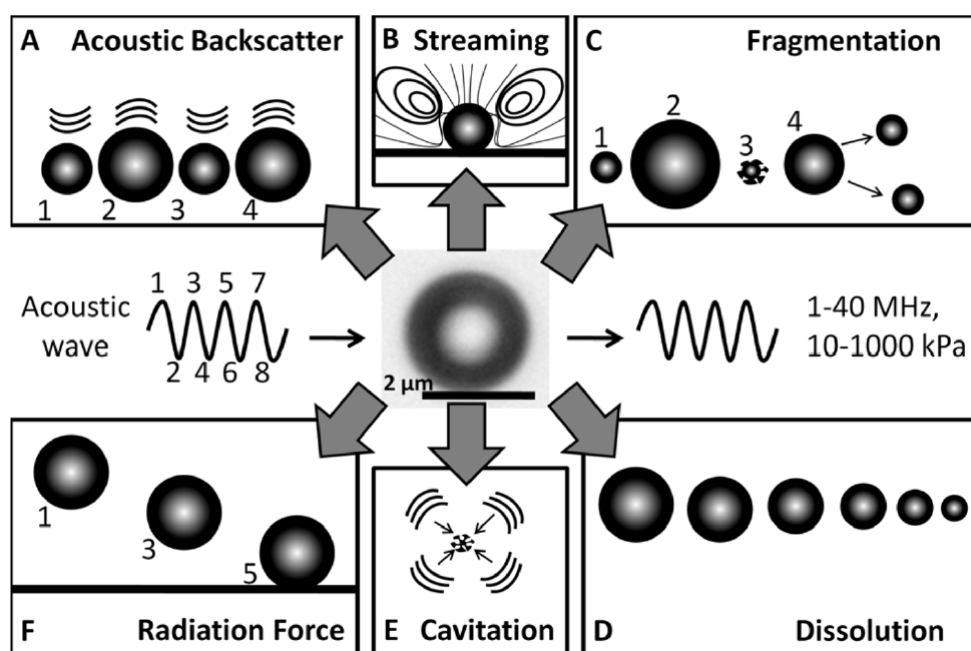
Mikrobubliny nabízejí inovativní způsob dopravy léčiv přímo do mozku. Mozek je u obratlovců, tudíž i u lidí, chráněn hematoencefalickou bariérou. Bariéra zabraňuje průchodu látek rozpustných ve vodě, čímž znesnadňuje doručení některých léčiv přímo do mozku. Zaobalení léčiva do mikrobubliny však tento problém řeší, svrchní vrstva mikrobubliny je z chemického hlediska pro bariéru netečná a tudíž ji bariéra nezachytí a umožní mikrobublině doručit léčivo do cílové oblasti mozku[23].

Z pohledu terapeutického užití mikrobublin jsou důležité mechanismy, kterými mikrobubliny v akustickém poli ovlivňují své okolí. V této oblasti jsou 3 studované mechanismy. Prvním z nich je mikroproudění (eng. microstreaming). V blízkosti mikrobubliny zatížené akustickým tlakem, jejíž poloměr osciluje, vzniká vlivem změn tlaku v okolní kapalině proudění, které působí na blízké tkáně smykovým napětím. Jak významný je tento efekt mikrobublin pro léčbu je diskutované téma[24].

Druhým jevem, který je významný pro lékařské použití mikrobublin, jsou kavitáční kolapsy. Důležitým průvodním jevem kolapsu je microjet. Tyto jevy není snadné zkoumat vzhledem k extrémně krátké době existence. Při těchto jevech je stěna mikrobubliny vystavena akustickému tlaku ultrazvuku a osciluje. Mikrobublina vlivem příliš velké amplitudy oscilace ztratí integritu a kolabuje. Během kolapsu mikrobubliny vytryskne proud kapalina vysokou rychlostí proti stěně mikrobubliny. Dopadem tohoto proudu vznikají extrémní teploty a tlaky které mají vliv na okolní buňky[25].

Posledním efektem, jenž nelze opomenout, je samotný vliv ultrazvuku, použitého při sonoporaci mikrobublin nesoucích léčivo. Tento ultrazvuk přenáší poměrně velké

množství energie, neboť je nutné dosáhnout značného akustického tlaku, který způsobí kolaps kavitace. Tato energie ultrazvuku, který má frekvenci v řádech MHz, se vstřebává v poměrně tenké vrstvě, kterou ohřívá. Tento efekt je podstatný pro urychlení chemických procesů, což je při vstřebávání léčiva žádoucí. Avšak při použití HIFU se mohou objevit vedlejší efekty, jako například popáleniny kůže, či tvorba metastázi při léčbě rakoviny. Samozřejmě není žádoucí dosáhnout teploty, která by rozkládala bílkoviny a způsobovala buňčnou smrt zdravých buněk mimo místo zacílení[9].



Obrázek 2.1: Schématický popis vlivu mikrobublin na okolí, zmínili jsme B), E), F). A) je odraz ultrazvuku od mikrobubliny. C) Rozpad mikrobublin na menší částice. D) Rozpuštění mikrobublin v prostředí. [1]

V předchozích odstavcích byla zmiňována výhoda zacílení léčby na postiženou oblast těla. Zacílení léčby probíhá buď pasivně nebo aktivně. Pasivním zacílením rozumíme, že mikrobubliny volně proudí v krvi a jsou průběžně sonoporovány pomocí ultrazvuku na místě určení. Aktivní zacílení probíhá za pomoci ligandů na povrchu mikrobubliny, které se vážou pouze na určitý typ buněk. Výhodou je ještě nižší zatížení organismu vlivem menšího počtu mikrobublin rozpuštěných v krvi mimo místo účinku. Účinnější je také působení fyzikálních mechanismů, které byly zmíněny výše. Důvodem je vazba mezi mikrobublinou a tkání[4].

Poslední oblastí, kterou se tato práce zabývá je matematický popis mikrobublin. Zásadní je v této oblasti práce lorda Rayleigha, který představil v roce 1917 rovnici popisující chování bubliny za poměrně omezených podmínek. Tuto rovnici použijeme pro výpočtovou část práce. Rovnice je nejčastěji nazývána Rayleigh-Plesetovou rovnicí. Představíme si však i modifikaci Rayleigh-Plesetovy rovnice, a to model Xin-Ferrara. Ten přesněji popisuje reálné chování mikrobubliny, přičemž přidávají proměnné, jež byly v původní rovnici zanedbány. Dále zmíníme hraniční stavy a podmínky jak pro tyto rovnice tak i pro pozorované děje[10].

3. Současný stav poznání

3.1 Používané technologie výroby buněk

Základní požadavky na mikrobubliny pro lékařské využití jsou:

- Možnost podání injencí

Mikrobubliny jsou vpraveny do krevního řečiště injekcí. Proto je tato vlastnost nutností.

- Zobrazitelnost ultrazvukem

Mikrobubliny musí mít rozdílnou echogenitu než okolní prostředí.

- Biokompatibilita

Mikrobubliny nesmí vyvolat reakci imunity, která by je rozložila a navíc by zatížila organismus nemocného.

- Vhodný poloměr

Zásadně ovlivňuje rezonanční frekvenci a musí být dostatečně nízký, aby mikrobubliny prošly plicními sklípky.

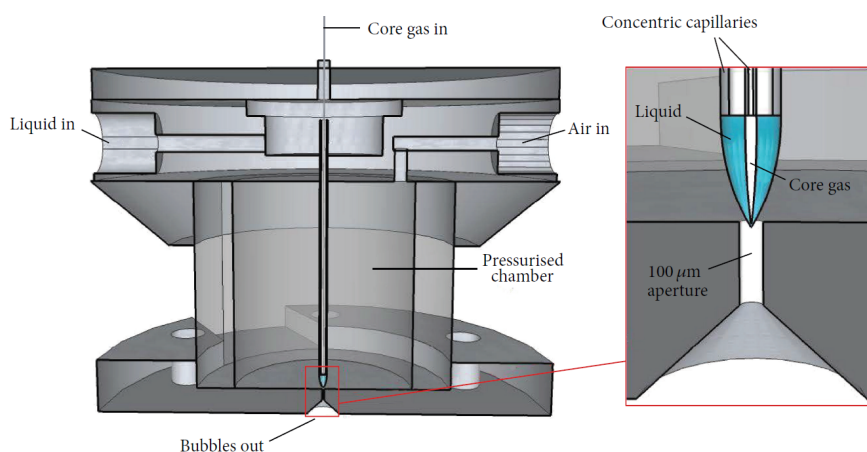
- Povrch vhodný pro uchycení ligandů

Při použití cílené léčby je zásadní, aby byl povrch mikrobubliny vhodný pro přichycení ligandů inklinujících k daným buňkám.

Vyrobené bubliny musí všechny tyto parametry splňovat, proto je jejich výroba složitý proces. V oblasti stále probíhá výzkum a to jak v hledání nových mechanismů výroby tak i ve vylepšování stávajících postupů. Metody membránové emulsifikace, mechanické agitace laserem nebo ultrazvukem indukované kavitace jsou schopné vytvářet velmi malé mikrobubliny avšak se širokým rozdělením poloměrů. Z toho důvodu nejsou výše zmíněné metody favorizované pro komerční využití.

V současnosti nejkvalitnější technologií pro výrobu mikrobublin jsou metody založené na mikrofluidice. Tyto metody umožňují kontrolovat poloměr, tloušťku membrány i produkci. Umožňují také přímou kapsulaci léčiva do mikrobubliny. Numerické výpočty a experimenty potvrdily tvorbu mikrobublin s malým poloměrem při vstřikování souběžného, popřípadě křížného proudu plynu do tekuté fáze. Regulací proudů je možné měnit poloměr mikrobublin, dále má vliv také velikost výstupního otvoru. Při menším poloměru otvoru vznikají menší bubliny, což však nese negativní následky, častější

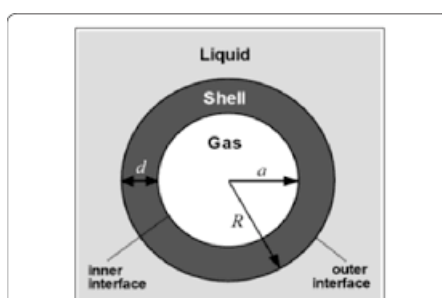
zanesení otvoru a také požadavek na větší výstupní tlak. Problémem výroby jsou nestability v proudech. Pro ideální kontrolu nad ostřicí částí proudu, musí mít trubice poměr délky:šířky roven 30. V kombinaci s hydrofobním povrchem generuje kanál velký tlakový gradient tekuté fáze v zužující se oblasti. Zde vzniká velmi jemný proud tekuté fáze, který zaobaluje bublinu. Takto jsou vytvořeny monodisperzní bubliny s indexem polydisperzity menším než 5 % [26].



Obrázek 3.1: Schéma přístroje pro výrobu mikrobublin, který tvoří souosé kapiláry. Vnější kapilára vede látku pro tvorbu povrchu mikrobubliny, vnitřní vede plnicí plyn.

3.2 Materiály pro výrobu buněk[1]

Stěna mikrobubliny obaluje plynnou fázi uvnitř, udílí mechanické vlastnosti mikrobublině a také hraje důležitou roli v difuzi plynů mimo mikrobublinu. Stěna má také zásadní význam pro zapouzdření molekuly léčiva, také se na ni vážou ligandy používané pro zacílení léčby k daným tkáním. Ovlivňuje pružnost a stlačitelnost mikrobubliny. Větší elasticita vede k pohlcení většího množství energie před porací. To vede k prodloužení doby, po kterou vydrží mikrobublina v těle. Podobně působí na durabilitu při zatížení.



Obrázek 3.2: Zjednodušené schéma mikrobubliny

3.2.1 Proteinové štěny[2]

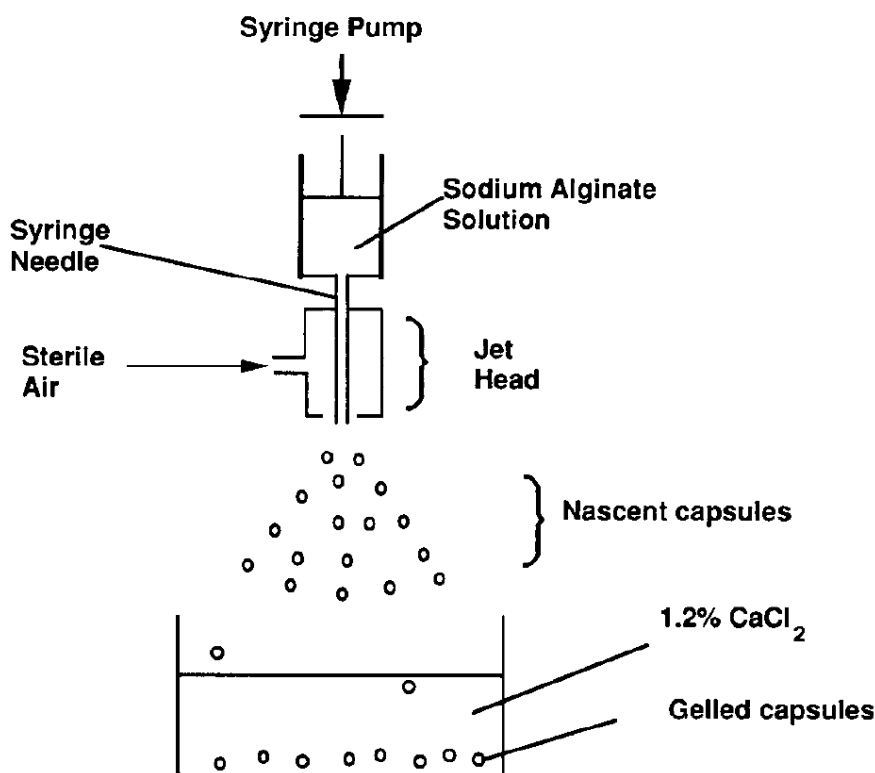
Proteiny byly prvními látkami využitými pro výrobu mikrobublin. Avšak v počátcích vývoje výroba proteinových mikrobublin nezajistila dostatečně malý poloměr. Neumožnily tedy dlouhodobější pozorování, neboť velmi rychle po injektáži byly zachyceny ve tkáni plic, popřípadě jinak znehodnoceny. I tyto výsledky však stačily k tomu, aby se rozjel výzkum s cílem vyrobit mikrobubliny, které dokáží projít plicemi a zajistit kontrastní zobrazení na delší dobu. První komerčně použité mikrobubliny obsahovaly $7 \cdot 10^8$ mikrobublin na mililitr s poloměrem od 1 do 15 μm . Zmražené mikrobubliny tohoto typu jsou schopny vydržet funkční až dva roky. Z chemického hlediska je důležité zmínit disulfidové vazby mezi cysteinovými rezidui a také kovalentní síťování. Těmto vazbám přičítáme relativní tuhost stěny pozorované v průběhu ultrazvukové sonifikace. Na této bázi je založen komerční přípravek Optison.

3.2.2 Lipidové stěny[2]

Lipidové mikrobubliny jsou nazývány také bio-inspirované mikrobubliny, jak název napovídá, jejich konstrukce je podobná přírodě. Lipidové stěny jsou tvořeny acylovými lipidy a glykolovými bílkovinami, proto mají dobrou fyzikální stálost. Při výrobě mikrobublin z fosfolipidů se fosfolipidy spontánně spojují do organizovaných monopovlaků na rozhraní plyn-tekutina. Ke vzduchu se nasměrují arylové řetězce a hydrofilické hlavy budou směřovat do tekutiny. Tudíž se nově formované mikrobubliny zacyklí do fosfolipidové monovrstvy. Saturace fosfolipidů obecně zvyšuje stabilitu. Navíc v monopovlaku jsou kohezivní vazby a Van der Waalsovy síly mezi acylovými řetězci, které stabilizují mikrobublinu. Zmíněné vazby hrají hlavní roli, neboť zde nejsou zastoupeny disulfanové vazby, pročež mikrobublina není tak tuhá jako proteinové mikrobubliny. Z výše uvedených důvodů jsou lipidové povlaky snadněji sonoporovány, což je favorizovaná vlastnost, další výhodou pro lipidy je lehkost kapsulace léčiva. Na této bázi jsou vyrobeny například přípravky Sonazoid, Sonovue a DEFINITY.

3.2.3 Polymerové stěny[3]

V roce 1990 vyvinul Wheatley a kolektiv metodu výroby mikrobublin pomocí ionotronicke gelace (eng. ionotronic gelation). Zde je mikrobublina formována při sprejování koncentrovaných proudů plynů do alginátového roztoku. Na rozhraní plyn-tekutina dochází k přidání vápníku, který zpevňuje mikrobubliny. Velikost mikrobublin je při této výrobní metodě určena rychlostí proudu plynu kolem stříkací jehly. Přičemž poloměry byly v rozmezí 15 až 20 μm , což je příliš mnoho pro nitrožilní použití. Následovalo vylepšení použitím dvojité esterovaného polymeru s ethylenovou jednotkou, které však přineslo i negativní výstupy. Mikrobubliny vytvořené z těchto materiálů byly podlouhlé a pomačkané. Metodou řešící tento problém je inkoustové trysky (eng. ink jet). Polymerový roztok je tlačěn skrze piezoelektricky řízenou inkoustovou trysku s průměrem 20 až 50 μm . Tlak generovaný piezokrystalem vytváří pulzy v roztoku, kdy každý pulz formuje kapičku na trysce. Po vysušení dostáváme mikrobubliny s malým rozptylem průměrů. Velikost bublin je u této metody závislá na frekvenci a délce pulzů.



Obrázek 3.3: Schéma ionotronické gelace

3.2.4 Ligandy[4],[5],[6]

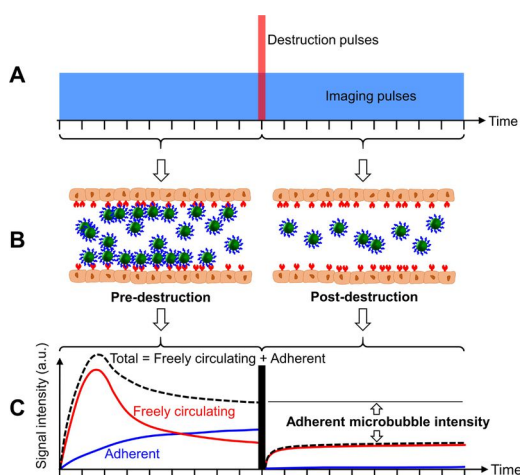
Doprava léčiv na místa určení pomocí mikrobublin se do popředí zájmu dostává na přelomu tisíciletí. Konvenční podání léčiv narušuje homeostázi celého organismu a působí i na zdravé buňky, při cílené léčbě je maximální koncentrace léčiva v místě postižení, čímž je minimalizován nežádoucí účinek na zdravou tkáň.

Pro pochopení cílení je zásadní představit si povrch buňky. Na povrchu leží chemické receptory, ty zprostředkovávají komunikaci mezi nitrobuněčným a mimobuněčným prostředím pomocí chemických reakcí na vnější chemické podněty. Konjugací receptoru na povrchu buňky a ligandu na povrchu mikrobubliny se vytváří vazba mezi těmito útvary. Připojení ligandů na povrch mikrobubliny však přináší i své nevýhody. Větší molekuly ligandu zviditelňují mikrobublinu pro imunitní systém, čímž snižují dobu jejich přežití v krvi. Dále může docházet k vazbám na proteiny v konvenčních léčivech, což může vést ke snížení schopnosti zacílení léčby, či dokonce k hypersenzitivitě organismu.

Přichycení mikrobubliny nastává, když síla přilnavosti od ligandů je větší než síla smykového napětí od proudu krve. Mikrobublina pohybuje se v krevním řečišti se přichytí na receptor, který leží na povrch buňky pouze pokud je kinetika této vazby příznivá. Úspěšnost propojení a jeho pevnost je závislá na počtu párů ligand - receptor a síle jednotlivé vazby. Zkoumání síly propojení a odporu proti smykovému působení proudu probíhá pomocí jednoduché videomikroskopie na vzorcích in vitro. Zvýšení hustoty ligandů na povrchu mikrobubliny mělo očekávaný efekt zvýšení přilnavosti. Mikrobubliny, které jsou nyní v klinickém testování k propojení s fagocytovými buňkami mají na povrchu mezi 10 - 20 milióny molekul ligandů. Při každém průchodu je

část mikrobublin zachycena na cílové tkáni, tím je docíleno ideálního kontrastu.

Spojení ligandu a receptoru musí proběhnout velmi rychle, krev se v žilách pohybuje rychle (ve velkých žilách až rychlostí 1 ms^{-1}), přičemž rychlostní profil je zploštělá parabola s maximem v ose žil. Experimenty ukázaly maximální vhodnou sílu proudu, při které mikrobubliny tvořily vazby, jako $10 \mu\text{N}/\text{cm}^2$. Při vyšších rychlostech proudu je více mikrobublin v kontaktu s tkání, avšak počet přichycených klesá. Pokud byly ligandy přichyceny v klidovém stavu a až poté vystaveny smykovému napětí proudu, vydržely vazby kompaktní až do napětí $700 \mu\text{N}/\text{cm}^2$. Z tohoto lze vyvodit, že při vyšších rychlostech nemohou mikrobubliny navázat vazbu. Další experimenty ukázaly, že vhodnější pro vytvoření stabilního propojení je více slabších vazeb s rychlejším přichycením než-li naopak.



Obrázek 3.4: A) Schéma ultrazvuku vysílaného do tkáně, červený peak je destruktivní vlna určená pro sonoporaci mikrobublin. B) Zobrazení krevního řečiště: před sonoporací jsou mikrobubliny prostřednictvím ligandů přichyceny na buňky, přičemž část mikrobublin volně cirkuluje. Po sonoporaci jsou mikrobubliny přichycené na buňky zničeny, cirkulující bubliny zůstávají v krevním řečišti. C) Graf ukazuje rozložení množství bublin (čárkovaná) na volně cirkulujících (červená) a přichycených (modrá).

3.2.5 Plnicí plyny[7][5]

Stěna obaluje plynnou náplň, která má významný vliv na přežití bublin v těle. Používají se kombinace více plynů, které svými rozdílnými osmotickými tlaky zlepšují stabilitu mikrobubliny. Pokud je použita kombinace plynů, první plyn má nižší tlak parciální než plyn druhý. Nejčastěji je prvním plynem směs atmosférických plynů, popřípadě čistý dusík. Druhý plyn, nazývaný také osmotickým plynem, je plyn, který hůře prostupuje stěnou mikrobubliny a je také méně rozpustný v krvi než plyn první[27]. Z těchto důvodů jsou voleny plyny s vysokou molekulovou hmotností. Je zřejmé, že ani jeden z plynů nesmí být jedovatý. Volí se tedy plyny biologicky inertní. Jako ideální se proto jeví perfluorované plyny, které zvyšují stabilitu bubliny a splňují výše popsané podmínky.

3.3 Interakce buněk s mikrobublinami

Interakce mikrobublin s buňkou je zásadní pro její lékařské využití. V současnosti mikrobubliny nabízejí kromě možnosti zacílení léčby do určité oblasti také možnost porace buněk. Porace zajistí jednodušší proniknutí léčiva do buňky, čímž umožní efektivnější absorpci léčivé látky. Pro lékařské využití musí být mikrobubliny dodávány v extrémně malém intervalu poloměru $1 - 7 \mu m$ a vysoké hustotě mikrobublin $10^6/ml$.

3.4 Tepelný efekt[8][9]

Průchod ultrazvuku tkání je spojen s disipací energie podélné vlny do tkáně a to ve formě tepla. Ztráty se objevují v homogenní tkáni, avšak jsou ještě významnější na rozhraní tkání. Množství tepla přivedené do tkání je závislé především na parametrech ultrazvuku, typu tkáně, která ultrazvuk vstřebává a čase. Ultrazvuk je schopný zvýšit teplotu tkáně až do hloubky 5 cm. Růst teploty se pohybuje v mezích od 1 do 4 °C, dle účelu dané terapie (růst teplot nad tuto mez nebyl zkoumán neboť při těchto teplotách dochází k nekróze buněk). Dle očekávání nižší frekvence prohřívají tkáně do hlubších vrstev. Samozřejmě při použití nižších frekvencí rozdíl teplot není tak vysoký. Při vyšších frekvencích je většina energie pohlcena ve vrstvách blíže povrchu a ohřev je v těchto místech intenzivnější. Teplota tkání má vliv na rychlost chemických procesů v buňkách a jejich okolí. Vyšší teplota reakce urychluje. Tepelný efekt je při diagnostických použitích minimální, avšak při terapeutickém použití se intenzita zvukových vln pohybuje v řádech jednotek až desítek $W \cdot cm^{-2}$. Vedlejším efektem intenzivních ultrazvuků je vznik popálenin kůže. Při použití HIFU terapie proti tumorům byly popáleniny druhého stupně zaznamenány u všech pacientů, a u 3 % dokonce popáleniny 3. stupně.

3.5 Netepelné efekty

Netepelné efekty ultrazvuku mají významnější roli při léčbě měkkých tkání než efekty tepelné. Ultrazvuk jako podélné vlnění vytváří v prostředí tlakové vlny, které zhušťují a zředňují látku, kterou procházejí. Při tomto zhuštění dochází ke zvýšení tlaku látkového prostředí. Je vytvořen tlakový gradient, který ovlivňuje chování látky.

Vedlejší efekty vznikající netepelným vlivem zahrnují možnost vzniku metastáz při uvolnění rakovinných buněk z původního tělesa po vystavení tumoru účinkům UZ. Nežádoucí efekty také zahrnují roztržení žil a z něj plynoucí krvácení, krevní embólie.

3.5.1 Kavítace[10],[11]

Kavítace je jev, při kterém dochází ke vzniku a zániku kavítací bubliny. Bublina obsahuje plyn, kapalinu nebo obojí. Vznikají, pokud dojde k poklesu tlaku v kapalině pod úroveň tlaku sytých par. Kavítací bublinou mohou být i mikrobubliny, jež jsou do těla vpraveny injekcí. Kavítaci je připisováno značné množství biologických efektů, které byly pozorovány stejně tak *in vitro* jako *in vivo*. Kavítace se rozděluje na rezonanční a kolapsovou. Parametr jehož změna vede na přechod od rezonanční ke kolapsové kavítaci je amplituda akustického tlaku. Úroveň tlaku, kdy tento přechod nastává, se nazývá práh kolapsové kavítace. Pravděpodobnost kavítace také určuje mechanický index (MI), což je bezrozměrná veličina, která se vypočte jako podíl negativní amplitudy akustického tlaku v MPa a druhé odmocniny frekvence ultrazvuku v MHz. Mechanické účinky kavítace mohou mít za následek podstatné poškození buněk.

Kavítace kolapsová[9][12]

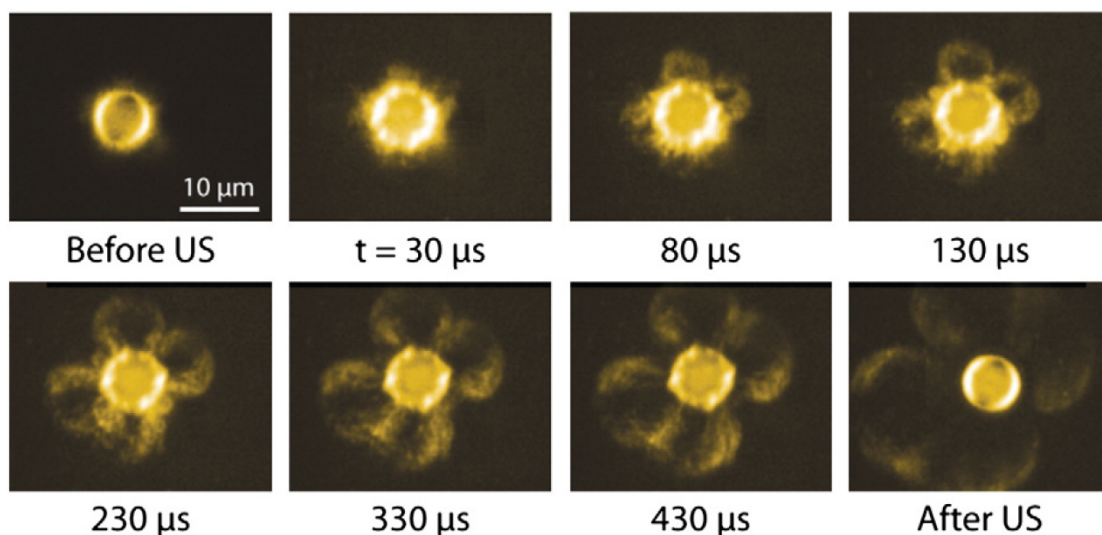
Vzniká, pokud je amplituda akustického tlaku ultrazvuku v mikrobublíně dostatečně velká a poloměr vzroste natolik, že mikrobublina zkolabuje. Kolaps proběhne v řádově jednotkách μs . Pokud je frekvence budicího ultrazvuku nižší nebo rovna rezonanční frekvenci, může nastat tzv. mikrojet (eng. microjet). Vnější slupka mikrobubliny, hnána tlakem okolní kapaliny, směřuje do svého středu, na povrchu bubliny vzniká trhlinka a výtrysk tekutiny do bubliny formuje mikrojet směřující na druhou stranu bubliny než iniciující trhlinka. Mikrojet má velkou kinetickou energii a při dopadu na protější stěnu přemění svou energii na tlak, což způsobí nárůst tlaku v řádech MPa a teploty až v tisících Kelvínů. Nastávají takové podmínky, při kterých se látka v místě dopadu mění na plazmu. Je však důležité nezapomenout, že tyto extrémní podmínky trvají pouze po extrémně krátký časový úsek.

Kavítace rezonanční[12]

Vzniká, pokud mikrobublina osciluje kolem rovnovážného stavu po mnoho cyklů zvukové vlny, což vede k emisi tepla do okolí. Dalším efektem je mikro Proudění (eng. microstreaming), které generuje smykové napětí působící na buňky v blízkém okolí mikrobublin. Mikro Proudění je významné pro terapeutické použití, kdy není mikrobublina naplněna léčivem, tudíž nedochází k vypuštění léčiva do těla. Avšak i při použití mikrobublin naplněných léčivem je tato kavítace použitelná jako preparace buněk pro přijetí léčiva. Fyzikální podmínky v okolí mikrobubliny poskytují buňkám mikromasáž, která zvyšuje permeabilitu buňečných stěn, čímž se zrychlí difúzní procesy mezi buňkami a okolím.

3.5.2 Proudění vyvolané zvukem[13][14]

V okolí oscilující bubliny se objevuje gradient tlaku. Tento gradient ovlivňuje tekutinu, která začíná proudit, tento jev se podle své velikosti nazývá mikroproudění. Vznikají primární a sekundární víry. Primární, s vyšší rychlostí proudění, budí sekundární, slabší, ale rozlehlejší víry. Už v 50. letech byl pozorován efekt proudění na živé buňky. Proudění nepříznivě působilo na buňky, přičemž bylo zajištěno, aby destrukce jejich neproběhla „násilně“, mechanismem kolapsové kavitace, ale pouze působením smykového napětí. Pozorování také proběhlo na umělých napodobeninách buňky. Tlak je v případě mikroproudění střídavý, což zásadně zvyšuje význam tohoto efektu. Buňky jsou více zasaženy tímto zatížením, než by byly zatíženy konstantním tlakem či podtlakem. Podtlak a přetlak se střídají v každém cyklu pulzace, která nastává v řádech milionů za sekundu. Tyto podmínky také zvyšují permeabilitu buněčné stěny.



Obrázek 3.5: Vysokorychlostní kamerou zaznamenané oscilace mikrobubliny. Mráčky v okolí mikrobubliny jsou fluorescenčně zvýrazněné mikroproudy.[18]

3.6 Výzkum

V současnosti jsou mikrobubliny používány mimo klinické testování pouze jako kontrastní látky. Doručování léčiv je pouze ve fázi klinických zkoušek. O zacílení léčby pomocí mikrobublin se zajímají především obory onkologie, kardiologie a diabetologie.

Zkoumány byly účinky při léčbě trombóz, při použití ligandů i bez. Výsledky ukázaly, že v kombinaci s vysokým mechanickým indexem, dochází k urychlení rozpuštění trombóz, čímž jsou sníženy následky pro pacienta. Navíc zatížení organismu léky na ředění krve bylo menší, tudíž vnitřní krvácení, které bývá konvenční léčbou indukováno, nebylo tak výrazné[28].

Léčba rakoviny je s rostoucím věkem dožití a vyšším výskytem v obyvatelstvu velkou výzvou. V rakovinných útvarech je vyšší tlak, který znesnadňuje přístup účinným cytostatickým látkou, navíc tyto látky jsou toxické pro organismus, tudíž intravenózní podání není ideální. Mikrobubliny zjednodušují léčbu mozkových nádorů, protože cytostatika ukrytá uvnitř bubliny dokáže projít hematoencefalickou bariérou a působit na nádor[23]. Ve studiích měli pacienti, kterým byla léčiva dopravována mikrobublinami, pomalejší růst nádoru a delší dobu dožití[28].

V oblasti diabetologie se téma mikrobublin skloňuje zejména ve vztahu ke genové terapii. Diabetes ničí beta buňky ve slinivce břišní. Mikrobubliny doručí gen, který napomáhá obnově funkce beta buněk přímo do slinivky, čímž sníží zatížení zbytku organismu a zvýší účinnost léčby. Ve studiích na krysách už bylo dosaženo regenerace slinivky, obnovení produkce inzulínu a tím kontroly hladiny glukózy v krvi hlodavců[29].

4. Výpočty chování bublin v tlakovém poli

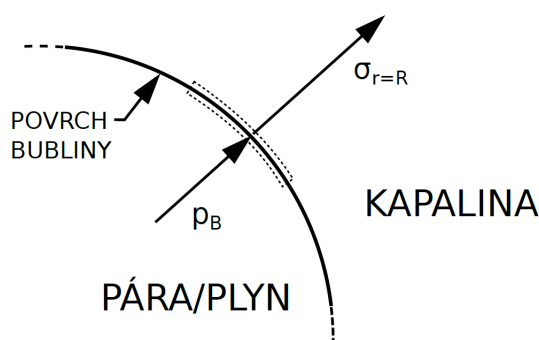
V této kapitole budou popsány a odvozeny rovnice nutné pro výpočet chování izolované mikrobubliny v akustickém tlakovém poli, implementace problému do prostředí MATLABu a jejich řešení.

4.1 Okrajové podmínky[15]

Při odvození zavádíme okrajové podmínky pro povrch bubliny. Přenos hmoty přes hranici mikrobubliny je zanedbán. Proto je rychlost kapaliny na rozhraní $u(r,t)$ rovna rychlosti rozhraní $\dot{R} = \frac{dR}{dt}$. V průběhu odvozování bereme v potaz malou, nekonečně tenkou vrstvu obsahující část rozhraní. Rovnováha sil působící na rozhraní mikrobubliny má tedy následující tvar:

$$\sigma_n(R,t) + p_B - \frac{2\sigma}{R} = 0 \quad (4.1)$$

Kde $\sigma_n(R,t)$ je normálové napětí na rozhraní, p_B tlak uvnitř bubliny, $\frac{2\sigma}{R}$ tlak od povrchového napětí, znaménko mínus značí směr do středu mikrobubliny.



Obrázek 4.1: Schéma rozhraní mikrobubliny[10].

Normálové napětí $\sigma_n(R,t)$ je dáno vztahem:

$$\sigma_n(R,t) = -p(R,t) + 2\mu_L \frac{\delta u}{\delta r} \Big|_{r=R} \quad (4.2)$$

Přičemž je $p(R,t)$ tlak na rozhraní bubliny, μ_L je dynamická viskozita okolní kapaliny.

Posledním členem této rovnice je $\frac{\delta u}{\delta r}|_{r=R}$, který představuje smykové napětí při derivaci dle r a položením $r = R$ dostáváme tento tvar:

$$\frac{\delta u}{\delta r}|_{r=R} = -\frac{2\dot{R}}{R} \quad (4.3)$$

Tudíž tlak uvnitř bubliny p_B je dán vztahem:

$$p_B = p_v + p_g(t) \quad (4.4)$$

Zde p_v je tlak par uvnitř bubliny, ke kterému se přidává $p_g(t)$, což je parciální tlak plynu uvnitř bubliny. Jehož hodnotu vzhledem k počátečnímu stavu v čase $t = 0$ lze zapsat tímto vztahem:

$$p_g(t) = p_{g0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\kappa} \quad (4.5)$$

Tento vztah nebude odvozen. Předpokladem pro tento vztah je adiabatický děj. Ve vzorci vystupuje Poissonova konstanta κ , definovaná jako poměr tepelných kapacit při konstantním tlaku a objemu $\kappa = \frac{c_p}{c_v}$. Z výše popsaných rovnic lze zapsat tlak na rozhraní mikrobubliny.

$$p(R,t) = p_v + p_{g0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\kappa} - \frac{2\sigma}{R} - 4\mu_L \frac{\dot{R}}{R} \quad (4.6)$$

Ve velké vzdálenosti od bubliny je kapalina v klidu $u(\infty,t) \rightarrow 0$ a tlak $p(\infty,t) = p_\infty(t)$ je nám známá hodnota. V čase 0 předpokládáme, že je bublina v rovnovážném stavu $R = R_0$ a rychlost stěny mikrobubliny je $\dot{R}(0) = 0$. Tlak ve vzdáleném okolí je tedy roven v čase 0 tomuto výrazu:

$$p_{\infty 0} = p_{g0} + p_v - \frac{2\sigma}{R} \quad (4.7)$$

Tento tlak $p_{\infty 0}$ známe. Vyjádříme tedy počáteční tlak plynu p_{g0} uvnitř mikrobubliny:

$$p_{g0} = p_{\infty 0} - p_v + \frac{2\sigma}{R} \quad (4.8)$$

Rovnice popsané výše popisují výchozí stav mikrobubliny. Budeme z nich vycházet při výpočtové části.

4.2 Podmínky kolapsu mikrobubliny[16][17]

Vložení výsledku rovnice 4.8 do 4.5 získáváme tlak v bublině mimo čas $t = 0$ za předpokladu izotermického děje:

$$p_g = \left(p_{\infty 0} - p_v + \frac{2\sigma}{R} \right) \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\kappa} \quad (4.9)$$

Nyní můžeme vyjádřit z rovnice 4.1, kterou upravíme na vyjádření normálového napětí, rovnic 4.4 a 4.10 ekvivalenci popisující změnu poloměru bubliny propojené se změnou tlaku v kapalině p_L :

$$p_L = \left(p_{\infty 0} - p_v + \frac{2\sigma}{R} \right) \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\kappa} + p_v - \frac{2\sigma}{R} \quad (4.10)$$

Při použití této rovnice jsou zanedbány setrvačné a viskózní účinky kapaliny v okolí oscilující mikrobubliny. Protože děje zde probíhají velmi rychle, lze je považovat za izotermické, proto pokládáme $\kappa = 1$ a definujeme si tento vztah:

$$G = \left(p_{\infty 0} - p_v + \frac{2\sigma}{R} \right) R_0^3 \quad (4.11)$$

Tím pádem můžeme 4.10 přepsat do tvaru:

$$p_L = p_v + \frac{G}{R^3} - \frac{2\sigma}{R} \quad (4.12)$$

Pokud tlak kapaliny klesne pod hodnotu p_{Lcrit} , neexistuje žádný poloměr, ve kterém nenastane kolaps mikrobubliny. Pro hodnoty vyšší než kritické, avšak nižší než tlak sytých par, má rovnice 4.12 právě dvě možná řešení. Pokud je poloměr mikrobubliny menší než Blakeův poloměr R_{crit} , je mikrobublina stabilní vzhledem k malým výchylkám z rovnovážného stavu. Pokud však poloměr překročí hodnotu R_{crit} , je bublina nestabilní i při malém vychýlení nad tuto hodnotu, tato hodnota je také aproximována dle [17].

$$R_{crit} = \left(\frac{3G}{2\sigma} \right)^{\frac{1}{2}} \quad R_{crit} \approx 2R \quad (4.13)$$

Tomuto poloměru odpovídá hodnota tlaku p_{Lcrit} :

$$p_{Lcrit} = p_v - \left(\frac{32\sigma^3}{27G} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.14)$$

Předchozí rovnice můžeme spojit do jedné a vyjádřit R_{crit} :

$$R_{crit} = \frac{4\sigma}{3(p_v - p_{Lcrit})} \quad (4.15)$$

Nyní máme propojeny hodnoty kritického tlaku v kapalině a kritického poloměru bubliny. Pokud je poloměr bubliny menší než R_{crit} , je stabilní, překročí-li však tento poloměr, nastane kolaps.

Pro získání Blakeova tlaku předpokládáme, že p_v , tlak par, je zanedbatelný. Vzhledem k tomu, že zde dominuje povrchové napětí, uvažujeme $p_{\infty 0} \ll \frac{2\sigma}{R_0}$. Při těchto aproximacích můžeme vyjádřit $G = 2\sigma R_0^2$ a Blakeův tlak definovat jako:

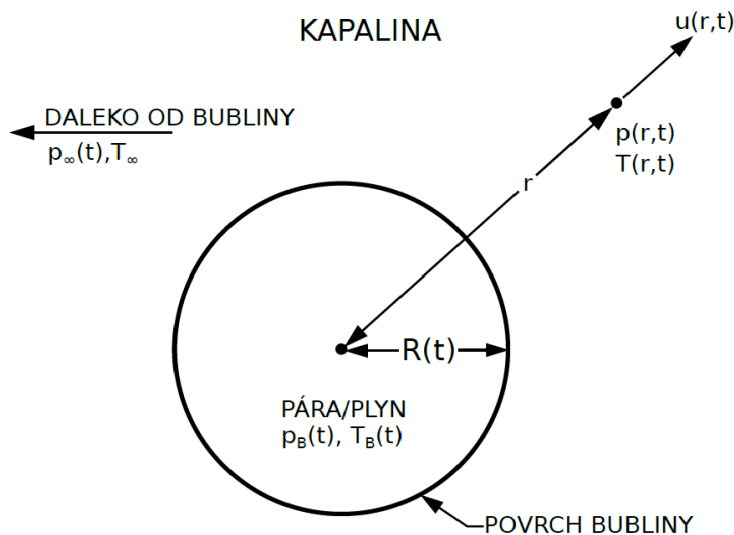
$$p_{Blake} \equiv p_{\infty 0} - p_{Lcrit} \approx p_{\infty 0} + 0.77 \frac{\sigma}{R_0} \quad (4.16)$$

Tato hodnota určuje záporné maximum tlaku, kterého můžeme dosáhnout aniž by bublina praskla. Změny tlaku v okolí mikrobublin jsou velmi rychlé, změny nejsou rovnoměrné a frekvence vln je vysoká. Z tohoto důvodu je pro přesné vyjádření potřebné zohlednit také vliv dynamiky povrchu bubliny.

4.3 Rayleigh–Plessetova rovnice[10][15]

Pro její platnost musí být zavedeno mnoho předpokladů. Uvažujeme kulovou bublinu o poloměru $R(t)$, poloměr bubliny je funkcí času stejně jako tlak $p(t)$. Bublina leží v nekonečně rozlehlém prostředí, jehož teplota je konstantní. Dále jsou konstantní hodnoty hustoty kapaliny ρ_L a dynamické viskozity μ_L . Vnitřní plyn bubliny je buď plyn nebo sytá pára kapaliny a je rozložen v objemu homogenně a stejně jako teplota $T_B(t)$ a tlak $p_B(t)$. Kapalina obklopující bublinu je nestlačitelná a gravitační působení je zde zanedbáno. Výstupem je hodnota poloměru v závislosti na čase. Hodnoty tlaku $p(r,t)$, radiální rychlost povrchu $u(r,t)$ a teplota $T(r,t)$ jsou dány vzdáleností od středu bubliny r a časem t . Zde je její vyjádření:

$$\rho R \ddot{R} + \frac{3}{2} \rho \dot{R}^2 = p_L - p_0 \rho \dot{R}^2 = p_L - p_{\infty} \quad (4.17)$$



Obrázek 4.2: Schéma veličin popsanych v Rayleigh-Plessetově rovnici[10].

4.3.1 Resonanční frekvence[18]

Chování bubliny v prostředí a její namáhání akustickým tlakem je popsáno rovnicemi, které jsou odvozeny a zapsány výše. Prvně se budeme věnovat odvození resonanční frekvence mikrobublin. Výše již bylo uvedeno jak důležitá hodnota to je pro určení dalšího chování mikrobublin.

$$\rho \left(\frac{3}{2} \dot{R}^2 + Rr \right) = p_{int} - p_{ext} \quad (4.18)$$

Kde ρ je hustota okolní kapaliny, \dot{R} je rychlost pohybu stěny mikrobubliny, R je tudíž zrychlení stěny mikrobubliny a r je poloměr bubliny v závislosti na čase. Přičemž p_{int} je vnitřní tlak, který obsahuje tlak plynu a kapilární tlak a p_{ext} je součtem vnějšího a akustického tlaku.

Změnu poloměru bublin od základního poloměru přepíšeme jako závislost na koeficientu x , který je blízko 0, čili bublina osciluje kolem vyrovnaného stavu:

$$R = R_0(1 + x) \quad (4.19)$$

Po upravení a zanedbání podmínek vyššího řádu lze zapsat diferenciální rovnici:

$$\ddot{x} + \omega_0 \delta \dot{x} + \omega_0^2 x = \frac{P_a}{\rho R_0^2} \quad \omega_0 = 2\pi f_0 \quad (4.20)$$

Tato rovnice popisuje tlumené kmitání bubliny, pročež vnitřní plyn je funkční ekvivalent pružiny. δ popisující tlumení leží v rozmezí 0,1 - 0,2. Relativní amplituda je odvozena z rovnice kmitání a rovnice tlakové rovnováhy. Hodnota F_0 je rovna $\frac{P_a}{\rho R_0^2}$ přičemž P_a zůstává tlakovou amplitudou budící akustické vlny.

$$|x| = \frac{F_0}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (\delta\omega\omega_0)^2}} \quad (4.21)$$

Za podmínky:

$$\frac{d|x|}{d\omega} = 0 \quad f_{res} = f_0 \sqrt{1 - \frac{\delta^2}{2}} \quad (4.22)$$

Resonanční frekvence v závislosti na poloměru r vytváří hyperbolicou křivku. Zajímavá je také závislost $|x|$ na frekvenci, kde vlivem zanedbání vyšších řádů diferenciálních rovnic dochází k posunu resonanční frekvence a ztrátě resonančních frekvencí vyššího řádu. Odchylka však není výrazná, a proto se tato řešení jeví jako vhodná pro praktické využití. Překročí-li však amplituda Blakeův práh $R_{max} > 2,2R_0$ přestávají platit lineární vztahy a řešení nabízí pouze řešení kompletní Rayleigh-Plessetova rovnice.

4.4 Rovnice pro mikrobublinu s membránou[10][15]

Vzhledem k tomu že Rayleigh-Plessetova rovnice je značně okleštěná svými předpoklady, nemůže sloužit jako přesná predikce chování mikrobublin. Samozřejmě ani tato rovnice není přesným odrazem reality, avšak množství zanedbaných jevů a tím i velikost odchýlení od reality je nižší. V této rovnici bude hlavním rozdílem přidání vlastostí membrány mikrobubliny. První vlastností je její šířka ($\delta_S = R_{20} - R_{10}$), dále pak hustota (ρ_S), modul pružnosti ve smyku (G_S) a viskozita (μ_S). Vystupuje zde i hodnota modulu pružnosti ve smyku pro okolní prostředí. Krev je newtonovská kapalina, jejíž modul pružnosti je velmi nízký, proto jej zanedbáme, čili $G_L = 0$. První změnou je výpočet vstupních hodnot dle Van der Waalsovy stavové rovnice. Výpočet počáteční hodnoty tlaku je nyní zapsán takto:

$$p_g(t) = \left(p_{\infty 0} + \frac{2\sigma_1}{R_{10}} + \frac{2\sigma_2}{R_{20}} \right) \left[\frac{1}{\left(\frac{R_1}{R_{10}}\right)^3 - \frac{b}{V_m}} \right]^\kappa \quad (4.23)$$

Vztah pro výpočet teploty je nyní tento:

$$T_B = \frac{T_{\infty 0}}{\left[\left(\frac{R_1}{R_{10}}\right)^3 - \frac{b}{V_m} \right]^{\kappa-1}} \quad (4.24)$$

Přičemž b je Van der Waalsova konstanta plynu uvnitř mikrobubliny a V_m je molární objem. Následuje model, který bere v potaz i hodnoty stlačitelnosti kapaliny, okolní tkáň a membránu mikrobubliny[30]. Rovnice je v tomto tvaru:

$$\begin{aligned} & \left[\rho_L \left(1 - \frac{\dot{R}_2}{C} \right) + \rho_S \left(1 + \frac{\dot{R}_2}{C} \right) \left(\frac{R_2}{R_1} - 1 \right) \right] R_2 \ddot{R}_2 + \\ & + \left\{ \frac{3}{2} \rho_L \left(1 - \frac{1}{3} \frac{\dot{R}_2}{C} \right) + \rho_S \left(1 + \frac{\dot{R}_2}{C} \right) \left[-\frac{3}{2} + 2 \left(\frac{R_2}{R_1} \right) - \frac{1}{2} \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^4 \right] \right\} \dot{R}_2^2 = \\ & = \left(1 + \frac{\dot{R}_2}{C} \right) \left\{ p_g(t) - \frac{2\sigma_1}{R_1} - \frac{2\sigma_2}{R_2} - \frac{4}{3} G_S \left[1 - \left(\frac{R_{20}}{R_2} \right)^3 \right] \frac{V_S}{R_2^3 - V_S} - 4\mu_S \frac{V_S}{R_2^3 - V_S} \frac{\dot{R}_2}{R_2} - \right. \\ & \left. - \frac{4}{3} G_L \left[1 - \left(\frac{R_{20}}{R_2} \right)^3 \right] - 4\mu_L \frac{\dot{R}_2}{R_2} - p_{\infty 0} - p_{\infty}(t) \right\} - 3\kappa \frac{\dot{R}_2}{C} \left(\frac{R_2}{R_{10}} \right)^3 \frac{p_g(t)}{\left(\frac{R_1}{R_{10}}\right)^3 - \frac{b}{V_m}} \end{aligned} \quad (4.25)$$

Kdy platí, že $R_1 = (R_2^3 - V_S)^{1/3}$ a $V_S = R_{20}^3 - R_{10}^3$. Tato rovnice je rozšířením Keller-Miksisova modelu. Pokud bychom položili $R_{20} = R_{10}$, pak by rovnice popisovala plynou bublinu bez obalu oscilující v měkké tkáni. Jestliže by navíc platilo, že $G_L = 0$, bude se jednat o bublinu oscilující v Newtonské kapalině, a vyjádřili bychom původní Keller-Miksisovu rovnici.

4.4.1 Resonanční frekvence pro mikrobublinu s membránou

Vzhledem k vnesení vlivu membrány se mění resonanční frekvence mikrobubliny. V rovnici bude vystupovat modul pružnosti ve smyku membrány, což zvýší tuhost systému a tím vzroste vlastní frekvence. Vztah je podobně jako pro Rayleigh-Plessetovu rovnici linalizovaný, zanedbává resonanční frekvence vyššího řádu.

$$f_0 = \frac{1}{2\pi R_0} \sqrt{\frac{1}{\rho_L} \left(3\kappa v p_{g0} + 12G_S \frac{\delta_S}{R_0} \right)} \quad (4.26)$$

4.5 Veličiny popisující chování mikrobublin

4.5.1 Objemový modul[19]

Objemový modul popisuje elasticitu povrchu mikrobubliny. Její sférický objem V je vlivem zatížení kvazistatického objemového napětí ΔP stlačen. Objemová deformace je definována jako $\frac{\Delta V}{V}$, kde V je počáteční objem a ΔV je změnou objemu. Efektivní objemový modul (K_{ef}) je definován takto:

$$K_{ef} = -V \frac{\Delta P}{\Delta V} \quad (4.27)$$

Vzhledem k tomu, že mikrobublinu považujeme za sférický objekt, který je definován poloměrem, můžeme $\frac{\Delta V}{V}$ zapsat jako $\left(\frac{R}{R_0}\right)^3 - 1$. Nyní lze přepsat objemové napětí do nového tvaru:

$$\Delta P = -K_{ef} \left[\left(\frac{R}{R_0}\right)^3 - 1 \right] \quad (4.28)$$

4.5.2 Koeficient tření[19]

Při pohybu stěny mikrobubliny vzniká tření. Tento tlumící parametr popisujeme pomocí koeficientu tření, je vhodné podotknout, že tento parametr si lze představit jako viskozitu povrchu mikrobubliny. Změnu objemového napětí ΔP můžeme rozdělit do tří částí, tlak tekutiny na skořepinu p_L , tlumící tlak p_d , který vzniká při tlumení na rozhraní vnějšího prostředí a kapaliny, a hydrostatický tlak p_0 , což vyjadříme jako:

$$\Delta P = p_L + p_d - p_0 \quad (4.29)$$

Substitucí předchozích dvou rovnic do základního tvaru RP rovnice a použití rozepsaného vyjádření pro tlak v nekonečném mediu $p_\infty = p_0 + p(t)$, kde $p(t)$ je časově proměnná hodnota akustického tlaku, dostaneme RP rovnici v tomto tvaru:

$$\rho R \ddot{R} + \frac{3}{2} \rho \dot{R}^2 = -K_{eff} \left[\left(\frac{R}{R_0}\right)^3 - 1 \right] - p_d - p(t) \quad (4.30)$$

Z pohybové rovnice lze nyní získat následující rovnici:

$$4\pi R^2 p_d = \beta \dot{R} \quad (4.31)$$

V této rovnici zastupuje $4\pi R^2$ povrch mikrobubliny. Tuto hodnotu násobíme tlumícím tlakem, čímž na levé straně rovnice získáváme sílu tlumícího tlaku. Bylo zmíněno, že rovnice 4.31 je ekvivalentem pohybové rovnice. Pravá strana je tudíž ekvivalentem $m \cdot a$, kde β je mechanický odpor a \dot{R} je rychlost pohybu stěny mikrobubliny. Nyní zavedeme hodnotu δ_{tot} , která je součtem tlumení od tření a viskozity. Je rovna také tomuto výrazu $\delta_{tot} = \frac{\beta}{\omega m}$, kde je ω frekvencí aplikovaného zvukového pole a m je efektivní hmotnost mikrobubliny ($\frac{4}{3}\pi R^3 \rho$). Úpravou vyjádříme hodnotu p_d :

$$p_d = \delta_{tot} \rho \omega R \dot{R} \quad (4.32)$$

Kde tlumicí koeficient $\delta_{tot} = \delta_{rad} + \delta_{vis} + \delta_{th} + \delta_{fr}$, tato suma se skládá z tlumících koeficientů zpětné radiace, viskozity prostředí, tepelné kondukce a vnitřního tření.

4.5.3 Echogenita[19]

Pro kvalitní zobrazení a přesnost ultrazvukového vyšetření je zásadní velikost rozptylového průřezu σ , tato veličina je důležitá pro popis akustického chování mikrobubliny. Definována je jako koeficient akustické energie rozptýlené do všech směrů na jednotku energie vstupující. Intenzita odraženého ultrazvuku I_s je definována takto:

$$I_s = \frac{I_0 \sigma}{4\pi z^2} \quad (4.33)$$

Přičemž I_0 je intenzita zvuku příchozího signálu. Hodnota z je vzdálenost mezi vysílačem a rozptylujícím tělesem.

Vyjádření velikosti rozptylového průřezu σ , včetně vyšších harmonických frekvencí:

$$\sigma(R, \omega) = 4\pi R_0^2 \frac{\Omega^4}{(1 - \Omega)^2 + (\Omega\delta)^2} \quad (4.34)$$

Kde ω je frekvence vstupujícího záření. $\Omega = \frac{\omega}{f_0}$ přičemž f_0 je rezonanční frekvence.

4.5.4 Mechanický index[11][20]

V předchozích kapitolách byl zmíněn mechanický efekt ultrazvuku na tkáň. Sílu tohoto efektu je nutné zobrazit na přístrojích pro ultrazvukové vyšetření, aby operátor mohl předcházet újmě na zdraví pacienta. Ukazatelem je mechanický index (MI). Při ultrazvukovém vyšetření je do tkáň vysílána energie akustických vln. Mechanický index dává operátorovi informace o množství energie vstřebané tělem pacienta. Negativní efekty na tkáň jsou popsány v podkapitole 3.5. Tkáň těla však vykazují různou citlivost vzhledem k mechanickým efektům. Nejcitlivější na poškození kavitací jsou plyny naplněné tkáň, jako plíce a střeva. Definiční vztah pro mechanický index je následující:

$$MI = \frac{P}{\sqrt{f}} \quad (4.35)$$

V tomto vztahu je P maximální akustický tlak, f je frekvence ultrazvuku. Hodnota MI se používá jako bezrozměrná veličina. Hodnota MI je důležitá pro vyšetření za přítomnosti kontrastních mikrobublin. Při nižších hodnotách MI mikrobubliny začínají oscilovat, čímž zvětšují intenzitu odraženého signálu, překročí-li však určitou hodnotu, nastává sonoporace mikrobubliny. Při diagnostických vyšetřeních bez mikrobublin by hodnota neměla přesáhnout 1,9. Při užití mikrobublin by hodnoty měly být ještě nižší, aby bubliny vydržely v krvi po delší čas. Dle hodnot MI lze předpovídat efekt ultrazvuku na vaskulární permeabilitu, přičemž maximum nastává při hodnotě $MI=1$.

4.5.5 Termický index[20][21]

Analogicky jako mechanický index popisuje intenzitu mechanických účinků, tak termický index (TI) popisuje termický efekt ultrazvuku. Definice TI je podíl energie zvukové vlny v pozorované hloubce a odhadované energie potřebné ke zvýšení teploty tkáň o 1°C dle modelu pro specifickou tkáň.

$$TI = \frac{W_p}{W_{deg}} \quad (4.36)$$

Tudíž můžeme říci, že pokud $TI=2$, může operátor ultrazvukového zařízení očekávat nárůst teploty v tkáni o 2°C . Určení hodnoty W_p je poměrně jednoduché, problém je určení hodnoty W_{deg} . Režim výpočtu W_{deg} se řídí především složením těla v místě vyšetření. Rozdělení je na termický index měkké tkáň (TIS (eng. Thermal Index Soft-tissue)), termický index kostí (TIB (eng. Thermal Index Bone)), termický index kraniální (TIC (eng. Thermal Index Cranial)). Všechny tyto modely jsou značně zjednodušené a velmi konzervativní. Pohlcování energie kostmi je zjednodušeno na pohlcení většiny energie tenkou vrstvou na povrchu kosti (téměř nekonečný koeficient absorpce). Hodnota termického indexu tudíž nemá a nemůže sloužit jako míra zvýšení teploty tkáň, má však poskytovat operátorovi informace o relativním nebezpečí pro pacienta.



Obrázek 4.3: Záběr z ultrazvukového vyšetření. V pravém horním rohu jsou viditelné hodnoty MI a TIS.

4.6 Implementace do prostředí MATLABu

Numerickým řešením se zabývala diplomová práce Filipa Münstera[10]. V této práci byly krom Rayleigh-Plessetovy rovnice prezentovány i její modifikace, které zahrnují další vlivy působící na reálnou bublinu, které Rayleigh-Plesset zanedbávají. Nejkomplexnější rovnicí, která je prezentována je rovnice pro mikrobubliny s membránou dle Xin-Ferrarova modelu. Rovnice byly implementovány do MATLABu. V rámci této práce jsem tento program zredukoval pouze na porovnání Rayleigh-Plessetovy rovnice a rovnice pro mikrobubliny s membránou dle Xin-Ferrary. Vzhledem k vztahu mezi mechanickým indexem a sonoporací, byl přidán modul pro výpočet této hodnoty. Při matematickém popisu chování mikrobublin se dostáváme k nelineárním diferenciálním rovnicím druhého řádu což je analyticky neřešitelný problém. Východiskem jsou numerické metody řešení diferenciálních rovnic. Pro řešení problému Rayleigh-Plessetovy rovnice použijí numerické řešiče implementované v programu MATLAB. Vzhledem k podmínkám nastávajícím těsně před kolapsem bubliny ($\dot{R} = \infty, \frac{R}{R_0} = 0$) je nutné, aby krok numerické integrace v této oblasti byl velmi malý. Z toho plyne nutnost proměnnosti délky kroku, pokud by délka kroku nebyla proměnná, časová náročnost by byla zbytečně velká z důvodu množství redundantních iterací v počáteční fázi simulace. Dále je zásadní, aby výpočet nebyl ukončen příliš daleko od kolapsu bublin, a zároveň byla zachována dostatečná přesnost. Munster[10] ve své práci přesvědčivě ukazuje na analyticky řešitelné diferenciální rovnici 2. řádu s podobným vývojem ($x \rightarrow 0, \dot{x} \rightarrow \infty$), že vhodným řešičem tohoto problému je **ode113**.

4.6.1 Vstupní hodnoty pro výpočty v MATLABu

Při použití pro doručení léčiv se mikrobubliny pohybují v krevním řečišti. Pro popis okolí mikrobubliny tudíž použijeme hodnoty pro krev. Tělesná teplota pacienta je obvyklých $36,5^{\circ}\text{C}$ nebo-li $309,65\text{K}$. Určení hodnoty tlaku je složitější otázkou, krevní tlak je proměnný v závislosti na fázi srdeční činnosti, na vzdálenosti od srdce, velikosti žil, tepen a jejich poloze vzhledem k srdci. Pro zjednodušení použijeme hodnoty pro zdravého člověka tj. $120/80\text{mmHg}$ (systolický/diastolický tlak).

Dle [31] je v současnosti několik teorií, které se snaží o popis Youngova modulu pružnosti materiálu pro výrobu mikrobubliny. Ve své práci zkoumali lipidové mikrobubliny a na naměřená data aplikovali více teorií pro výpočet modulu. Data porovnali s dalšími studii, které se zabývaly tímto tématem. Hodnotu určenou dle Reissnerovy teorie zavrhl, hodnoty studií se rozcházely o řád, což hodnotí jako nepřijatelné a dále přináší závěr, že hodnoty určené dle této teorie jsou nadhodnocené. Přijatelnější hodnoty ukázala teorie elastické membrány, která předpokládá, že plicní plyn je nestlačitelný. Hertzova teorie byla použita jako poslední, narozdíl od předchozích dvou teorií tato teorie nevykazuje závislost Youngova modulu na poloměru mikrobubliny. Považuje však mikrobublinu více za homogenní sféru než-li za skořepinu. V ostatních výzkumech však tato teorie byla použita pro výpočet Youngova modulu různých typů váčků, které měly uvnitř minimálně stlačitelné kapaliny. Popřípadě byla tato teorie použita na živé buňky obsahující buněčné organely, jež mohou mít vliv na mechanické vlastnosti. Přes tyto rozdíly Hertzovu teorii upřednostňují jako nejvhodnější pro výpočet hodnoty Youngova modulu pružnosti. Hodnoty E jsou v práci [31] $8\pm 2\text{MPa}$, v [32] jsou hodnoty o mnoho nižší $2,5\pm 1\text{MPa}$. V rovnici pro mikrobubliny s membránou je zastoupena hodnota modulu pružnosti ve smyku, který vypočteme pomocí vzorce $G_s = \frac{E}{2(1+\nu)}$, pro dosažení do tohoto vzorce zvolíme přibližně střední hodnotu to jest 5MPa . Dále ve vzorci vystupuje hodnota ν , Poissonovo číslo, pro obě práce byla hodnota $0,5$. Hodnota modulu pružnosti ve smyku je po dosažení do vzorce rovna $G_s = 1,6\text{MPa}$.

Hustota membrány při použití polyethylenglykolu (PEG2000) je dle technického listu [33] 1210kg/m^3 , zde se vyskytuje i kinematická viskozita se střední hodnotou 50cSt . Tato data použijeme pro výpočet dynamické viskozity $\eta = \nu \cdot \rho$ a výsledkem bude $0,0605\text{Pa/s}$.

Požadované geometrické vlastnosti membrány byly zmíněny v předchozích kapitolách. Poloměr mikrobublin modelovaných v MATLABu zvolíme $3\mu\text{m}$ a šířku membrány na 5nm .

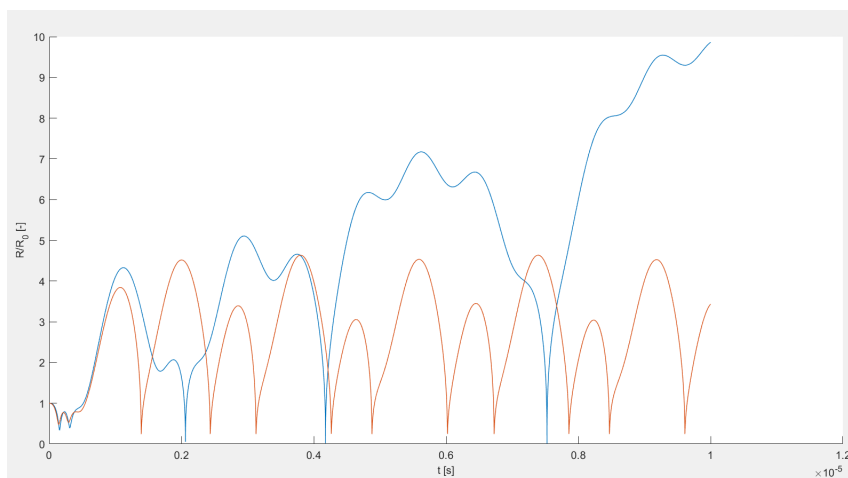
Tlak použitý při ultrazvukových vyšetřeních může růst až do řádu MPa [34],[35]. Hodnoty amplitudy budicího tlaku tudíž mohou směřovat až do těchto výšin. Frekvence, které jsou schopny ultrazvukové sondy produkovat leží mezi $1\text{-}20\text{MHz}$ [36]. Tudíž je nutná kontrola, aby budicí frekvence ultrazvuku nepřekročila tuto mez. Resonanční frekvence daného modelu bude použita jako budicí frekvence.

4.6.2 Odchyly MATLABovského kódu

Ve výpočtové části jsme použili Rayleigh-Plessetovu rovnici. Tato rovnice rozhodně není dokonalým obrazem mikrobubliny. Významným odchýlením je redukce povrchu mikrobubliny na nekonečně tenkou slupku, tím se zanedbávají všechny vlastnosti této slupky krom povrchového napětí a viskozity. Tato nelineární diferenciální rovnice 2. řádu je analyticky neřešitelná, tudíž je nutné přistoupit k numerickému řešení. Pro numerické řešení byl použit integrovaný řešič programu MATLAB 2019b, a to **ode113**, který vykazoval přijatelnou výpočtovou náročnost s minimální absolutní chybou. Další chyba byla vnesena aproximacemi při určování vstupních dat rovnic. V těle a v krevním řečišti jsou fyzikální podmínky značně proměnné, počítačové simulace tohoto prostředí jsou tím omezeny. Model Xin-Ferrara je komplexnější než Rayleigh-Plessetova rovnice avšak není kompletním popisem působení okolí na mikrobublinu.

4.6.3 Výsledky MATLABu

Numerická řešení implementovaných rovnic ukázala velké odchylky v predikovaném chování. Pokud bychom brali aproximovaný Blakeův poloměr ($2R$) jako pevný ukazatel sonoporace bubliny, nastane tento stav při použití Rayleigh-Plessetovy rovnice dříve než při použití modelu Xin-Ferrara. Při použití Rayleigh-Plessetovy rovnice nastane sonoporace při tlaku 120 kPa a $MI=0,1$, což je významná odchylka od podmínek kolapsu reálných mikrobublin popsanych výše. Použitím modelu Xin-Ferrara dosáhne protržení při tlakové amplitudě 250 kPa a hodnotě $MI=0,21$, což je stále značná odchylka, avšak sonoporace nyní nastává až po cyklech zatížení akustickou vlnou. Zajímavou hodnotou je hodnota amplitudy tlaku při dosažení mechanického indexu 1 který zajistí poměrně rychlou sonoporaci a zároveň má pozitivní vliv na permeabilitu okolích buněk. Při Rayleigh-Plessetově rovnici jsme dosáhli hodnoty tlaku 1,08 MPa, pro model Xin-Ferrara je to 1,2 MPa. Obecně Rayleigh-Plessetova rovnice vykazovala větší poměr R/R_0 než model Xin-Ferrara.



Obrázek 4.4: Grafické znázornění numerického řešení Rayleigh-Plessetovy rovnice (modře) a modelu Xin-Ferrara(červeně). Při tlaku 1,2 MPa se hodnota MI blíží k 1. Poměr R/R_0 je zde velmi vysoký, stejně jako MI , což by mělo vést ke kolapsu kavitací.

5. Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala mikrobublinami jako prostředky pro dopravu léčiva na místo určení se snížením zatížení organismu pacienta. Popisovala efekty vyvolané ultrazvukem zatíženými mikrobublinami v těle pacienta. Zkoumala také problematiku matematického popisu chování mikrobublin.

První část této práce popisuje výrobu mikrobublin. Vzhledem k množství požadavků, které jsou na mikrobubliny vyvíjeny, se stále objevují inovace, v materiálech a technologiích výroby. Cílem je minimalizovat zatížení organismu, protože jsou nyní zkoumány mikrobubliny, na jejichž povrch je možné usadit ligandy, které inklinují k určitému typu buněk.

Doprava léčiva do místa určení mikrobublinou musí být provázena vypuštěním léčiva v daném místě. To probíhá pomocí ultrazvuku, kterému byla věnována další část práce. Při interakci mikrobublin s ultrazvukem je okolí vystaveno značnému množství vlivů, které ovlivňují příjem léčiva do cílených buněk. V této části bylo také popsáno použití samotných mikrobublin jako prostředku pro zvýšení účinnosti HIFU léčby.

Další sekce pojednává o výpočtu chování mikrobubliny v tlakovém poli. Je zde popsána Rayleigh-Plessetova rovnice popisující chování bublin v prostředí. Tato rovnice má mnoho modifikací, která vyplňují místa jež Rayleigh-Plessetova rovnice zanedbává. V této práci byl prezentován model Qui-Ferrara rozšiřující Keller-Miksisovu rovnici.

Závěrem je prezentována implementace rovnic do prostředí MATLABu. Tímto se zabývala diplomová práce Filipa Münstera[10], kde byly prezentovány také další modifikace Rayleigh-Plessetovy rovnice. Program byl zredukován na porovnání Rayleigh-Plessetovy rovnice a Xin-Ferrarova modelu, do kterého byly dosazeny hodnoty nejbližší odpovídající prostředí těla. Provedli jsme simulace s hodnotami obvyklými pro ultrazvukové vyšetření a porovnali predikované chování dle uvedených rovnic.

Literatura

- [1] SIRSI, S. a M. BORDEN. Microbubble Compositions, Properties and Biomedical Applications. *Bubble science engineering and technology*. 11 2009, 1), s. 3–17. doi:10.1179/175889709X446507. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/44698740>.
- [2] PRAJAPATI, J. a Y. AGRAWAL. Synthesis, characterization and application of microbubbles: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences& Research*. 05 2020, s. 1532–1543. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/222256635>.
- [3] PATIL, J. et al. *Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation Technique: Novel approach for Drug Encapsulation*, s. 272–290. CRC Press, 11 2015. ISBN 9781482232325. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/284716339>.
- [4] SLAGLE, C. et al. Click Conjugation of Cloaked Peptide Ligands to Microbubbles. *Bioconjugate chemistry*. 04 2018, 29. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00084. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/324224763>.
- [5] WANG, S., J. HOSSACK a A. KLIBANOV. Targeting of microbubbles - contrast agents for ultrasound molecular imaging. *Journal of Drug Targeting*. 12 2017, 26), s. 1–45. doi:10.1080/1061186X.2017.1419362. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/321948712>.
- [6] STEINL, D. a B. KAUFMANN. Ultrasound Imaging for Risk Assessment in Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 05 2015, 16), s. 9749–9769. doi:10.3390/ijms16059749. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/276157704>.
- [7] COSGROVE, D. a R. ECKERSLEY. *Contrast-Enhanced Ultrasound: Basic Physics and Technology Overview*, s. 3–14. Springer, 01 2006. ISBN 978-88-470-0476-4. doi:10.1007/88-470-0476-4_1. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/226875297>.
- [8] HAYES, B. et al. Three-MHz Ultrasound Heats Deeper Into the Tissues Than Originally Theorized. *Journal of athletic training*. 02 2004, 39), s. 230–234. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/8220075>.

- [9] IZADIFAR, Z., P. BABYN a D. CHAPMAN. Mechanical and Biological Effects of Ultrasound: A Review of Present Knowledge. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 03 2017, 43. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2017.01.023. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/315592508>.
- [10] MÜNSTER, F. Numerické řešení dynamiky kavitační bubliny. diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně. Fakulta strojního inženýrství, Energetický ústav, 2018. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/113251?zp_id=113251.
- [11] SEN, T., O. TÜFEKCIOGLU a Y. KOZA. Mechanical index. *Anatolian journal of cardiology*. 04 2015, 15), s. 334–6. doi:10.5152/akd.2015.6061. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/275051770>.
- [12] WIJNGAARDEN, L. Mechanics of collapsing cavitation bubbles. *Ultrasonics Sonochemistry*. 04 2015, 29. doi:10.1016/j.ultsonch.2015.04.006. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/275060404>.
- [13] COLLIS, J. et al. Cavitation microstreaming and stress fields created by microbubbles. *Ultrasonics*. 02 2010, 50), s. 273–279. doi:10.1016/j.ultras.2009.10.002. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/222256635>.
- [14] MANASSEH, R. *Acoustic Bubbles, Acoustic Streaming, and Cavitation Microstreaming*, s. 33–68. Springer, 01 2016. ISBN 978-981-287-278-4. doi:10.1007/978-981-287-278-4_5. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/304998236>.
- [15] BRENNEN, C. E. *Cavitation and Bubble Dynamics*. Cambridge University Press, 2013. doi:10.1017/CBO9781107338760. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/36721045>.
- [16] HARKIN, A., A. NADIM a T. KAPER. On acoustic cavitation of slightly subcritical bubbles. *Physics of Fluids*. 11 1999, 11. doi:10.1063/1.869878. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/2180657>.
- [17] POSTEMA, M., N. JONG a G. SCHMITZ. Shell rupture threshold, fragmentation threshold, Blake threshold. In *Shell rupture threshold, fragmentation threshold, Blake threshold*, 3, s. 1708 – 1711, 10 2005. ISBN 0-7803-9382-1. doi:10.1109/ULTSYM.2005.1603194. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/4227386>.
- [18] KOOIMAN, K. et al. Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 03 2014, 72. doi:10.1016/j.addr.2014.03.003. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/261103142>.
- [19] QUAIA, E. *Physical Basis and Principles of Action of Microbubble-based Contrast Agents*, s. 15–30. Springer, 01 2005. doi:10.1007/3-540-27214-3_2. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/226638902>.

- [20] DUCK, F. The Meaning of Thermal Index (TI) and Mechanical Index (MI) Values. *BMUS Bulletin*. 11 1997, 5), s. 36–40. doi:10.1177/1742271X9700500411. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/311594948>.
- [21] BIGELOW, T. et al. The Thermal Index Its Strengths, Weaknesses, and Proposed Improvements. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. 05 2011, 30), s. 714–34. doi:10.7863/jum.2011.30.5.714. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/51084169>.
- [22] KARAMANOU, M. et al. Genesis of Ultrasonic Microbubbles: A Quick Historical Overview. *Current pharmaceutical design*. 01 2012, 18), s. 2115–7. doi:10.2174/138161212800099937. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/221849777>.
- [23] LIU, H.-L. et al. Combining Microbubbles and Ultrasound for Drug Delivery to Brain Tumors: Current Progress and Overview. *Theranostics*. 02 2014, 4), s. 432–444. doi:10.7150/thno.8074. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/260431490>.
- [24] LI, W. et al. Microstreaming velocity field and shear stress created by an oscillating encapsulated microbubble near a cell membrane. *Chinese Physics B*. 12 2014, 23. doi:10.1088/1674-1056/23/12/124302. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/273332449>.
- [25] WIJNGAARDEN, L. Mechanics of collapsing cavitation bubbles. *Ultrasonics Sonochemistry*. 04 2015, 29. doi:10.1016/j.ultsonch.2015.04.006. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/275060404>.
- [26] FIABANE, J., P. PRENTICE a K. PANCHOLI. High Yielding Microbubble Production Method. *BioMed Research International*. 02 2016, 2016), s. 1–9. doi:10.1155/2016/3572827. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/296472390>.
- [27] HAPSE, S. et al. Study and evaluation of microbubble drug delivery system. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 01 2012, 5), s. 27–33. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/288134488>.
- [28] GONG, Q. et al. Drug-Loaded Microbubbles Combined with Ultrasound for Thrombolysis and Malignant Tumor Therapy. *BioMed Research International*. 10 2019, 2019), s. 1–11. doi:10.1155/2019/6792465. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/336216532>.
- [29] MOZAFARI, M. et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction: Toward a new strategy for diabetes treatment. *Drug Discovery Today*. 11 2015, 21. doi:10.1016/j.drudis.2015.11.010. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/285216373>.

- [30] QIN, S. a K. FERRARA. A model for the dynamics of ultrasound contrast agents in vivo. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 09 2010, 128), s. 1511–21. doi:10.1121/1.3409476. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/46146849>.
- [31] SANTOS, E. et al. Nanomechanical Properties of Phospholipid Microbubbles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 02 2012, 28), s. 5753–60. doi:10.1021/la204801u. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/221813393>.
- [32] CHEN, C. et al. An Experimental Study on the Stiffness of Size-Isolated Microbubbles Using Atomic Force Microscopy. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 03 2013, 60), s. 524–34. doi:10.1109/TUFFC.2013.2594. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/235896400>.
- [33] *Sigma Aldrich technický list PEG2000* [online]. 2020. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/821037?lang=en®ion=CZ>.
- [34] FAN, T.-B. et al. The Relationship of Cavitation to the Negative Acoustic Pressure Amplitude in Ultrasonic Therapy. *Chinese Physics Letters*. aug 2016, 33(8), s. 084302. doi:10.1088/0256-307x/33/8/084302. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/0256-307x/33/8/084302>.
- [35] MILLER, D. et al. Overview of Therapeutic Ultrasound Applications and Safety Considerations. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. 04 2012, 31), s. 623–34. doi:10.7863/jum.2012.31.4.623. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/221970701>.
- [36] SZABO, T. a P. LEWIN. Ultrasound Transducer Selection in Clinical Imaging Practice. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. 04 2013, 32), s. 573–82. doi:10.7863/jum.2013.32.4.573. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/236077281>.

Seznam symbolů a jednotek

C	rychlost zvuku na rozhraní bublina-kapalina	$m \cdot s^{-1}$
E	Youngův modul pružnosti	Pa
f	frekvence	Hz
f_0	vlastní frekvence	Hz
G	modul pružnosti ve smyku	Pa
I	intenzita zvuku	$W \cdot m^{-2}$
K_{ef}	objemový modul	Pa^{-1}
MI	mechanický index	$Pa \cdot Hz^{-\frac{1}{2}}$
p	tlak	$Pa \cdot s^{-1}$
r	vzdálenost od středu bubliny	m
R	poloměr bubliny	m
T	termodynamická teplota	K
TI	termický index	K
V	objem	m^3
z	vzdálenost vysílače od cílové oblasti	m
β	mechanický odpor	$kg \cdot s^{-1}$
δ	koeficient tlumení	–
δ_s	tloušťka membrány	m
μ	dynamická viskozita	$Pa \cdot s$
ν	kinematická viskozita	$m^2 \cdot s^{-1}$
ρ	hustota	$kg \cdot m^3$
σ	povrchové napětí	Pa
σ_n	normálové napětí	Pa
ω	úhlová rychlost	s^{-1}

Indexy

\ddot{X}	časová derivace X
X_∞	daleko od bubliny
X_0	X v čase $t = 0$
X_{crit}	kritický stav X
X_B	uvnitř bubliny
X_S	vlastnost membrány
X_L	vlastnost kapaliny
X_v	vlastnost páry

Konstanty

Molární objem plynu	$V_m = 22,4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$
Poissonova konstanta	$\kappa = c_p/c_v = 1,4$
Poissonova konstanta (mechanika)	$\nu = 0,5$
Van der Waalsova konstanta	$b = 0,1727 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$